

ÉCOLE DOCTORALE SST

ÉQUIPE INRA UR083 Recherches Avicoles, 37380 NOUZILLY

Dynamiques Nutritionnelles

THÈSE présentée par :

Sarah GUARDIA

soutenue le : **14 décembre 2011**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : **Sciences de la vie**

**EFFETS DE PHYTOBIOTIQUES SUR
LES PERFORMANCES DE CROISSANCE
ET L'EQUILIBRE DU MICROBIOTE
DIGESTIF
DU POULET DE CHAIR**

THÈSE dirigée par :

Monsieur GUILLOT Jean-François

Professeur Emérite, université François – Rabelais

Et co-encadrée par :

Madame GABRIEL Irène

Chargée de Recherches, INRA de Nouzilly

RAPPORTEURS :

Monsieur DUCATELLE Richard

Professeur des Universités, Université de Gand (Belgique)

Monsieur MORGAVI Diego

Directeur de Recherches, INRA de Theix

JURY :

Monsieur ALLEMAN Fabien

Enseignant Chercheur, Ecole d'Ingénieurs de PURPAN

Monsieur CHEVRIER Claude

Professeur des Universités, Université de Tours

Monsieur DUCATELLE Richard

Professeur des Universités, Université de Gand (Belgique)

Madame GABRIEL Irène

Chargée de Recherches, INRA de Nouzilly

Monsieur GUILLOT Jean-François

Professeur Emérite, université François – Rabelais

Monsieur MORGAVI Diego

Directeur de Recherches, INRA de Theix

Remerciements

Le travail présenté dans cette thèse de doctorat a été réalisé au sein de l'Unité de Recherches Avicoles de l'INRA de Nouzilly-Tours (UR 0083) et de l'Unité Expérimentale Elevage Alternatif et Santé des Monogastriques de l'INRA du Magneraud (UE 1206). Je suis reconnaissante aux personnes qui m'ont supporté et qui m'ont aidé au cours de cette période, et tiens tout particulièrement à remercier :

- **Irène Gabriel**, pour m'avoir encadré pendant ces trois années, et tout particulièrement pour sa grande disponibilité et tout le temps qu'elle a bien voulu m'accorder.

- **Jean-François Guillot**, pour avoir accepté de diriger cette thèse ainsi que pour ses nombreux conseils et discussions qu'il a bien voulu continuer à me donner même après avoir pris sa retraite.

- **Michel Duclos** et **Hervé Juin**, respectivement directeurs de l'Unité de Recherches Avicoles de Nouzilly et de l'Unité Expérimentale Elevage Alternatif et Santé des Monogastriques du Magneraud, pour m'avoir accueillie et m'avoir permis de faire cette thèse dans leurs unités.

- **François Recoquillay**, directeur de recherche et développement dans l'entreprise Phytosynthèse pour son implication dans ce travail, et pour avoir permis son financement, avec la Région Centre, que je remercie aussi.

- Les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse :

- **Richard Ducatelle**, Professeur à l'Université de Ghent, pour sa participation en tant que rapporteur de ce travail.

- **Diego Morgavi**, Directeur de Recherches à l'INRA de Theix, qui a bien voulu être rapporteur de ce travail

- **Fabien Alleman**, Enseignant Chercheur à l'Ecole d'Ingénieurs de PURPAN, qui a acceptée d'être examinateur de cette thèse.

- **Claude Chevrier**, Professeur à l'Université de Tours, qui a bien voulu être membre de mon jury de thèse.

- Les différentes personnes qui ont accepté de participer à mon comité de thèse : **Michel Lessire**, **Hervé Juin**, **François Recoquillay**, **Michel Duclos**, **Sophie Tesseraud**, **Gérard Corthier** et **Jean-Pierre Furet**

- Je tiens à remercier au sein de l'UMR1319 Micalis de l'INRA de Jouy en Josas, **Florence Levenez** pour ses conseils pour la réalisation des gels de TTGE et **Jean Pierre Furet** pour ses conseils sur la PCR en temps réel.

- Je tiens à remercier au sein de l'UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme de l'INRA de Castanet-Tolosan **Laurent Cauquil** et **Rory Michelland** pour leur aide et leur grande disponibilité pour l'adaptation du logiciel StatFingerprint à l'analyse de profils de TTGE. Je tiens également à remercier **Sylvie Combes** pour ses éclairages sur les questions d'écologie microbienne ainsi que pour son aide pour la mise au point des analyses de PCR en temps réel.

- Je tiens également à remercier plusieurs personnes au sein de l'Unité de Recherches Avicoles de l'INRA de Nouzilly-Tours (UR 0083) et de l'Unité Expérimentale Elevage Alternatif et Santé des Monogastriques de l'INRA du Magneraud (UE 1206) :

- **Philippe Lescoat**, pour son aide, ses discussions et son recul scientifique.

- **Maryse Leconte**, pour son aide lors des expérimentations zootechniques et pour les extractions d'ADN.

- **Serge Mallet** et **Jean-Marc Hallouis**, pour leur bonne humeur, leurs discussions et leur aide lors des expérimentations.

- **Carole Moreau-Vauzelle**, **Patricia Rideaud** et **Christel Dupont**, pour leur soutien et pour m'avoir appris à faire les TTGE.

- **Nathaële Wacrenier**, pour toute l'aide apportée à la documentation.

- **Sandrine Gasteau**, pour ses compétences statistiques.

- **Barbara Konsak**, pour son aide pour les quantifications par PCR et pour ses corrections en anglais

- **Nathalie Rougière** qui a été une colocataire de bureau géniale !

- **Claudette de Bue**, **Didier Barré** et toute l'équipe de l'aile administrative pour leur accueil chaleureux et leur aide au quotidien.

- Plus généralement je tiens à remercier :

- Toute l'équipe **Dynamiques Nutritionnelles**, l'équipe de l'UEASM qui m'ont accueillie et supportée pendant cette thèse.

- L'équipe de l'ITAVI et plus particulièrement **Isabelle Bouvarel, Angélique Travel, Laure Bignon, Amandine Mika et Vérane Gigaud** pour m'avoir accueillie au cours de cette dernière année

- L'unité expérimentale PEAT, et tout particulièrement **Harold Rigoreau, Philippe Moritz, Serge Nevoit, Nadine Sellier et Frédéric Mercierand**, et tous les animaliers de l'UEASM pour leur aide dans l'élevage des animaux.

- Toutes les personnes qui m'ont aidé lors des abattages et des découpes

- Je tiens à remercier ma famille, et tout particulièrement mon père et sa compagne, qui ont cru en moi et m'ont supporté lors de mes moments de doutes. Je tiens également à remercier ceux de mes amis qui ont dû me supporter dans les moments difficiles, et plus particulièrement **Camille, Nathalie, Cédric et Johann**

- Enfin, je tiens à remercier **Hugues** pour toutes nos discussions, fous rires et séances d'escalade pendant cette thèse, mais surtout pour avoir bien voulu être à mes côtés quand j'en avais le plus besoin.

Résumé

Les phytobiotiques (PHY) sont utilisés dans l'alimentation des animaux en remplacement des antibiotiques facteurs de croissance interdits depuis 2006. Les travaux étudiant leurs effets sur la croissance des animaux, dont les volailles, conduisent à des résultats variables. Ces différences pourraient être en partie dues aux conditions d'élevage et aux types d'animaux qui varient fortement d'une étude à l'autre. Les mécanismes d'action des PHY restent également mal connus, mais pourraient être liés à une action sur le microbiote digestif. En effet, de nombreux PHY contiennent des molécules capables d'inhiber *in vitro* la croissance des bactéries digestives, mais leur action *in vivo* a peu été étudiée.

Ce travail a eu pour objectif de déterminer les conditions d'efficacité de 2 modèles de PHY sur la croissance de poulet de chair et d'étudier leur action sur le microbiote digestif. Un régime témoin a été comparé à un traitement Exp1 contenant des PHY à effet principalement antibactérien et un traitement Exp2 contenant une succession de PHY à effets principalement antioxydant, puis antibactérien. Au cours d'une première étude, les animaux étaient issus d'un couvoir expérimental situé à proximité du lieu d'élevage, limitant ainsi le temps entre l'éclosion et l'accès à l'alimentation. Ils ont été élevés à une densité de 12 ou 17 animaux/m². Cette étude a montré l'absence d'effet bénéfique de ces PHY dans ces conditions de démarrage optimales. Dans une seconde étude, les poulets ont été placés dans des conditions de démarrage moins favorables. Ils étaient issus d'un couvoir industriel, et ont été transportés jusqu'à leur lieu d'élevage situé à 150 km, puis ont été élevés dans les conditions décrites précédemment. Les deux traitements expérimentaux ont eu un effet favorable sur la croissance des animaux placés à une densité de 12 animaux/m², mais seul Exp2 a eu un effet bénéfique à 17 animaux/m². De plus, les résultats à 12 animaux/m² dépendaient du potentiel de croissance des animaux, Exp1 était plus efficace sur les petits animaux, et seul Exp2 était bénéfique aux gros, suggérant une influence de la génétique sur l'efficacité des PHY. Les effets des PHY sur le microbiote digestif ont été étudiés après avoir analysé les variations du microbiote en fonction de la localisation dans le tractus digestif, de l'âge des animaux ou de leur densité d'élevage. Les PHY ont modifiés le microbiote des animaux différemment selon le type de PHY et les facteurs précédemment cités.

En conclusion, l'efficacité des PHY utilisés dans cette étude varie selon les conditions d'élevage et les animaux. Ils améliorent la croissance des animaux placés dans des conditions défavorables. De plus ces molécules ont une action sur le microbiote digestif des animaux qui pourrait en partie expliquer l'amélioration de leur croissance.

Mots-clefs : Poulet, Phytobiotique, Conditions d'élevage, Croissance, Microbiote digestif

Résumé en anglais

Phytobiotics (PHY) are used as substitute to antibiotic growth factors, which are forbidden in the livestock diet in European Union since 2006. However their positive effect on livestock growth performance, particularly on poultry, is inconsistent. Those discrepancies could partly be related to the conditions of their use, the rearing conditions, and the birds' lines, which differ between studies. Their modes of action are poorly known but could imply an impact on the digestive microbiota, as numerous PHY components inhibit *in vitro* the growth of digestive bacteria growth. However the PHY *in vivo* activity is poorly studied.

The current work was conducted to know in which conditions 2 specific PHY blends are efficient to improve chicken growth, and to investigate their impact on the birds' digestive microbiota. The effect of a control diet was compared to the Exp1 diet, containing a PHY blend which main effect was antibacterial, and to the Exp2 diet, containing a sequence of 2 PHY blends which main properties were antioxidant and antibacterial. This was done in several rearing conditions. For the first experiment, the birds were hatched in an experimental hatchery on the rearing place to reduce the period of fasting before arrival in the experimental husbandry. They were reared at a stocking density of 12 or 17 birds/m². In those optimal post-hatch rearing condition, the PHY did not improve the birds' growth performance. In the second experiment, chickens were reared in industrial like conditions. They were hatched in an industrial hatchery 150 km away from the rearing place, and then reared at the previously described stocking densities. Both diets containing PHY improved the growth performance of the birds reared at 12 birds/m², but only the Exp2 diet was beneficial for chickens reared at 17 birds/m². Moreover, PHY efficiency on chickens reared at a density of 12 birds/m² varied according to their growth potential. Exp1 was the most efficient diet on light birds, while only Exp2 was efficient on the heavy birds. The changes of chicken digestive microbiota induced by the PHY were investigated after a preliminary analysis of chicken microbiota according to site of sampling in the digestive tract, birds' age, or stocking density. PHY have an impact on digestive microbiota that differs according to the dietary treatment and the previously described factors.

In conclusion, the efficiency of the PHY used in the present work varied according to the chickens' rearing conditions. They are beneficial when the rearing conditions didn't allow an optimal growth of the birds. Moreover, PHY had an impact on chicken digestive microbiota that may partly explain the improvement of their growth performance.

Key words: Chicken, Phytobiotic, Rearing conditions, Growth, Digestive microbiota

Table des matières

Remerciements	1
Résumé	7
Résumé en anglais	11
Table des matières	15
Liste des publications	25
Liste des abréviations françaises	29
Liste des abréviations anglaises	35
Liste des tableaux	39
Liste des figures	43
Liste des annexes	47

Introduction générale	51
------------------------------------	----

Première partie. Etude Bibliographique	59
---	----

Chapitre 1 - Les Phytobiotiques	63
---------------------------------------	----

I. Les Phytobiotiques	63
-----------------------------	----

1.1 Définitions et grandes familles de molécules	63
--	----

1.2 Rôle, biosynthèse et répartition dans les plantes	66
---	----

1.3. Les différents produits : méthodes d'obtention	68
---	----

II. Les principes actifs et utilisation dans l'alimentation des volailles	71
---	----

2.1 Activités biologiques des phytobiotiques	71
--	----

2.2 Utilisation dans l'alimentation des volailles et effet sur l'animal et ses produits	77
---	----

2.3 Facteurs de variation de l'efficacité des phytobiotiques	83
--	----

2.4 Mécanismes d'action <i>in vivo</i>	85
--	----

III. Les phytobiotiques utilisés au cours de ce travail de thèse	91
--	----

3.1 Eucalyptus	91
----------------------	----

3.2 Cannelle	92
--------------------	----

3.3 Ail	93
---------------	----

3.4 Uncaria	93
-------------------	----

3.5 Eleuthérocoque	94
--------------------------	----

3.6 Curcuma	95
-------------------	----

3.7 Extraits de pépins de raisin	96
--	----

3.8 Naringine	96
---------------------	----

Résumé	97
Chapitre 2 - Physiologie digestive du poulet.....	99
I. Les organes de la digestion	99
1.1 Du bec au jabot.....	100
1.2 Le Proventricule et le gésier	101
1.3 L'intestin grêle et ses glandes annexes	101
1.4 Les caeca	103
1.5 Du colon au cloaque.....	104
II. Transit digestif : durée, mouvement péristaltique et rétropéristaltisme	104
2.1. Partie supérieure du tractus digestif : du jabot à la fin de l'intestin grêle	105
2.2. Partie inférieure du tractus digestif : les caeca et le colon	108
III. Sécrétions digestives du poulet et digestion.....	108
3.1. Sécrétions salivaires	108
3.2. Sécrétions de l'œsophage et du jabot	108
3.3. Sécrétions gastriques	108
3.4. Sécrétions biliaires	109
3.5. Sécrétions pancréatiques	109
3.6. Sécrétions intestinales	109
3.7. Protection du tractus digestif.....	111
IV. Digestion endogène et absorption	112
4.1 Les glucides.....	113
4.2 Les protéines	114
4.3 Les lipides	115
4.4 L'eau.....	116
V. Paramètres physico-chimiques du tractus digestif	118
5.1 Concentration en oxygène et potentiel redox	118
5.2 Teneur en eau et osmolarité	119
5.3. Concentration en matières organiques et minérales	119
5.4 pH et pouvoir tampon.....	120
5.5 Température	123
Résumé	123

Chapitre 3 - Le microbiote bactérien digestif	127
I. Méthodes d'approche des microbiotes bactériens	127
1.1 Systèmes de classification des bactéries	129
1.2 Analyse de la diversité d'un écosystème bactérien	129
1.3 Méthodes culturales.....	130
1.4 Approches moléculaires basées sur l'ADNr16S	131
II. Microbiote digestif du poulet de chair.....	147
2.1 Colonisation du tractus digestif.....	147
2.2 Structuration spatiale du microbiote digestif le long du tractus digestif.....	152
2.3 Métabolisme des groupes bactériens.....	162
III. Impact du microbiote sur l'hôte	166
3.1 Sur la structure et la fonctionnalité du tractus digestif de l'hôte.....	167
3.2 Sur la disponibilité des nutriments	168
3.3 Sur le métabolisme de l'hôte.....	169
3.4 Sur la santé de l'hôte	171
3.5. Sur les performances de croissance.....	172
Résumé.....	173
Deuxième partie. Matériels et Méthodes.....	175
Chapitre 1 - Expérimentations conduites sur les animaux	179
I. Objectifs et déroulement des expérimentations sur animaux	179
1.1 Expérience 1 : Composition et évolution du microbiote digestif du poulet le long du tractus digestif en fonction de l'âge des animaux (Figure 21).....	179
1.2 Expérience 2 : Impact de phytobiotiques sur les performances de croissance de poulets éclos à proximité de leur lieu d'élevage (Figure 22).....	180
1.3 Expérience 3 : Impact de phytobiotiques sur les performances de croissance et le microbiote digestif de poulets éclos dans un couvoir industriel à grande distance de leur lieu d'élevage (Figure 23).....	182
II. Phytobiotiques	186
III. Aliment.....	188
IV. Animaux.....	190
4.1 Souches.....	190
4.2 Provenance des poussins et mise en place	190

V. Conditions d'élevage	191
5.1. Densité d'élevage	191
5.2 Bâtiments et parquets	191
5.3 Température	192
5.4 Eclairage et programme lumineux	192
VI. Suivi des performances zootechniques de croissance	192
6.1 Animaux éliminés des calculs de poids	193
6.2 Calcul de l'indice de consommation	193
6.3 Calcul de la consommation individuelle	193
6.4 Analyses des gains de poids en fonction du poids des animaux en début d'élevage (9 ou 10j)	193
VII. Suivi de la qualité des litières	194
Chapitre 2 – L'étude des microbiotes digestifs	195
I. Prélèvement des échantillons	195
1.1. Euthanasie des animaux	195
1.2. Prélèvements des contenus digestifs	195
1.3. Prélèvements au niveau du mucus	196
II. Extraction de l'ADN bactérien	197
2.1 Kit QIAamp® DNA stool de Qiagen modifié	197
2.2 Kit G'NOME de BIO 101 modifié	198
2.3 Comparatif de l'efficacité des 2 méthodes	200
III. Empreinte moléculaire par TTGE	203
3.1 Réalisation des gels	203
3.2 Identification de bandes	203
3.3 Analyse des profils d'empreintes moléculaires	204
IV. Dénombrement par PCR en temps réel	211
4.1 Choix des groupes cibles	211
4.2 Amorces utilisées et procédure expérimentale	211
4.3 Expression des résultats	213
Troisième partie. Etude Expérimentale	215
Chapitre 1 – Connaissance du microbiote digestif du poulet	217

I. Dynamique spatiale et temporelle du microbiote digestif du poulet (expérimentation 1)	218
1.1. Présentation de l'étude	218
1.2. Influence de l'échantillonnage sur les résultats de l'analyse de ce microbiote	218
1.3. Variation spatiale et temporelle du microbiote des contenus et du mucus digestif du poulet, du jabot aux caeca	224
II Impact des conditions d'élevage des poulets sur le microbiote digestif : cas de la densité d'élevage (expérimentation 3)	245
2.1. Présentation de l'étude	245
2.2. Effets de la densité d'élevage sur les performances de croissance et le microbiote digestif du poulet de chair	245
2.3. Analyses complémentaires	277
Résumé	279

Chapitre 2 - Effet des phytobiotiques sur les performances zootechniques du poulet de chair

I. Effet sur la croissance dans des conditions post éclosion optimisées pour favoriser les performances ultérieures des animaux	282
1.1. Présentation de l'étude	282
1.2. Effets sur l'ensemble des animaux	282
1.3. Résultats complémentaires : effets en fonction du potentiel de croissance des animaux	297
II. Effet sur la croissance et le microbiote digestif dans des conditions post éclosion proches de celles utilisées en élevage industriel	301
2.1. Présentation de l'étude	301
2.2. Effets sur l'ensemble des animaux	302
2.3. Effets en fonction du potentiel de croissance des animaux	359
Résumé	367

Quatrième partie. Discussion générale et perspectives..... 369

Chapitre 1 – Analyse critique des approches d'étude du microbiote digestif .. 373

I. Echantillonnage des bactéries des contenus digestifs et du mucus	373
1.1. Contenus digestifs	373

1.2. Mucus	373
II. Analyse moléculaire du microbiote	374
2.1. Extraction d'ADN	374
2.2. Empreinte moléculaire par TTGE	376
2.3. Quantification par PCR en temps réel	377
Résumé	380

Chapitre 2 – La dynamique temporelle et la structuration spatiale du microbiote digestif du poulet doivent-elles être prises en compte lors de l'étude de ses modifications ?

I. Structuration spatiale du microbiote digestif	383
1.1. Connaissance de la structuration spatiale	383
1.2. Impact sur l'étude des facteurs de variation du microbiote	385
II. Evolution temporelle	386
2.1 Connaissance de l'évolution temporelle	386
2.2. Impact sur l'étude des facteurs de variation du microbiote	387
Résumé	388

Chapitre 3 – Peut-on mettre en évidence des facteurs liés aux conditions d'élevage ou à l'animal ayant un impact sur l'efficacité des phytobiotiques ?

I. Les conditions d'élevage	389
1.1. Validation des modèles utilisés	389
1.2. Effet des phytobiotiques selon les conditions d'élevage	391
II. Le potentiel de croissance des animaux	394
2.1. Avantages et limites de l'utilisation d'un indicateur du potentiel de croissance comme facteur génétique	394
2.2. Validation du poids à 9-10j comme prédicteur du poids en fin d'élevage	395
2.3. Impact du potentiel de croissance sur la réponse des animaux aux phytobiotiques	396
Résumé	399

Chapitre 4 – Quels peuvent être les mécanismes par lesquels les phytobiotiques utilisés ont amélioré la croissance des animaux ?

I. Action sur le microbiote digestif.....	401
1.1. Impact des phytobiotiques sur le microbiote digestif.....	401
1.2. Les modifications du microbiote digestif peuvent-elles être responsables de l'amélioration de la croissance ?	402
II. Les autres mécanismes	404
2.1. Modification du comportement alimentaire.....	405
2.2. Amélioration du statut oxydatif.....	406
2.3. Stimulation de la digestion.....	406
Résumé	407
Conclusion.....	409
Bibliographie.....	415
Annexes.....	460
Résumé	472
Résumé en anglais.....	472

Liste des publications

Publications

1 - **Guardia, S.**, Konsak, B., Combes, S., Levenez, F., Cauquil, L., Guillot, J. F., Moreau-Vauzelle, C., Lessire, M., Juin, H., Gabriel, I. Effects of stocking density on the growth performance and digestive microbiota of broiler chickens. *Poultry Science*, 2011. **90**: 1878-1889.

Communications orales

1 - **Guardia, S.**, Furet, J.P., Recoquillay, F., Juin, H., Lessire, M., Leconte, M., Rideaud, P., Moreau-Vauzelle, C., Dupont, C., Guillot, J.F., Gabriel, I. A comparison of two methods to extract bacterial DNA of the digestive tract. 2009, *6th International Symposium of Anaerobic Microbiology, Liblice*, Czech Republic

2 - **Guardia, S.**, Recoquillay, F., Juin, H., Lessire, M., Leconte, M., Rideaud, P., Moreau-Vauzelle, C., Dupont, C., Guillot, J.F., Gabriel, I., Evolution de la flore digestive du poulet au cours de sa croissance. 2009, *3ème Journée d'Animation Scientifique du Département PHASE* Tours, France

3 - **Guardia, S.**, Recoquillay, F., Juin, H., Lessire, M., Leconte, M., Rideaud, P., Moreau-Vauzelle, C., Dupont, C., Guillot, J.F., Gabriel, I. Variabilité inter-individuelle de la flore digestive du poulet de chair analysée par empreinte moléculaire : conséquences pour l'étude de l'effet de ses facteurs de variation. 2009, *Huitièmes Journées de la Recherche Avicole*, St Malo, France

4 - Konsak, B., **Guardia, S.**, Leconte, M., Moreau-Vauzelle, C., Dupont, C., Mignon-Grasteau, S., Gabriel, I. Comparison of the digestive microbiota between two divergent lines of chickens selected based on digestive capacity. 2011, *7th International Symposium on Anaerobic Microbiology*, Smolenice Castle, Slovakia.

Posters

- 1- **Guardia, S.**, Recoquillay, F., Juin, H., Lessire, M., Leconte, M., Guillot, J.F., Gabriel, I. Effect of plant extract blends in two rearing densities on growth performances of broiler chickens according to their growth potential. 2009, *In: Branch, W.U. (Ed.), 17th European Symposium on Poultry Nutrition, Edinburg (UK)*, p. 231.
- 2- **Guardia, S.**, Recoquillay, F., Juin, H., Lessire, M., Leconte, M., Guillot, J.F., Gabriel, I. Effet de l'inclusion de combinaisons d'extraits végétaux naturels selon la densité d'élevage sur les performances de croissance de poulets de chair en fonction de leur poids en début d'élevage. 2009, *Huitièmes Journées de la Recherche Avicole*, St Malo, France.
- 3 - **Guardia, S.**, Recoquillay, F., Juin, H., Lessire, M., Leconte, M., Guillot, J.F., Gabriel, I. Effet de l'utilisation de combinaisons d'extraits végétaux naturels dans l'alimentation du poulet de chair selon la densité d'élevage sur les performances de croissance. 2009 *Huitièmes Journées de la Recherche Avicole*, St Malo, France.
- 4 - **Guardia, S.**, Recoquillay, F., Juin, H., Lessire, M., Leconte, M., Rideaud, P., Moreau-Vauzelle, C., Dupont, C., Guillot, J.F., Gabriel, I. Effet de phytogéniques sur la microflore digestive et les performances de croissance du poulet. 2009, *4ème colloque de l'AFEM Lyon*, Lyon, France.
- 5 - **Guardia, S.**, Recoquillay, F., Juin, H., Lessire, M., Leconte, M., Rideaud, P., Moreau-Vauzelle, C., Dupont, C., Guillot, J.F., Gabriel, I. Effect of phytobiotic blends on digestive microbiota of broiler chickens in two rearing densities. 2010, *7th INRA-RRR Symposium on Gut Microbiology (new insights into gut microbial ecosystems)*, Aberdeen, UK.
- 6 - **Guardia, S.**, Recoquillay, F., Juin, H., Lessire, M., Leconte, M., Rideaud, P., Moreau-Vauzelle, C., Dupont, C., Guillot, J.F., Gabriel, I. Effect of phytobiotic blends on growth performances and digestive microbiota of broiler chickens in two rearing densities. 2010, *2nd TNO Beneficial Microbes Conference*, Noordwijkerhout, Nederland.
- 7 - **Guardia, S.**, Recoquillay, F., Juin, H., Lessire, M., Leconte, M., Guillot, J.F., Gabriel, I. Influence des conditions de post-éclosion et d'élevage sur l'efficacité zootechnique des phytobiotiques comme facteurs de croissance destinés aux poulets de chair. 2011, *Neuvièmes Journées de la Recherche Avicole*, Tours, France.

Liste des abréviations françaises

A : adénine

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNr 16S : ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S

AFC : antibiotique facteur de croissance

AFLP : polymorphisme de longueur des fragments amplifiés

AGV : acide gras volatile

Aliment T : aliment témoin ne contenant pas de phytobiotiques

ANCOVA : analyse de la variance avec co-variables

ANOVA : analyse de la variance

ANOSIM : analyse de similarité

ARDRA : analyse des fragments de restriction de l'ADN ribosomique amplifié

ARISA : analyse automatisée de l'espace intergénique de l'ADN ribosomal

ARN : acide ribonucléique

C : cytosine

C. coccoïdes : *Clostridium coccoïdes*

C. leptum : *clostridium leptum*

CE-SSCP :

Co : cobalt

CO₂: dioxyde de carbone

Cu : cuivre

dATP : désoxyadénosine triphosphate

dCTP : désoxycytidine triphosphate

DGGE : Electrophorèse sur gel en gradient dénaturant

dGTP : désoxyguanosine triphosphate

dTTP : désoxythymidine triphosphate

E.coli : *Escherichia coli*

EM : énergie métabolisable

EMAn : énergie métabolisable apparente corrigée pour un bilan azoté nul

ESM : Ecart type de la moyenne

Exp1 : traitement alimentaire expérimental 1 composé de l'aliment témoin additionné en périodes de finition et retrait du mélange de phytobiotiques EXVa à 1kg/tonne

Exp2 : traitement alimentaire expérimental 2 composé de l'aliment témoin additionné en période de démarrage du mélange EXVb à 0,3kg/tonne, en période de croissance du mélange

EXVa à 0,8kg/tonne et en périodes de finition et retrait du mélange de phytobiotiques EXVa à 1kg/tonne

EXVa : combinaison de phytobiotiques (Enterocox® Phytosynthèse, Riom, France) composée d'huiles essentielles d'eucalyptus (*Eucalyptus globulus*), de cannelle (*Cinnamomum zelanicum*) et d'ail (*Allium sativum*) ainsi que de poudre d'ail.

EXVb : combinaison de phytobiotiques (Immunostart®, Phytosynthèse, Riom, France) composée d'extrait d'*Uncaria tomentosa*, d'*Eleutherococcus senticosus*, de *Curcuma longa*, d'extraits de pépins de raisins (*Vitis vinifera*) et de naringine (extrait du mésocarpe de pamplemousse, *Citrus paradisi*).

Fe : fer

FRET : transfert d'énergie de fluorescence

G : guanine

GMQ : gain moyen quotidien

GP : gain de poids

HCl : chlorure d'hydrogène

I : iode

IC : indice de consommation

IL : interleukine

INRA : institut national de la recherche agronomique

LYS : lysine

MET : méthionine

Mn : manganèse

NaCl : chlorure de sodium

NH₃ : ammoniac

nMDS : cadrage multidimensionnel non-métrique

NS : non significatif

O₂ : dioxygène

PCR : réaction en chaîne par polymérase

PFGE : électrophorèse en Champ pulsé

PHY : phytobiotiques

pO₂ : pression partielle en oxygène

PVPP : polyvinylpolypyrrolidone

qPCR : PCR quantitative

RAPD : amplification aléatoire d'ADN polymorphe

RFLP : polymorphisme de longueur des fragments de restriction

SSCP : polymorphisme de conformation simple brin

T : thymine

TGGE : électrophorèse sur gel de gradient thermique

T-RFLP : polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux

TRM : temps de rétention moyen

TTGE : électrophorèse en gradient de température dans le temps

UEASM : unité expérimentale élevage alternatif et santé des monogastriques

UEPEAT : unité expérimentale pôle d'expérimentation avicole de Tours

UFC : unités formant colonies

Zn : zinc

Liste des abréviations anglaises

A: adenine
ADFI: average daily feed intake
AGP: antibiotic growth promoter
ANOSIM: analysis of similarity
ANOVA: analysis of variance
BW: body weight
C: cytosine
C. coccooides: Clostridium coccooides
CFU: colony-forming unit
C. leptum: clostridium leptum
CO₂: carbon dioxide
CP: crude protein
D: day
DNA: deoxyribonucleic acid
DWG: daily weight gain
E.coli: Escherichia coli
EO: essential oil
ENTX: phytobiotic blend containing *Eucalyptus globulus*, *Cinnamomum zeylanicum* and *Allium sativum*
FCR: feed conversion ratio
G: guanine
Immunostart: phytobiotic blend containing *Uncaria tomentosa*, *Eleutherococcus senticosus*, *Curcuma longa*, grape seed (*Vitis vinifera*) and naringin (extracted from grapefruit mesocarp, *Citrus paradisi*).
ME: metabolizable energy
MgCl₂: magnesium chloride
NaCl: sodium chloride
NH₃: ammoniac
nMDS: non-metric multidimensional scaling
PCR: polymerase chain reaction
PHY: phytobiotic dietary treatment
PVPP: polyvinylpolypyrrolidon
rDNA :ribosomal DNA

SCFA: short chain fatty acid

SE: standard error

SEM: standard error of the mean

T : thymine

TTGE: temporal temperature gradient gel electrophoresis

Wk: week

Liste des tableaux

Tableau 1 : Métabolites secondaires des plantes.....	64
Tableau 2 : Principales appellations des substances produites à partir de matières premières végétales, en fonction de leurs modes de production.....	70
Tableau 3 : Solvants utilisés pour l'extraction des métabolites secondaires des plantes.....	70
Tableau 4 : Familles de molécules présentant une activité antibactérienne et mécanismes d'action.....	74
Tableau 5: Effet des phytobiotiques sur les performances de croissance du poulet (A), des autres volailles (B)	79
Tableau 6 : Temps de rétention moyen de l'aliment observé chez le poulet	107
Tableau 7 : pH des contenus du tractus digestif.....	122
Tableau 8 : Méthodes de caractérisation de microbiotes bactériens complexes	128
Tableau 9 : Nature et origine des inhibiteurs de PCR pouvant être présents dans des échantillons d'écosystèmes digestifs.....	135
Tableau 10 : Bilan des familles et genres bactériens détectés par inventaire moléculaire (clonage/séquençage) dans les contenus digestifs de poulet de chair	155
Tableau 11 : Bilan des familles et genres bactériens détectés par inventaire moléculaire (clonage/séquençage) associés aux muqueuses digestives de poulet de chair	161
Tableau 12 : Composition des mélanges EXVa et EXVb et composés actifs majoritaires ...	187
Tableau 14 : Températures de consignes pour les trois expériences.....	192
Tableau 15 : Echelle des scores de notation de litière.....	194
Tableau 16 : Efficacité d'extraction comparée par PCR en temps réel entre le kit QIAamp modifié et le kit G'NOME modifié sur des échantillons de microbiote de poulet de 6 semaines	201
Tableau 17 : Seuils de similarité positive en fonction du type d'échantillon	210
Tableau 18 : Séquences des amorces utilisées pour la quantification des différents groupes bactériens.....	212
Tableau 19 : Effet de la localisation dans le tractus digestif (jabot, iléon, caeca) sur la structure du microbiote digestif du poulet en fonction de la densité d'élevage.....	278
Tableau 20 : Effet de l'âge (3 semaines versus 6 semaines) sur la structure du microbiote digestif du poulet en fonction de la densité d'élevage des animaux	278
Tableau 21 : Analyse de variance à 2 facteurs (densité, traitement) avec comme co-variable le poids des animaux à 9 jours	300

Tableau 22 : Effet de l'inclusion d'extraits végétaux selon la densité d'élevage et la catégorie de poids à 9j sur le poids et le gain de poids des animaux mis en place dans des conditions optimales.....	300
Tableau 23 : Identification des bandes de profil TTGE présentant une variation d'intensité en fonction du traitement alimentaire (témoin ou Exp1)	332
Tableau 24 : Identification des bandes de profil TTGE présentant une variation d'intensité en fonction du traitement alimentaire (témoin ou Exp2)	358
Tableau 25 : Effet des conditions post éclosion sur la variance des poids des animaux à 23 et 24 jours.....	391
Tableau 26 : Schéma récapitulatif des hypothèses concernant l'effet du potentiel de croissance sur l'efficacité des phytobiotiques.....	398

Liste des figures

Figure 1 : Evolution du nombre de publications sur l'impact des phytobiotiques sur les performances de croissance des volailles.....	78
Figure 2 : Mécanismes d'actions principaux possibles des phytobiotiques.....	86
Figure 3 : Trajet d'une molécule de phytobiotique.....	88
Figure 4 : Le tractus digestif du poulet	100
Figure 5 : Structure de la paroi intestinale	102
Figure 6 : Variation du temps de transit moyen total avec l'âge des animaux	105
Figure 7 : Evolution spatiale de l'épaisseur des couches de mucus chez le rat	111
Figure 8 : Principales enzymes et produits d'hydrolyse intervenant dans la digestion des nutriments chez le poulet.....	117
Figure 9 : Représentation schématique de l'évolution des conditions physicochimiques le long du tractus digestif	124
Figure 10 : Représentation schématique de l'évolution transversale des conditions physicochimiques au sein d'un segment digestif.....	125
Figure 11 : Les différentes étapes de l'extraction d'ADN bactérien.....	133
Figure 12 : Les étapes de l'analyse par DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) ou TTGE (Temporal Temperature gradient Gel Electrophoresis) d'une population bactérienne	138
Figure 13 : Représentation schématique des analyses effectuées sur les profils d'empreintes moléculaires sur gel.....	139
Figure 14 : Représentation schématique d'une réaction de pyroséquençage.....	141
Figure 15 : Les étapes de l'amplification en temps réel par la technologie SybR green	144
Figure 16 : Les étapes de l'amplification en temps réel par la technologie TaqMan	145
Figure 17 : Origine des bactéries et facteurs susceptibles d'influencer le microbiote digestif au cours de la vie du poulet de chair	151
Figure 18 : Localisation de la colonisation bactérienne du mucus intestinal.....	157
Figure 19 : Exemple de nutrition croisée, le cas des interactions entre bactéries protéolytiques et cellulolytiques	166
Figure 20 : Impact du microbiote sur la croissance et la santé de l'hôte	167
Figure 21 : Organisation de l'expérience 1	183
Figure 22 : Organisation de l'expérience 2	184
Figure 23 : Organisation de l'expérience 3	185
Figure 24 : Principe des méthodes d'extraction de l'ADN bactérien utilisées	199

Figure 25 : Qualité d'extraction comparée par TTGE entre le kit QIAamp modifié et le kit G'NOME modifié sur des échantillons de microbiote de poulet.....	202
Figure 26 : Contrôle de migration et de pureté d'une bande excisée.....	204
Figure 27 : Représentation schématique des étapes permettant d'aboutir à une représentation graphique des différences de structure entre profils.....	208
Figure 28 : Processus de détermination du seuil de similarité positive pour un échantillon .	209
Figure 29 : Représentation par dendrogramme de l'analyse de similarité du microbiote des contenus digestifs de poulets de 3 et 6 semaines	384
Figure 30 : Comparaison des courbes de croissances des groupes témoins éclos dans un couvoir expérimental situé sur le lieu d'élevage ou industriel situé à 150 km du lieu d'élevage et élevés à 12 animaux/m ² , par rapport à celle des objectifs de performances de la souche Ross PM3.	390
Figure 31 : Schéma récapitulatif de l'effet des conditions d'élevage sur l'efficacité des phytobiotiques utilisés.....	393
Figure 32 : Schéma récapitulatif des hypothèses concernant les modes d'actions par lesquels les phytobiotiques modulent la croissance du poulet.....	404

Liste des annexes

Annexe 1 : Effet du traitement Exp1 sur l'abondance des bactéries dans les contenus digestifs du jabot à 6 semaines	462
Annexe 2 : Effet du traitement Exp1 sur l'abondance des bactéries dans les contenus digestifs de l'iléon à 6 semaines	463
Annexe 3 : Effet du traitement Exp1 sur l'abondance des bactéries dans les contenus digestifs des caeca à 6 semaines.....	464
Annexe 4 : Effet du traitement Exp1 sur l'abondance des bactéries dans les contenus digestifs du jabot à 3 semaines	465
Annexe 5 : Effet du traitement Exp1 sur l'abondance des bactéries dans les contenus digestifs de l'iléon à 3 semaines	466
Annexe 6 : Effet du traitement Exp1 sur l'abondance des bactéries dans les contenus digestifs des caeca à 3 semaines.....	467
Annexe 7 : Effet du traitement Exp1 sur l'abondance des bactéries dans les contenus digestifs du jabot à 6 semaines	467
Annexe 8 : Effet du traitement Exp1 sur l'abondance des bactéries dans les contenus digestifs de l'iléon à 6 semaines	469
Annexe 9 : Effet du traitement Exp1 sur l'abondance des bactéries dans les contenus digestifs des caeca à 6 semaines.....	470

Introduction générale

La production de volailles françaises représentait environ 1,85 millions de TEC (Tonnes Equivalent Carcasse) en 2008 contre 2,3 millions en 1998 (Jez et al., 2009). Sur ces 1,85 millions de TEC, la production de poulets en représentait environ 1 million de TEC, majoritairement constitués de poulets standard (75%). Le recul de la production de volailles françaises au cours de la dernière décennie, particulièrement de la production de poulets standards, est liée à une perte de compétitivité de la filière française par rapport à d'autres pays exportateurs, entraînant une diminution des exportations françaises (-37% entre 1998 et 2008) et une augmentation des importations (Jez et al., 2009). Cette baisse de compétitivité est en partie liée à l'apparition de nouveaux pays sur le marché international de volailles au cours des 10 dernières années, tels que le Brésil. De plus, la mise en place de réglementations de plus en plus exigeantes concernant la production des volailles diminue la compétitivité des producteurs européens. Ces réglementations ont pour objet une amélioration du bien-être des animaux, une réduction des risques pour le consommateur et la protection de l'environnement. Ainsi, dans ce contexte de forte concurrence internationale, il y a de la part des producteurs de volailles une demande constante d'innovations permettant d'augmenter leur compétitivité. L'une des approches possibles est l'amélioration des performances de croissance des volailles par des méthodes d'élevage innovantes dont l'amélioration de la qualité de l'alimentation des animaux. Ainsi, l'utilisation d'additifs dans l'alimentation est une des voies pour participer à l'amélioration de la productivité des élevages de volailles.

Depuis le premier janvier 2006, l'utilisation des antibiotiques facteurs de croissance (AFC) qui permettaient des améliorations de croissance de 3 à 10 % et d'efficacité alimentaire de 3 à 5% (Thomke and Elwinger, 1998a), est interdite dans l'alimentation des animaux de rente (European Commission, 2003). Cette réglementation a été mise en place en invoquant le principe de précaution à cause de l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques (Hillman, 2006; Diarra et al., 2007) qui pourraient représenter un risque pour la santé humaine. L'apparition de ces bactéries résistantes chez les animaux d'élevage semble liée aux administrations continues d'antibiotiques à des doses sub-thérapeutiques, de l'ordre de 5 à 50 ppm chez les volailles (Castanon, 2007). De plus, ces AFC pourraient avoir d'autres conséquences négatives pour la santé animale et humaine. Certains d'entre eux pourraient favoriser le développement de bactéries pathogènes du fait de la réduction du microbiote commensal (Asakura et al., 2001). Ils peuvent également être retrouvés en faible quantité dans la viande des animaux (Kan et Meijer., 2007 ; Weiss et al., 2007), ou en quantité importantes dans leurs rejets. Leur présence dans les rejets, utilisés en tant qu'engrais agricole, pourrait

être nocive pour la faune et la flore du sol, modifier la disponibilité des nutriments du sol suite à ces changements de microflore et microfaune, et entraîner le développement de bactéries résistantes à ces AFC dans le sol (Kumar et al., 2005). L'arrêt de l'utilisation des AFC chez les volailles a toutefois eu des conséquences négatives pour l'élevage des volailles, entraînant une réduction des performances de croissance, le développement de maladies comme les entérites nécrotiques, ou les dysbiosis, et un accroissement de l'utilisation d'antibiotiques thérapeutiques à des fins préventives (Casewel et al., 2003 ; Huyghebaert et al., 2011). Concernant la volaille, grâce à l'autorisation d'utilisation d'anticoccidiens ionophores, qui ont des propriétés antibactériennes, l'apparition de ces problèmes sanitaires, comme l'augmentation de l'utilisation d'antibiotiques thérapeutiques (EFSA, 2011) restent limités. Cependant ces molécules ne suppriment pas totalement les problèmes décrits, et sont interdites par les cahiers des charges de certaines filières. Il apparait donc important de trouver des alternatives aux AFC.

Pour faire face à l'annonce de l'interdiction des AFC, depuis la fin des années 1990, l'utilisation d'alternatives aux AFC dans l'alimentation s'est donc développée, avec un nombre important de produits mis sur le marché. Les produits les plus courants sont les probiotiques (microorganismes vivants), les prébiotiques (substrats pour la croissance de certaines bactéries du microbiote digestif et indigestibles par l'animal hôte), les enzymes, les acides gras organiques et les phytobiotiques naturels ou de synthèse (métabolites secondaires de plantes). Différentes revues bibliographiques rapportent une modification des performances de croissance de poulets de chair suite à l'ingestion de ces produits, mais leurs effets sont variables. Ainsi, un effet sur l'efficacité alimentaire de -4 à +18 % est rapportée pour les probiotiques (Simon et al., 2001), de -5 à +10% pour les prébiotiques (Simon et al., 2001), de +2 à +5% pour les enzymes (Yang et al., 2009), de 0 à +4% pour les acides gras organiques (Dibner, 2004) et -3 à +12% pour les phytobiotiques (Windisch et al., 2008). Ces fortes variabilités nécessitent le développement de programmes de recherche permettant de connaître les effets réels de ces alternatives et d'élucider leurs mécanismes d'action ; et ce d'autant plus que ces produits entraînent un surcoût non négligeable de l'aliment (2 à 25€/tonne au lieu de 1 à 2 €/tonne pour les AFC (Huyghebaert et al, 2011)).

L'un des mécanismes avancé pour expliquer l'amélioration des performances zootechniques suite à l'ingestion d'AFC est que ces antibiotiques contrôlent les bactéries du microbiote digestif du fait de leurs propriétés antibactériennes (Thomke and Elwinger, 1998b). Un autre mécanisme pourrait être l'action des AFC sur l'immunité et le métabolisme

global des animaux du fait de leurs propriétés anti inflammatoires (Niewold, 2007). Cela suggère qu'une piste pour développer des alternatives efficaces aux AFC est de rechercher des molécules présentant des propriétés antibactériennes et/ou immunomodulatrices. Les phytobiotiques naturels sont des candidats prometteurs car ils sont composés de nombreuses molécules (Bakkali et al., 2008; Wink, 2008) ayant des activités différentes, incluant des propriétés antibactériennes (Cowan, 1999 ; Ceylan and Fung, 2004), des activités antioxydantes (Craig, 1999; Francis et al., 2002), anti-inflammatoires (Cazarolli et al., 2008; Romier et al., 2009) et immunomodulatrices (Craig, 1999; Francis et al., 2002; Spelman et al., 2006; Wink, 2008; Romier et al., 2009). Les activités antibactériennes des phytobiotiques étant portées par de nombreuses molécules, de structures très variées, (Cowan, 1999; Francis et al., 2002; Ceylan and Fung, 2004; Wink, 2008), ces alternatives pourraient agir sur les microorganismes en ciblant différents mécanismes de leur physiologie essentiels à leur survie, limitant ainsi le risque de développement de résistance. En effet la multiplication des cibles au sein d'une cellule bactérienne, impliquerait le développement de mécanismes de résistances spécifiques à chaque cible pour que celle-ci soit capable de résister efficacement aux phytobiotiques employés (Wink, 2008). Enfin, l'utilisation de produits naturels dans l'alimentation des volailles présente l'avantage d'être bien accepté par les consommateurs (Jez et al., 2009). Cela pourrait expliquer que cette alternative soit la plus utilisée au niveau international, selon une récente étude (Raper, 2008)

Cependant, l'effet bénéfique des phytobiotiques sur la croissance des animaux apparaît plus variable que l'effet des AFC (modification de l'efficacité alimentaire de -3 à +13% par les phytobiotiques contre +3 à +5% avec les AFC). Cette variabilité est en partie liée aux variations de compositions des phytobiotiques utilisés en termes de produits actifs, ceux-ci étant rarement précisés dans les différentes études. Le manque de connaissance des conditions précises d'utilisation dans lesquelles ces composés sont efficaces pourrait également contribuer à expliquer ces différences d'efficacité. En particulier, la nature et la quantité des composés utilisés, mais également, la génétique des animaux, la composition des aliments et les conditions d'élevage utilisées dans les différentes études pourraient expliquer la grande variabilité de résultats rapportés concernant l'efficacité des phytobiotiques comme facteurs de croissance. En effet, dans le cas des AFC, la génétique des animaux et les conditions d'élevage modulent leur efficacité (Pietrzak et al., 2006; Ravindran et al., 2006). Il est donc possible que de tels facteurs modulent également l'efficacité des phytobiotiques comme cela a pu être montré pour d'autres alternatives aux AFC (Orban et al., 1997). D'autres études

suggèrent que la composition de l'aliment pourrait également influencer sur l'efficacité de ces alternatives (Jamroz et al., 2005). Les mécanismes par lesquels les phytobiotiques exercent une action bénéfique sur la croissance des animaux restent également mal compris. Dans le cas des phytobiotiques, les travaux de plusieurs équipes montrent une action sur le microbiote digestif (Jamroz et al., 2003; Dieumou et al., 2009). Des effets ont aussi été rapportés sur le statut oxydant des animaux (Brenes et al., 2008; Wang et al., 2008), ainsi que sur leur immunité (Spelman et al., 2006) ou sur la structure et la fonctionnalité de leur tractus digestif (Jang et al., 2007; Malayoglu et al., 2010). Cependant ces effets apparaissent très variables selon les études.

L'objectif de cette thèse a été, pour deux modèles de mélanges de phytobiotiques, d'une part, d'étudier l'influence des conditions d'utilisation de ces alternatives aux AFC sur leur efficacité pour améliorer les performances de croissance des volailles et d'autre part de mieux comprendre leurs mode d'action. Ces études ont été conduites sur des poulets de chair à croissance rapide placés dans différentes conditions post-éclosion et d'élevage. Les modèles de phytobiotiques choisis contenant un grand nombre de molécules portant des effets antibactériens, nous nous sommes focalisés sur l'influence de ces phytobiotiques sur le microbiote digestif des animaux.

Le premier modèle de phytobiotiques étudié consistait en l'utilisation d'un mélange de phytobiotiques (EXVa), composé de molécules aux propriétés majoritairement antibactériennes (*in vitro*). Ce mélange a été administré aux animaux à partir de leur troisième semaine de vie. Bien que dans la majorité des études publiées sur les AFC et leurs alternatives, ceux-ci soient administrés très précocement dans la vie des animaux pour orienter la mise en place de leur microbiote digestif, nous avons choisi une administration plus tardive dans le but de ne pas perturber la mise en place naturelle de ce microbiote, mais de contrôler son évolution. En effet, l'utilisation de composés antimicrobiens chez le très jeune animal pourrait perturber cette mise en place entraînant un effet négatif sur le développement du tractus digestif, comme cela est suggère par des travaux réalisés chez l'homme (Hildebrand et al., 2008). Un second modèle a également été utilisé, consistant à étudier l'effet d'un programme alimentaire commercial basé sur l'utilisation de deux mélanges de phytobiotiques aux propriétés majoritairement antioxydantes et immuno-modulatrices pour le premier (EXVb) et antibactériennes pour le second (EXVa). Le mélange EXVb était administré aux animaux pendant les dix premiers jours de vie. Ensuite le mélange EXVa était administré à une dose légèrement inférieure à celle utilisée dans le modèle expérimental 1 jusqu'à la troisième

semaine d'âge, puis à une dose identique à celle du modèle expérimental 1 jusqu'en fin d'élevage. Ce modèle a été étudié pour stimuler l'immunité des poussins durant leurs premiers jours de vie qui correspondent à une période de développement du tractus digestif et plus particulièrement de son immunité, période durant laquelle une forte mortalité est couramment observée. Après cette phase, l'objectif était de contrôler le développement du microbiote digestif pour favoriser la croissance des animaux.

Deux facteurs de dégradation des conditions d'élevage ont été retenus : les conditions entre l'éclosion des animaux et leur mise en place dans l'élevage (durée, transport) et la densité d'élevage des animaux. Il a en effet été montré que le délai entre l'éclosion et la première alimentation retarde la maturation du tractus digestif et entraîne des retards de croissance qui peuvent perdurer jusqu'à l'âge de commercialisation des animaux (Noy et al., 2001; Batal and Parsons, 2002; Suzuki et al., 2008). Une augmentation de la densité d'élevage est également rapportée comme ayant un effet négatif sur les performances de croissance des animaux (Dozier et al., 2005; Onbasilar et al., 2008; Simsek et al., 2009; Skomorucha et al., 2009). Pour étudier l'interaction entre les conditions d'élevage et l'efficacité des phytobiotiques sur les performances de croissance, les animaux ont été placés dans une première expérience dans des conditions de démarrage d'élevage les plus favorables possibles : incubation de durée minimale (21j), et éclosion sur le même site que l'élevage pour limiter le temps entre l'éclosion et l'accès à l'alimentation et l'eau, ainsi que le stress lié au transport. Les poussins ont été élevés soit en densité d'élevage faible (12 animaux/m²), soit en densité élevée (17 animaux/m²) par rapport à la directive européenne 2007/43/EC applicable depuis juillet 2010 (European Commission, 2007). Dans une seconde expérimentation, les animaux ont été placés dans des conditions plus proches de celles rencontrées en élevage industriel : éclosion en couvoir industriel (après 22j d'incubation), transport des animaux sur plus de 150 km entre le couvoir et le lieu d'élevage, d'où un temps entre l'éclosion et l'accès à l'alimentation plus long et plus variable entre animaux. Les animaux ont ensuite été placés aux deux mêmes densités d'élevage précédemment décrites, 12 et 17 animaux/m². Lors de ces deux expérimentations, les performances de croissance des poulets ont été suivies en fonction des conditions d'élevage des animaux et de leur potentiel de croissance, pour étudier l'influence des conditions d'élevage et de la génétique des animaux sur l'efficacité des phytobiotiques.

Les effets des phytobiotiques sur le microbiote digestif ont été étudiés dans les conditions de mise en place dans lesquelles ils se sont avérés promouvoir le plus efficacement

la croissance des animaux, c'est-à-dire les conditions proches de celles rencontrées en élevage industriel. Ces études ont été réalisées par deux méthodes d'approche indépendantes de la culture, la PCR en temps réel et une technique d'empreinte moléculaire, l'électrophorèse sur gel en gradient de température dans le temps (TTGE). Une étude préalable du microbiote du poulet de chair par TTGE a été conduite pour mieux connaître sa variabilité entre individus et son évolution dans le temps en fonction du site de prélèvement.

Le manuscrit de thèse est structuré en cinq parties :

(1) Une Étude bibliographique qui présente, dans un premier chapitre, un état des lieux des connaissances relatives à la nature des phytobiotiques et à leur utilisation dans l'élevage des volailles. La physiologie digestive du poulet est traitée dans le second chapitre de cette étude bibliographique. Enfin, les connaissances relatives au microbiote bactérien digestif du poulet sont présentées dans le dernier chapitre.

(2) Le Matériels et Méthodes, qui présente les animaux ainsi que le matériel et les techniques utilisés pour la réalisation des études menées dans le cadre de ce travail.

(3) La partie Études expérimentales, qui présente, sous forme d'articles les résultats obtenus concernant les contributions de ce travail de thèse à la connaissance du microbiote du poulet, et à l'effet des phytobiotiques sur les performances de croissance et le microbiote digestif d'animaux placés dans différentes conditions de démarrage et d'élevage.

(4) La partie Discussion générale et Perspectives, qui propose une discussion transversale suite aux différentes expérimentations et concerne la contribution des travaux présentés à la connaissance du microbiote digestif du poulet et à l'utilisation de phytobiotiques comme facteurs de croissance chez les volailles. Elle propose également des travaux complémentaires pour approfondir les connaissances sur les différents sujets abordés.

(5) Enfin la partie Conclusions, qui présente les principales conclusions qui découlent de ce travail d'un point de vue scientifique et appliqué.

Première partie.
Etude Bibliographique

Les objectifs de cette thèse étant d'étudier les effets de mélanges de phytobiotiques sur la croissance et le microbiote digestif du poulet de chair, il nous a semblé nécessaire de présenter l'état des connaissances relatives à ces sujets avant d'exposer les résultats expérimentaux.

Afin de resituer le contexte de la problématique posé dans ce travail de thèse, la première partie de cette étude bibliographique traite des phytobiotiques, de leur utilisation en élevage de volailles et de l'avancement des connaissances relatives à leurs modes d'action.

Ce travail s'intéressant aux effets d'un additif alimentaire sur les performances de croissance des animaux (consommation, efficacité alimentaire, gain de poids), il paraissait important de présenter la physiologie digestive du poulet dans le cadre de ce travail bibliographique.

Enfin, un volet du travail expérimental étant consacré au microbiote digestif des animaux, nous avons choisi d'exposer les connaissances scientifiques relatives à ce domaine dans le dernier chapitre de cette partie bibliographique.

Chapitre 1 - Les Phytobiotiques

Dans ce premier chapitre nous traiterons des phytobiotiques naturels. Nous définirons leur nature et aborderons leurs voies de synthèse et leurs rôles dans les plantes ainsi que les méthodes d'obtention de ces composés. Nous traiterons ensuite de leurs activités biologiques et de leur utilisation dans l'alimentation des volailles. Enfin, les connaissances scientifiques relatives aux principes actifs présents dans les mélanges de phytobiotiques utilisés dans le cadre de la thèse seront exposées.

I. Les Phytobiotiques

1.1 Définitions et grandes familles de molécules

Dans cette partie, seuls seront abordés les extraits de plantes naturels.

Les préparations à base de plantes ou extraits de plantes, portent de nombreuses appellations commerciales incluant phytobiotiques ou phytogéniques entre autre termes. Elles sont généralement définies comme étant des parties de plantes ou leurs extraits incorporés à l'alimentation des animaux de rente afin d'améliorer leur productivité et les qualités des produits alimentaires issus de ces animaux (Windisch et al., 2008).

Sous le terme de phytobiotiques sont regroupés les herbes, les épices, ainsi que les huiles essentielles et les oléorésines, correspondant respectivement aux extraits aqueux et non-aqueux, de composés volatils odorants (Windisch et al., 2008). La plupart des molécules bioactives de ces produits végétaux leur confèrent un goût ou une odeur prononcée. Elles font partie du grand groupe des métabolites secondaires des plantes (Bakkali et al., 2008; Schwab et al., 2008). On entend par métabolites secondaires, des métabolites qui ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse, mais résultent de réactions chimiques ultérieures.

Les métabolites secondaires des plantes regroupent un très grand nombre de composés, plusieurs dizaines de milliers sont déjà connus, mais un grand nombre reste à découvrir, et présentent une diversité structurelle importante. Il existe de nombreuses classifications de ces produits, qui varient selon le domaine d'application. Ils peuvent être

regroupés en fonction de leur structure, de leur voie de synthèse, de leur activité biologique... Ils peuvent notamment être regroupés selon la présence d'azote dans leur composition (Tableau 1). Parmi les familles de molécules contenant de l'azote on retrouve les alcaloïdes, les acides aminés non protéiques (analogues structurels des acides aminés protéiques), les amines, les glycosides cyanogéniques, les glucosinolates, les alkyl-amides, les lectines, peptides et polypeptides. Parmi les familles de molécules ne contenant pas d'azote on trouve les terpénoïdes (monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes, stéroïdes, saponines, tétraterpènes), les flavonoïdes, anthocyanes, catéchines, et tannins, les phénylpropanoïdes, lignines, coumarines et lignanes, les polyacétylènes, acides gras et cires, les polyketides, les glucides et acides simples (Wink, 2003; Acamovic et Brooker, 2005; Wink, 2008). La structure des familles de métabolites les plus abondantes est décrite ci-dessous.

Tableau 1 : Métabolites secondaires des plantes (d'après Wink, 2008)

Types de métabolites secondaires	Estimation du nombre de structures
Métabolites contenant de l'azote	
Alcaloïdes	21000
Lectines, peptides et polypeptides	2000
Acides aminés non protéiques	700
Alkylamides	150
Amines	100
Glucosinolates	100
Glycosides cyanogéniques	60
Métabolites sans azote	
Monoterpènes (C10)	2500
Sesquiterpènes (C15)	5000
Diterpènes (C20)	2500
Triterpènes, stéroïdes, saponines (C30, C27)	5000
Tétraterpènes (C40)	500
Flavonoïdes, anthocyanines, catéchines, tannins	5000
Phénylpropanoïdes, coumarine, lignanes, lignine	2000
Polyacétylènes, acides gras, cires	1500
Polyketides	750
Glucides, acides simples	400

1.1.1. Les métabolites contenant de l'azote

Les dérivés protéiques soufrés et les lectines :

Certains peptides sont issus du métabolisme secondaire des plantes. Ils sont généralement chargés positivement et beaucoup contiennent des ponts disulfures (Cowan, 1999; Ceylan et Fung, 2004).

Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des hétérocycles azotés généralement dérivés d'acides aminés (Cowan, 1999 ; Hounsome et al., 2008).

1.1.2. Les métabolites sans azote

1.1.2.1 Parmi les terpènes, terpénoïdes et saponines

Les terpènes et terpénoïdes :

Les terpènes sont les constituants majoritaires des huiles essentielles. Ils sont formés par l'association d'unités d'isoprène (2-méthylbuta-1,3-diène) qui peuvent subir des modifications enzymatiques. Ils sont classés en familles selon le nombre d'unités isoprènes associées (1 : hemiterpènes ; 2 : monoterpènes ; 3 : sesquiterpènes ; 4 : diterpènes ; 6 : triterpènes ; 8 : tetraterpènes). Les terpénoïdes peuvent être considérés comme des terpènes modifiés, avec des groupes méthyles ajoutés ou enlevés, ou des atomes d'oxygène ajoutés (Cowan, 1999; Bakkali et al., 2008).

Les saponines :

Les saponines sont des glycosides constitués d'une partie glucidique, contenant généralement du glucose, du galactose, de l'acide glucuronique, du rhamnose ou du méthylpentose, liée par une liaison glucidique à un aglycone hydrophobe. Ce dernier peut être un terpénoïde ou un stéroïde (Wink, 2008).

1.1.2.2. Parmi les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des molécules formées à partir d'un ou plusieurs cycles aromatiques porteurs d'une fonction hydroxyle. Cette famille de molécules est elle-même divisée en plusieurs familles de composés :

Les phénylpropanoïdes, quinones et coumarines :

Les phénylpropanoïdes sont dérivés de la phénylalanine, les quinones se caractérisent par la présence de deux substitutions cétone au niveau du cycle aromatique et les coumarines par l'assemblage de cycles benzène et α -pyrones (Cowan, 1999; Wu et al., 2009).

Les flavones, flavonoles et flavonoïdes :

Les flavones sont un ensemble de composés phénoliques portant un groupe carbonyle, ils sont dits flavonols s'ils portent en plus un groupe 3, hydroxyle. Les flavonoïdes sont des flavones hydroxylées et liées par une chaîne en C3 à un cycle aromatique (Cowan, 1999; Cazarolli et al., 2008; Wink, 2008)

Les tanins (ou tannins) :

Les tanins sont un ensemble de polymères phénoliques de poids moléculaire allant de 500 à 30 000 Daltons. Ils peuvent eux-mêmes être classés selon différentes méthodes basées par exemple sur leur structure chimique et leur composition en monomères, ou selon leur solubilité (Serrano et al, 2009).

1.2 Rôle, biosynthèse et répartition dans les plantes

1.2.1. Rôle dans les plantes

En règle générale, ces composés ne sont pas nécessaires à la vie de la plante, mais ils semblent avoir un rôle dans des conditions de pression environnementale forte, en conférant aux plantes des avantages adaptatifs (Schwab et al., 2008).

Les plantes sont des organismes sessiles et donc incapables d'éviter leurs prédateurs, et sans système immunitaire pour assurer leur protection. Les métabolites secondaires participent notamment à leur défense contre des agents biologiques ou physiques et à leur dissémination.

La défense :

Certains métabolites secondaires peuvent affecter un large spectre de cibles, c'est par exemple le cas des saponines qui sont capables de former des pores dans les membranes cellulaires des prédateurs, grâce à leurs propriétés amphiphiles, et sont ainsi toxiques pour les cellules eucaryotes comme les cellules bactériennes. D'autres agissent sur un spectre plus restreint de cibles, par exemple en agissant comme répulsifs de certaines espèces d'herbivores ou de certains organismes pathogènes. D'autres peuvent avoir un effet négatif sur les organismes herbivores en perturbant l'assimilation des nutriments, c'est par exemple le cas des facteurs antinutritionnels comme les tannins ou les lectines. Certains métabolites secondaires miment des composés naturellement présents chez ces organismes herbivores et

perturbent leur fonctionnement. C'est par exemple le cas des alcaloïdes qui peuvent être des agonistes ou des antagonistes des neurotransmetteurs et ainsi avoir un effet négatif sur les herbivores équipés d'un système nerveux. Certains terpénoïdes sont toxiques seulement contre des espèces d'insectes qui ne se sont pas adaptés. Enfin, suite aux blessures engendrées par la prédation d'herbivores, de nombreuses plantes sécrètent des métabolites secondaires qui peuvent avoir un effet défensif indirect, par exemple en attirant des parasites ou des prédateurs de l'organisme herbivore qui les a blessé (Harborne, 2001; Wink, 2003; Schwab et al., 2008; Wink, 2008).

Enfin, certains composés phénoliques interviennent dans la protection de la plante contre des agents physiques tels que les rayons ultra-violets (Wink, 2003).

La dissémination :

D'autres métabolites secondaires servent d'attractants pour les espèces dont sont dépendantes les plantes pour leur pollinisation ou la dispersion de leurs graines. C'est le cas des mono-terpènes des fleurs qui dégagent une odeur attractive pour un grand nombre de pollinisateurs. Il est également à noter que les fruits mûrs ne contiennent que très peu de molécules toxiques, au contraire des fruits verts, et dégagent des odeurs propres à encourager leur consommation, ce qui favorise la dispersion des graines arrivées à maturité (Harborne, 2001; Wink, 2003; Schwab et al., 2008).

1.2.2 Biosynthèse des métabolites secondaires

La synthèse des métabolites secondaires est effectuée à partir de glucides, lipides et acides aminés présents dans la plante, et implique de nombreuses réactions de dégradation, hydrolyse, oxydation et/ou synthèse qui dépendent des classes de métabolites considérées. Ainsi, les plantes produisent à partir des glucides, les furanones et pyrones et indirectement les terpènes. A partir des lipides sont produits des composés aliphatiques portant des groupes fonctionnels organiques tels que les alcools, aldéhydes, cétones, acides carboxyliques, lactone ou esters. Enfin, à partir des acides aminés, les plantes peuvent produire des métabolites secondaires aromatiques, mais aussi d'autres dérivés d'acides aminés azotés, soufrés, ou portant des groupes fonctionnels alcool, aldéhyde, acide ou ester (Schwab et al., 2008).

1.2.3 Répartition dans le règne végétal et dans la plante

La production des métabolites secondaires est souvent liée à des facteurs environnementaux et saisonniers. De plus elle dépend du stade de développement, de la population ou de l'individu. Ainsi, les métabolites secondaires produits par deux plantes de la même espèce, mais cultivés à deux endroits différents pourront varier en abondance et composition; de même que ceux produits par la même plante récoltée deux années différentes (Wink, 2003; Acamovic et Brooker, 2005).

Ils sont présents chez tous les végétaux supérieurs. En règle générale il y a un lien entre phylogénie et métabolites secondaires présent dans une espèce. Cependant de nombreuses exceptions existent où un métabolite est présent dans plusieurs espèces de plantes non apparentées (Wink, 2003).

De nombreux métabolites différents coexistent en concentration variable dans les différents tissus d'une plante, mais leur biosynthèse est généralement organe ou tissu spécifique. Cependant, selon leur activité biologique, ils peuvent être stockés dans toutes les parties de la plante (feuille, fleur, fruit, racine,...). Par exemple certaines molécules impliquées dans la protection contre les herbivores, comme les alcaloïdes, sont directement stockées dans les tissus qui sont consommés. A l'inverse, les composés qui ont un rôle dans l'attraction des pollinisateurs, sont stockés au niveau des fleurs (Acamovic et Brooker, 2005; Schwab et al., 2008).

1.3. Les différents produits : méthodes d'obtention

Les phytobiotiques peuvent être constitués directement de broyat de plantes, mais souvent les molécules actives sont extraites pour obtenir des solutions enrichies en principes actifs : les huiles essentielles.

Les extractions de phytobiotiques sont en grande majorité basées sur l'utilisation de solvant couplée avec l'utilisation de chaleur et/ou avec une agitation. Les principales méthodes sont l'hydro-distillation, la distillation à partir de solvants organiques, et la macération dans des solutions éthanol/eau ou huile chaude. En France l'appellation de ces produits en fonction de leur procédé d'extraction est standardisée par la norme AFNOR NF T75-006 (AFNOR, 1998) qui devrait être révisée en janvier 2012 (Tableau 2). Certaines familles de molécules peuvent être extraites par plusieurs solvants et d'autres ne présentent

d'affinité qu'avec un seul (Tableau 3). Par conséquent, le choix du solvant est de grande importance car l'utilisation de solvants différents entraîne non seulement des rendements d'extraction différents, mais aussi des compositions d'extraits différentes (Cowan, 1999; Baydar et al., 2003; Wang et Weller, 2006).

Tableau 2 : Principales appellations des substances produites à partir de matière premières végétales, en fonction de leurs modes de production (AFNOR, 1998)

Identification	Procédé d'obtention
<i>Matières premières</i>	
Matières premières d'origine naturelle	Matières premières à l'état brut
	Dérivés obtenus par des procédés technologiques 'traditionnels' (extraction, distillation, chauffage, torréfaction, fermentation)
	Dérivés obtenus par traitement enzymatique
Exsudat (inclut les oléorésines, résines, baumes, gommés et exsudat naturels)	Matière première secrétée par les plantes suite à une agression
<i>Produits dérivés résineux</i>	
Résines	Obtenues à partir d'une oléorésine par élimination aussi complète que possible des composés volatils
<i>Produits dérivés volatils</i>	
Huiles essentielles	Obtenues par entraînement à la vapeur d'eau d'une matière première d'origine naturelle
	Obtenues par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe d'un <i>Citrus</i>
	Obtenues par distillation sèche d'une matière première d'origine naturelle
Distillat, alcoolat, hydrolat	Produit de condensation obtenu après distillation d'une matière première d'origine naturelle. Il est qualifié d'alcoolat quand la distillation est faite en présence d'alcool et d'hydrolat quand il s'agit d'un distillat aqueux qui subsiste après entraînement à la vapeur d'eau de l'huile essentielle
<i>Produits d'extraction</i>	
Teinture et infusion	Obtenu après macération d'une matière première d'origine naturelle dans une solution d'éthanol
Extraits (inclut les extraits supercritiques, concrètes, resinoïdes, les oléorésines d'extraction)	Obtenu par traitement d'une matière première d'origine naturelle par un solvant
Extraits non concentrés	Extrait fait grâce à un solvant naturel non éliminé

Tableau 3 : Solvants utilisés pour l'extraction des métabolites secondaires des plantes (d'après Cowan, 1999)

Solvant	Métabolites
Eau	Antocyanes, Amidon, Tannins, Terpénoïdes, Polypeptides, Lectines
Ethanol	Tannins, Polyphénols, Polyacétylènes, Flavonol, Terpénoïdes, Stéroïdes, Alkaloïdes, Propolis
Méthanol	Antocyanes, Terpénoïdes, Saponines, Tannins, Xanthoxylines, Totarol, Quassinoïdes, Lactones, Flavones, Phénols, Polyphénols
Chloroforme	Terpénoïdes, Flavonoïdes
Dichlorométhanol	Terpénoïdes
Ether	Alkaloïdes, Terpénoïdes, Coumarines, Acides gras
Acétone	Flavonols

II. Les principes actifs et utilisation dans l'alimentation des volailles

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction générale, l'interdiction d'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance (AFC) dans l'alimentation animale en Europe, a conduit à l'apparition sur le marché de produits de remplacement. La grande variété des métabolites secondaires des plantes, la grande diversité de leurs activités biologiques, dont les nombreuses propriétés antibactériennes qui leurs sont associées en ont fait de bons candidats potentiels pour remplacer ces antibiotiques. Dans cette section nous évoquerons donc les propriétés biologiques des métabolites secondaires qui ont conduit à les proposer comme phytobiotiques. Nous traiterons ensuite des travaux ayant eu pour but d'étudier leur impact sur les performances zootechniques des volailles.

2.1 Activités biologiques des phytobiotiques

2.1.1 Activités biologiques recherchées dans les phytobiotiques

Un des critères qui doit être pris en compte lors de la sélection de phytobiotiques à destination des volailles est leur bonne acceptabilité par les animaux. De plus, parmi les activités biologiques des métabolites secondaires, certaines ont un intérêt particulier pour en faire des phytobiotiques agissant sur les performances de croissance des volailles : les propriétés antibactériennes, les propriétés de stimulation de la digestion, les propriétés anti oxydantes, et les propriétés anti-inflammatoires.

2.1.1.1. Perception des phytobiotiques

Les nombreux métabolites secondaires qui ont des propriétés odorantes peuvent être perçus par les animaux à qui ils sont destinés. La capacité à les percevoir, et les réactions des animaux à leurs odeurs dépendent à la fois de la molécule et de l'espèce animale considérée. Une odeur perçue comme provenant d'un aliment va préparer le tractus digestif à la prise alimentaire par la stimulation des sécrétions digestives et de la motilité gastrique (Katschinski, 2000; Teff, 2000). Les composés odorants peuvent donc améliorer les performances de croissance des animaux en favorisant leur efficacité digestive.

2.1.1.2. Propriétés antibactériennes :

Les effets antibactériens sont pertinents dans l'optique de développer des alternatives aux AFC. En effet, les mécanismes d'action les plus communément admis concernant l'effet des AFC sont liés à leur propriété antibactérienne. Les propriétés antibactériennes des antibiotiques amélioreraient la croissance de l'hôte en évitant un développement trop important du microbiote, des dysbiosis, et en réduisant le risque de développement de pathogènes. La réduction du microbiote entraînerait une plus grande disponibilité de certains nutriments pour l'hôte. Les bactéries sont capables de dé-conjuguer les sels biliaires, réduisant l'efficacité de digestion des lipides par l'hôte, et sont en concurrence directe avec celui-ci pour certains nutriments (Thomke et Elwinger, 1998; Dibner et Richards, 2005). Enfin, en limitant le développement du microbiote, ils réduiraient les réponses immunitaires, coûteuses en énergie, qui lui sont associées (Humphrey et Klasing, 2004). L'action des AFC sur le microbiote pourrait expliquer que des animaux axéniques aient une croissance plus rapide que les animaux conventionnels (Furuse et Okumura, 1994) et soient insensibles à l'action des AFC (Coates et al., 1963; Forbes et Park, 19589). Cela pourrait également expliquer leur plus grande efficacité dans des conditions d'élevage dégradées d'un point de vue sanitaire (Lillie et al., 1953; Forbes et Park, 1958). Le contrôle du microbiote par les AFC pourrait également éviter un développement anormal de celui-ci. D'autres molécules possédant des propriétés antibactériennes, tels les phytobiotiques, pourraient donc améliorer les performances de croissances des animaux par des mécanismes similaires.

Un effet inhibiteur de la croissance bactérienne a été montré *in vitro* pour de nombreux phytobiotiques. L'intensité de l'effet dépend à la fois de la bactérie ciblée, du phytobiotique utilisé et de la dose d'application. De nombreux mécanismes détaillés plus loin pourraient entrer en jeu, selon la structure et les propriétés chimiques de la molécule utilisée. (Cowan, 1999; Ceylan et Fung, 2004 ; Wink, 2008). Les propriétés antibactériennes des métabolites secondaires pourraient également contribuer à améliorer l'hygiène de l'aliment donné aux animaux, réduisant les risques de contamination de ceux-ci par des pathogènes présents dans l'aliment, ce qui entraînerait un effet bénéfique indirect sur leur croissance (Windisch et al., 2008).

La majorité des grandes familles de molécules décrites précédemment ont montré des propriétés antibactériennes, les mécanismes d'action principaux de ces molécules sont décrits dans le tableau 4.

Dérivés protéiques et lectines

Les dérivés protéiques soufrés pourraient exercer leur activité antibactérienne par la formation de canaux ioniques dans les membranes bactériennes. Les lectines pourraient exercer leur action par l'inhibition compétitive de l'adhésion des bactéries à leur récepteurs polysaccharidiques car elles ont la capacité d'interagir avec les polysaccharides (Cowan, 1999; Ceylan et Fung, 2004). Cependant cette propriété peut engendrer de forts effets anti-nutritionnels, rendant difficile leur utilisation comme facteur de croissance.

Alcaloïdes

Les alcaloïdes ont des propriétés antibactériennes qui sont probablement liées à leur capacité à intercaler l'ADN. De ce fait un certain nombre d'entre eux sont toxiques pour les cellules eucaryotes et ne peuvent être utilisés comme phytobiotiques (Cowan, 1999 ; Hounsome et al., 2008).

Terpènes et terpénoïdes

Les terpènes et terpénoïdes possèdent des propriétés antibactériennes et anti parasitaires. Ils semblent agir sur les **membranes** bactériennes en les perméabilisant. De plus les différences d'efficacité de ces molécules pour limiter la croissance bactérienne pourraient venir de leur capacité à lier l'hydrogène (Cowan, 1999; Griffin et al., 1999; Ceylan et Fung, 2004; Bakkali et al., 2008). Ils sont donc de bons candidats pour être utilisés comme phytobiotiques.

Les saponines

Les saponines ont de nombreuses activités biologiques, notamment des propriétés antimicrobiennes venant de leur capacité à déstructurer les membranes bactériennes. En effet, ce sont de puissants détergents dont la partie aglycone peut pénétrer dans les membranes et interagir avec les stérols, principalement le cholestérol tandis que la partie glucidique, à l'extérieur, peut interagir avec d'autres glucides, glycoprotéines ou glycolipides, ce qui perturbe la perméabilité membranaire. Certaines saponines présentent des activités anti-nutritionnelles qui doivent être prises en compte pour leur utilisation comme phytobiotiques. L'activité biologique des saponines dépend du type de molécules, or celles-ci sont très nombreuses et variables selon les plantes (Francis et al., 2002; Westendrap, 2005 ; Wink, 2008).

Composés phénoliques

De nombreux composés phénoliques possèdent des propriétés antibactériennes qui semblent généralement liées à leur capacité à se complexer de manière aspécifique avec de nombreuses protéines, entraînant leur inactivation et souvent leur précipitation (Ceylan et Fung, 2004). Parmi les phénols et acides phénoliques, les activités antimicrobiennes semblent plus importantes dans les molécules les plus oxydées (Ceylan et Fung, 2004).

Les tannins ont la capacité d'interagir avec les protéines et de les co-précipiter à un pH neutre, d'interagir avec les polysaccharides, de complexer certains ions tels que le fer. Ils exercent leur propriété antibactérienne par leur capacité à se complexer à des protéines et donc à inhiber certaines enzymes bactériennes extracellulaires. Leur capacité à complexer les protéines, mais également les sucres et les minéraux, peut également réduire la disponibilité de certains substrats et minéraux indispensables à la croissance bactérienne. Cependant leur capacité à se lier aux protéines en fait, dans certaines conditions, des agents antinutritionnels car ils peuvent inhiber les enzymes du tractus digestif (Haslam, 1995; Cowan, 1999; Serrano et al., 2009) et réduire la disponibilité pour l'hôte de certaines protéines alimentaires et minéraux. Cela implique de limiter leur concentration dans l'aliment pour ne pas perturber la croissance de l'animal à cause de leurs effets anti nutritionnels.

Tableau 4 : Familles de molécules présentant une activité antibactérienne et mécanismes d'action (modifié d'après Cowan, 1999)

Famille de composé	Sous famille	Mécanisme d'action
Dérivés protéiques	Dérivés soufrés	Formation de canaux ioniques dans les membranes via la formation de pont disulfures
	Lectines	Inhibition compétitive de l'adhésion des bactéries à leurs récepteurs polysaccharidiques
	Alcaloïdes	Intercalent l'ADN
Terpènes, terpénoïdes et saponines	Terpènes et terpénoïdes	Perméabilisation des membranes bactériennes
	Saponines	Perméabilisation des membranes bactériennes
Composés phénoliques	Phénols simples et acides phénoliques	Formation de complexes avec de nombreuses protéines, déstructuration des membranes bactériennes, indisponibilité de certains substrats pour les bactéries
	Quinones	Inactivation de protéines membranaires
	Flavones, flavonoles et flavonoïdes	Liaisons aux adhésines, liaisons aux parois cellulaires, inactivation d'enzymes
	Tannins	Liaisons à différentes protéines : adhésines, enzymes, substrat, paroi cellulaire, membrane. Formation de complexes avec les minéraux

2.1.1.3. Propriétés de stimulation de la digestion

De nombreux produits végétaux sont reconnus pour leurs actions bénéfiques sur la digestion. Des travaux ont pu mettre en évidence chez plusieurs espèces animales une stimulation des sécrétions gastriques et biliaires lors de l'ingestion de certains phytobiotiques. Les enzymes pancréatiques et les enzymes intestinales telles que la lipase, l'amylase, la trypsine, la chymotrypsine, la sucrase, la lactase ou la maltase peuvent par exemple être stimulées chez le rat, ces actions dépendant de l'extrait de plante utilisé. Par exemple, chez le rat, le curcuma stimule les enzymes digestives alors que la menthe a un effet globalement inhibiteur (Platel et Srinivasan, 2004).

2.1.1.4. Propriétés anti-oxydantes :

Les propriétés anti-oxydantes des métabolites secondaires présentent un intérêt dans la conservation des aliments destinés aux animaux (Brenes et Roura, 2010). Elles pourraient également permettre d'améliorer le statut oxydant des animaux qui a un impact à la fois sur leur santé et la qualité de leur viande (Brenes et Roura, 2010). Les processus métaboliques conduisant à la production de radicaux libres, et donc à une dégradation du statut antioxydant, sont amplifiés en condition de stress. Il a par exemple été observé que des pratiques d'élevage intensif, telles qu'une densité d'élevage élevée ou une température excessive pour les volailles, augmentaient leur stress oxydant (Simsek et al., 2009). De plus, il a été montré que les animaux sélectionnés pour leur vitesse de croissance, comme les souches de poulets de chair à croissance rapide, souffrent d'un stress oxydatif important (Nain et al., 2008). Ainsi les métabolites secondaires présentant des propriétés anti oxydantes sont des candidats prometteurs pour le développement de phytobiotiques réduisant le stress oxydatif subi par les animaux, et donc les conséquences négatives sur leur croissance. Ces molécules agissent également sur la qualité des produits issus de l'exploitation des animaux de rente, en conduisant à la production d'une viande moins oxydée (Brenes et Roura, 2010).

Ces propriétés sont portées par de nombreuses familles de molécules capables de capturer des radicaux libres, grâce à leur structure.

Alcaloïdes

Certains alcaloïdes de la famille des Benzylisoquinolines sont capables de capturer les radicaux libres (Potterat, 1997).

Composés phénoliques

La plupart des composés phénoliques présente une action anti oxydante. Cette activité semble liée à leur structure, un cycle aromatique porteur d'un groupement hydroxyle, qui les rend capables de capturer les radicaux libres (Haslam, 1995., Potterat 1997 ; Cazarolli et al., 2008 ; Hounsoume et al., 2008 ; Serrano et al., 2009).

Terpénoïdes

Certains terpénoïdes ont également des propriétés anti oxydantes qui ne sont pas dues à leur squelette terpénique mais à ses substituants, par exemple des groupements phénols ou des fonctions quinones (Potterat, 1997).

2.1.1.5. Propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices :

L'utilisation d'anti-inflammatoires pourrait jouer sur l'utilisation des nutriments par l'hôte. En effet, une réaction inflammatoire a un coût énergétique pour l'animal, au détriment de sa croissance (Humphrey et Klasing, 2004). Il a été suggéré que le mode d'action des AFC soit lié à leurs propriétés anti-inflammatoires. De nombreuses études ayant montré que certains métabolites secondaires ont des propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices (voir Spelman et al 2006 pour revue), les phytobiotiques sont de bon candidats pour le développement d'alternatives aux AFC.

Ces fonctions anti-inflammatoires peuvent être portées par différentes familles de molécules, principalement certains alcaloïdes (Hounsoume et al., 2008; Gautam et Jachak, 2009), terpénoïdes (Gautam et Jachak, 2009) et de nombreuses classes de composés phénoliques (Haslam, 1995.; Gautam et Jachak, 2009 ; Serrano et al., 2009).

2.1.2 Synergie et antagonismes des principes actifs

Comme décrit précédemment, les extraits végétaux naturels sont composés de très nombreuses molécules ayant des structures et des activités biologiques très différentes. Ces molécules peuvent avoir un effet additif, voire même synergique et cela explique que les effets observés pour un extrait végétal soient généralement supérieurs à ceux observés pour ses composants pris individuellement (Dorman et Deans, 2000; Chang et al., 2001). Ces effets peuvent s'expliquer par le fait que les molécules présentes dans un extrait peuvent avoir des effets biologiques différents. Par exemple, en ce qui concerne les synergies, l'association d'une molécule lipophile ciblant un composé intracellulaire et d'une molécule bloquant un

transporteur, pourrait augmenter l'efficacité de la première en diminuant son élimination par le transporteur. De même le passage de la membrane par des phytobiotiques polaires peut être facilité par la présence d'autres composés comme les saponines (Wink, 2008).

Bien que plus rarement rapporté, un effet antagoniste de ces différentes molécules peut être observé, en particulier lors de l'utilisation conjointe de phytobiotiques issus de plusieurs plantes (Platel et Srinivasan, 2004).

Compte tenu de ces différentes interactions qui peuvent avoir lieu entre composants actifs, il est difficile de prédire l'action d'un mélange à partir des actions de ses différents constituants.

2.2 Utilisation dans l'alimentation des volailles et effet sur l'animal et ses produits

L'utilisation de phytobiotiques en alimentation animale ne peut être envisagée que dans le cas de produits dont le coût n'engendre pas une hausse trop importante du prix de l'aliment. C'est par exemple le cas de phytobiotiques qui sont le sous-produit d'autres productions.

L'introduction de l'utilisation de phytobiotiques en alimentation animale a été effectuée en combinant des observations issues de la phytothérapie 'traditionnelle' particulièrement importantes dans certaines régions du monde (Chine, Afrique, Amérique du sud, ...), et la phytothérapie 'rationnelle' basée sur des observations scientifiques.

Les phytobiotiques sont utilisés chez la volaille, mais aussi chez d'autres animaux de rente, notamment chez le porc et les ruminants, mais ces aspects ne seront pas présentés dans cette étude bibliographique (pour revue voir Jouany et Morgavi, 2007 ; Windish et al., 2008). Par la suite nous nous focaliserons sur l'utilisation des phytobiotiques en tant que facteurs de croissance chez les volailles.

Concernant les volailles, les phytobiotiques sont généralement incorporés dans l'aliment, mais ils peuvent également être incorporés dans l'eau de boisson. Ils sont couramment employés chez les volailles de chair pour améliorer les performances de croissance, ainsi que la qualité et la conservation de la viande (Windisch et al., 2008; Brenes

et Roura, 2010). Cependant les phytobiotiques sont aussi utilisés en production de ponte pour l'amélioration des performances zootechniques des animaux et de la qualité des œufs.

2.2.1. Effet sur les performances de croissance :

De très nombreux travaux sont effectués dans ce domaine depuis une dizaine d'années (Figure 1), une partie non négligeable d'entre eux ne sont présentés que dans des congrès scientifiques. Il n'existe actuellement, à notre connaissance, que deux méta-analyses publiées faisant le bilan de l'impact des phytobiotiques sur la croissance des animaux (Bravo et al., 2008 ; Alleman et al., 2010), mais quelques revues ont été publiées (Windisch et al., 2008; Brenes et Roura, 2010). Une analyse de la littérature concernant l'effet des phytobiotiques comme facteur de croissance chez les poulets de chair et les autres types de volailles est présentée dans le tableau 5. Elle a été faite à partir d'articles référencés dans la base de données Easy Web of Science, parus entre 2003 et 2010. Les articles retenus portaient sur l'utilisation de phytobiotiques issus d'une seule espèce de plante, celle-ci étant caractérisée. De plus, n'ont été retenus que les articles dans lesquels un témoin négatif, sans facteur de croissance, a été utilisé. Enfin, pour tous les articles cités, les phytobiotiques étaient administrés par incorporation dans l'aliment des animaux.

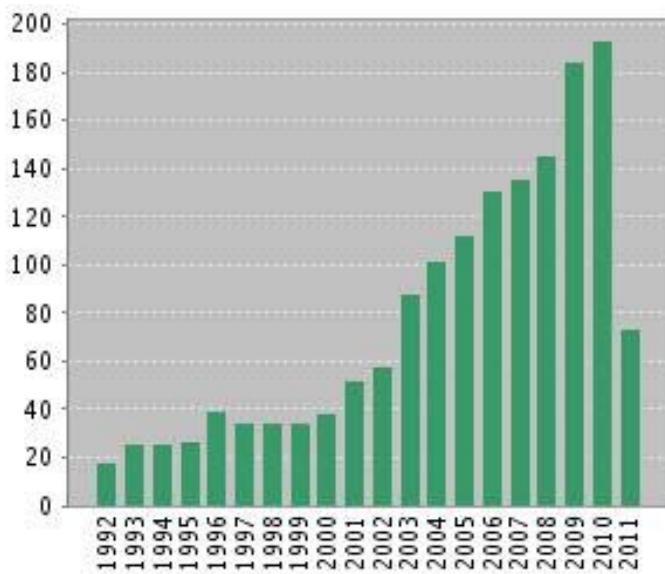


Figure 1 : Evolution du nombre de publications sur l'impact des phytobiotiques sur les performances de croissance des volailles. Nombre de publication recensées par an entre 1992 et 2011 dans la base de donnée scientifique Web of Knowledge (all databases) en croisant les termes « plant extract* OR herb* OR spice* OR essential oil* OR phytobiotic* » avec « Poultry OR broiler* OR chicken* » et « growth OR feed intake OR ADFI OR feed conversion ratio OR FCR OR feed efficiency OR weight gain OR DWG ».

Tableau 5: Effet des phytobiotiques sur les performances de croissance du poulet (A), des autres volailles (B)

Poulets		Dose (g/kg)	Effet par rapport au témoin (%)				Références
			Conso ¹	Poids	GP ²	IC ³	
Broyat	Ail	1	-5	-5		+0	Sarica et al., 2005
		1	+1		+12	-10	Ashayerizadeh et al., 2009
		5	-3	+13	+14	-15	Mahmood et al., 2009
		10	-2	+7	+8	-9	Mahmood et al., 2009
	Curcuma	2.5	+0	+5	+5	-8	Al-Sultan, 2003
		5	-5	+10	+10	-16	Al-Sultan, 2003
		10	+0	+3	+3	-6	Al-Sultan, 2003
	<i>Forsythia suspens</i>	100	+4		+9	-4	Wang et al., 2008b
	Marjolaine	10	+1	+4	+4	-2	Cross et al., 2007
	Menthe	1	+0		+8	-7	Ashayerizadeh et al., 2009
	Millefeuille	10	+5	+9	+9	-4	Cross et al., 2007
	Nigelle	1	+0		+26	-20	Ashayerizadeh et al., 2009
		5	-3	+9	+10	-12	Mahmood et al., 2009
		10	-1	+3	+4	-3	Mahmood et al., 2009
	Origan	5	+5		+7	-2	Florou-Paneri et al., 2006
		10	-15	-11	-13	-3	Cross et al., 2007
	Raisin (peau + pépins)	5	+1		+0	+1	Goñi et al., 2007
		15	+0		-1	+0	Goñi et al., 2007
		30	+2		+3	-2	Goñi et al., 2007
	Romarin	10	+2	+1	+1	+1	Cross et al., 2007
	Thym	1	+1	+2		-1	Sarica et al., 2005
		10	-2	-5	-6	+4	Cross et al., 2007
	Huile Essentielle	Cannelle	0.1	+2		+5	-3
0.1			-2		-3	+0	Lee et al., 2003
		0.2	+4		+13	-8	Al-Kassie, 2009
Marjolaine		1	+4	+5	+6	-1	Cross et al., 2007
Millefeuille		1	-8	-12	-13	+7	Cross et al., 2007
Origan		0.15	-6		-2	-4	Basmacioglu et al., 2004
		0.25	+4		+3	+0	Malayoglu et al., 2010
		0.3	-3		+1	-2	Basmacioglu et al., 2004
		0.5	-3		+3	-8	Malayoglu et al., 2010
		1	-10	-6	-7	-1	Cross et al., 2007
		3	+0	+2	+2	-2	Fotea et al., 2010
		7	+2	+4	+4	-2	Fotea et al., 2010
Romarin		10	+0	+5	+5	-4	Fotea et al., 2010
		0.15	+0		-1	-1	Basmacioglu et al., 2004
		0.3	-2		+1	-4	Basmacioglu et al., 2004
		1	-16	-9	-10	-8	Cross et al., 2007
		5	+3	+8	+8	-5	Ghazalah et Ali, 2008
		10	+3	+6	+7	-3	Ghazalah et Ali, 2008
		20	+2	+3	+3	-1	Ghazalah et Ali, 2008
Thym		0.1	+1		+3	-2	Al-Kassie, 2009
		0.2	+5		+13	-7	Al-Kassie, 2009
		1	+11	+13	+14	-2	Cross et al., 2007
<i>Zataria multiflora boisis</i>		15	-4	-6		+4	Langeroudi et al., 2008
<i>Ziziphora clinopodioides</i>	15	+0	+1		+2	Langeroudi et al., 2008	

		Effet par rapport au témoin (%)						
		Dose (g/kg)	Conso ¹	Poids	GP ²	IC ³	Référence	
Poules pondeuses								
Broyat	Eucalyptus	1	+0	+0		-1	El-Motaal et al., 2008	
	Eucalyptus	2	-1	+1		-2	El-Motaal et al., 2008	
	Eucalyptus	3	-5	+1		-9	El-Motaal et al., 2008	
Graine	Nigelle	10	+4	+6		+2	Aydin et al., 2008	
	Nigelle	20	+3	+3		+3	Aydin et al., 2008	
	Nigelle	30	+2	+4		-6	Aydin et al., 2008	
Huile Essentielle	Thym	5	+2		+13	-5	Radwan et al., 2008	
	Thym	10	+5		+22	-7	Radwan et al., 2008	
	Origan	5	+3		+14	-3	Radwan et al., 2008	
	Origan	10	+2		+28	-9	Radwan et al., 2008	
	Romarin	5	+4		+13	-3	Radwan et al., 2008	
	Romarin	10	+3		+28	-7	Radwan et al., 2008	
	Curcuma	5	+3		+21	-8	Radwan et al., 2008	
	Curcuma	10	+2		+23	-8	Radwan et al., 2008	
	Cailles							
	Broyat	Coriandre	5	+3		+1	+1	Güler et al., 2005
Coriandre		10	+3		+5	-1	Güler et al., 2005	
Coriandre		20	+4		+8	-4	Güler et al., 2005	
Coriandre		40	+5		+4	+1	Güler et al., 2005	
Rooibos		3.5		+1			Jurani et al., 2008	
Huile Essentielle	Nigelle	0.06	+1		+2		Denli et al., 2004	
	Thym	0.06	+0		+6		Denli et al., 2004	
Dindes								
Broyat	Origan	1.25	-2	+2			Bampidis et al., 2005	
	Origan	2.5	-6	+1			Bampidis et al., 2005	
	Origan	3.75	-9	+1			Bampidis et al., 2005	

¹Consommation

²Gain de poids

³Indice de consommation

Ce bilan permet de mettre en évidence que chez les poulets de chair, l'effet des phytobiotiques est très variable d'une étude à l'autre. Concernant la consommation, une modification de -16% à +11% (moyenne -0,6% écart-type +4,9%) a été observée par rapport aux traitements alimentaires témoins. Les poids et gains de poids sont modifiés de -12% à +13% (moyenne +2,2% écart-type +6,9%) et de -13% à +26% (moyenne +3,8% écart-type +7,5%) respectivement. Enfin l'indice de consommation est modifié de -20% à +7% (moyenne -3,7% écart-type +5,2%) (Tableau 5A). Pour la plupart de ces phytobiotiques il semble y avoir un effet de la dose d'administration dans la réponse des animaux, bien que cet effet dose ne soit pas de même nature pour tous les phytobiotiques. Ainsi, Mahmood et al., (2009) montrent une amélioration de l'indice de consommation plus importante quand un broyat d'ail est donné aux animaux à une dose de 5g/kg que de 10g/kg, alors que Malayoglu et al., (2010) observent l'inverse avec des extraits d'origan administrés à 0.25 ou 0.5 g/kg. De

plus, pour un extrait provenant d'une même plante et donné à la même dose, les résultats peuvent être différents voir opposés entre deux études. C'est le cas par exemple de l'huile essentielle de cannelle qui, donnée à 0.1g/kg améliore les performances de croissances dans l'étude de Al-Kassie, (2009) et les détériore dans l'étude de Lee et al., (2003).

Concernant la poule pondeuse, le tableau de synthèse bibliographique a également permis de mettre en évidence une variabilité de l'effet des phytobiotiques sur les performances de croissance. La consommation est modifiée de -5% à +5% (moyenne +2%, écart-type +2,5%) et le FCR de +3% à -9% (moyenne -4,5%, écart-type +3,9%). L'efficacité des phytobiotiques est liée à la dose d'administration à condition de ne pas dépasser un seuil de toxicité pour l'animal (Tableau 5B).

Concernant les dindes, peu d'études ont été menées en utilisant des extraits provenant d'une seule plante (Tableau 5B). Cependant il a été rapporté que des phytobiotiques provenant de mélanges de plantes peuvent avoir un effet bénéfique sur leurs performances de croissance (Alcicek et al., 2003; Mikulski et al., 2008).

Enfin, les phytobiotiques peuvent également avoir une influence positive, bien que variable, sur les performances de croissance des cailles. Le tableau de synthèse permet de mettre en évidence que leur consommation est augmentée de 0% à 5%, leur gain de poids de 1% à 8% (moyenne 4,3% écart-type 2,6%) et leur indice de consommation est modifié de -4% à +1% (moyenne -0,75% écart-type 2,4%) (Tableau 5B).

2.2.2. Effet sur la qualité de la viande :

Concernant l'amélioration des caractéristiques de la viande par les phytobiotiques, ceux-ci sont susceptibles d'intervenir sur les caractéristiques des carcasses (état d'engraissement, développement des muscles), la susceptibilité de la viande à s'oxyder durant sa conservation et ses caractéristiques organoleptiques ainsi que sur la qualité bactériologique de la viande.

L'effet des phytobiotiques sur la qualité des carcasses varie également selon les études et la nature des phytobiotiques considérés. Ainsi Garcia et al., (2007) ne montrent pas d'effet des phytobiotiques en utilisant deux mélanges contenant des huiles essentielles d'origan, de

cannelle et de poivre ou des extraits hydro-alcooliques de sauge, romarin et thym. De même que Radwan et al., (2008) ne montrent pas d'effet des huiles essentielles de thym, d'origan et de curcuma sur la qualité des carcasses et de la viande de poule. A l'inverse, pour d'autres produits un effet bénéfique peut être observé. El-Ghousein et Al-Beitawi, (2009) montrent un effet positif d'une inclusion de 1,5% et 2% de thym séché sur la qualité des carcasses de poulets mâles et femelles. A la dose de 2%, le rendement des carcasses des femelles augmente de 3,2% et celui des carcasses de mâles de 3,8%, ce qui se traduit dans les deux cas par une augmentation du rendement en cuisses, ailes et filets.

Les phytobiotiques ajoutés à l'alimentation des animaux semblent être capables de réduire l'oxydation des lipides de la viande de volaille stockée à 4°C ou à -20°C, bien que moins efficacement que les antioxydants synthétiques ou l' α -tocophérol (forme active de la vitamine E). De plus ces effets dépendent de la dose d'administration, les doses les plus importantes étant généralement les plus efficaces, à condition qu'elles restent inférieures au seuil de toxicité (Botsoglu et al., 2003; Goñi et al., 2007; Smet et al., 2008; Bostoglu et al., 2010 ; Luna et al., 2010).

Peu d'études ont porté sur la qualité organoleptique de la viande à la suite de l'introduction de phytobiotiques dans l'alimentation des animaux. Toutefois, il a été rapporté une amélioration de cette qualité par certains phytobiotiques (Al-Sultan, 2003; Simsek et al., 2007; Thieme et Ladbrook, 2010), ce qui n'est pas généralisable à tous (Toghyani et al., 2011).

2.2.3. Production et qualité des œufs :

La production d'œuf peut être modifiée par des phytobiotiques. Par exemple, Radwan et al., (2008) ont montré que les huiles essentielles de thym, d'origan et de curcuma permettent d'augmenter la production d'œuf de poule. Jurani et al., (2008), ont quant à eux montré une amélioration de la production d'œufs de cailles par le biais d'un ralentissement de la chute d'intensité de ponte en fin de production.

Les extraits de plantes peuvent également être utilisés comme source naturelle de caroténoïdes (Karadas et al., 2006) pour la pigmentation des œufs.

Certaines huiles essentielles comme les huiles essentielles de thym, d'origan et de curcuma permettent d'augmenter le poids des œufs (Radwan et al., 2008). Elles peuvent

également améliorer leur statut oxydant durant des conservations de plus de 15j (Radwan et al., 2008).

2.3 Facteurs de variation de l'efficacité des phytobiotiques

Nous avons pu voir dans le paragraphe précédent que l'efficacité des phytobiotiques est très variable d'une étude à l'autre. Cette variabilité s'explique en partie par une grande variabilité des conditions d'étude en termes de produits testés, animaux utilisés, régimes administrés ou conditions d'élevage appliquées. Or ces différents paramètres peuvent avoir une influence sur l'efficacité des phytobiotiques.

2.3.1 Les phytobiotiques et leur mode de présentation

L'origine du phytobiotique peut contribuer à expliquer cette variabilité. En effet comme nous l'avons évoqué en début de cette partie consacrée aux phytobiotiques, la nature et la concentration des principes actifs présents dans une plante sont fortement soumises à sa génétique et à son environnement. Cela peut contribuer à expliquer pourquoi avec des produits végétaux (broyats, huiles essentielles), issus de la même plante et administrés à la même dose, des résultats différents peuvent être observés.

De plus le mode de préparation des phytobiotiques, broyats vs extraits, intervient sur la composition du produit et module son efficacité (Cross et al., 2007). Dans le cas des extraits de plantes, la méthode d'extraction des phytobiotiques intervient également en jouant sur leur composition ainsi que sur leur efficacité *in vitro* et probablement *in vivo* (Baydar et al., 2003).

La dose d'administration du phytobiotique joue également un rôle variable dans son efficacité (Tableau 5A et 5B). Ainsi, selon les phytobiotiques, il a été observé une efficacité décroissant avec l'augmentation de la dose, ou une efficacité croissante avec l'augmentation de la dose (Güler et al., 2005; Goñi et al., 2007; Ghazalah et Ali, 2008). Dans certains cas, cet effet dose est accompagné d'un effet seuil au-dessus duquel on observe un effet négatif.

Il a également été observé que le mode d'administration des phytobiotiques, inclusion dans l'eau ou inclusion dans l'aliment, peut moduler leur efficacité (Jurani et al., 2008).

2.3.2 L'animal

De la même façon que l'efficacité des AFC dépend de la génétique des animaux (Nordskog et Johnson, 1953 ; Pietrzak et al., 2006), il est possible qu'il en soit de même pour les phytobiotiques, bien qu'à notre connaissance aucune étude sur le sujet n'ait été publiée.

L'âge des animaux a aussi son importance. Ainsi des effets différents selon l'âge des animaux sont rapportés. Alors que Cao et al (2010) rapportent un effet bénéfique plus important au cours de la période de démarrage, d'autres travaux rapportent un effet négatif sur la croissance lors de l'utilisation de phytomolécules à action antimicrobienne dès le début de l'alimentation des poussins (Recoquilly, Com. Pers.).

L'âge des reproducteurs semble, d'après Cabuk et al., (2006), avoir un effet sur la sensibilité de leur descendance aux phytobiotiques ; ceux-ci étant plus efficace chez des animaux issus de jeunes reproducteurs.

2.3.3 L'aliment

2.3.3.1 Fabrication et stockage

Les phytobiotiques étant constitués de nombreux composés volatils, ils peuvent être affectés par des traitements thermiques trop intenses tels que ceux qui ont lieu lors de la fabrication des aliments pour volailles, si celle-ci n'est pas adaptée.

Le temps de stockage peut également avoir un effet car les composants des huiles essentielles sont très volatils. Par exemple Westendarp et al (2006) ont montré qu'entre le début et la fin d'une étude de 35 j chez le poulet, les teneurs dans l'aliment ont baissé de façon variable selon les composants.

2.3.3.2 Composition

La composition de l'aliment ou la présence d'autres additifs peut avoir une influence sur l'efficacité des phytobiotiques. Ainsi, Jamroz et al., (2005) ont montré que l'utilisation d'un mélange d'extrait végétal contenant du carvacrol, du cinnamaldéhyde et de la capsaïcine est plus efficace chez des animaux nourris avec un régime à base de maïs qu'avec un régime à base de blé et orge. De même Amehra et al., (2011) ont montré une interaction entre administration d'huile essentielles et forme de distribution du blé sur le gain de poids

des animaux. Cela pourrait venir des interactions entre phytobiotiques et matrice alimentaire. Ainsi, Lalles et al, (2009) formulent l'hypothèse que certains composés des huiles essentielles comme les composés phénoliques se lient aux composés hydrophobes de l'aliment, ce qui expliquerait l'absence d'effet antibactérien de certaines huiles essentielles *in vivo* alors qu'elles sont efficaces *in vitro* en milieux de culture (comme dans le cas de l'étude de Si et al (2006)).

Concernant la présence d'autres facteurs de croissance dans l'aliment, il a été observé que l'utilisation d'un mélange d'enzymes peut renforcer l'efficacité de l'huile essentielle d'origan (Malayoglu et al., 2010). De même, les huiles essentielles ont des effets synergiques avec les acides organiques sur la santé et les performances des animaux (Peris et Asensio, 2002). Ceci permet de réduire le taux d'incorporation de ces huiles dont les doses efficaces sont relativement élevées, et donc de réduire le coût.

2.3.4 Conditions d'élevage

Une plus grande efficacité des AFC et d'autre types de facteurs de croissance a été montrée dans des conditions d'élevage dégradées ou de plus forte pression sanitaire (Lillie et al., 1953; Orban et al., 1997 ; Postollec et al., 2007). Le même phénomène pourrait avoir lieu avec les phytobiotiques comme le suggère l'observation d'une plus grande efficacité d'un extrait végétal en présence de coccidies (Allen et al., 1997 ; Lee et al., 2004).

2.4 Mécanismes d'action *in vivo*

Bien que différentes actions biologiques des phytobiotiques aient été montrées (développées dans le paragraphe 2.1 de ce chapitre), les mécanismes par lesquels ils agissent *in vivo* pour améliorer les performances de croissance des animaux ne sont pas clairement élucidés. Les mécanismes d'actions les plus probables sont récapitulés dans la figure 2, chacun d'entre eux n'étant pas impliqué pour toutes les molécules.

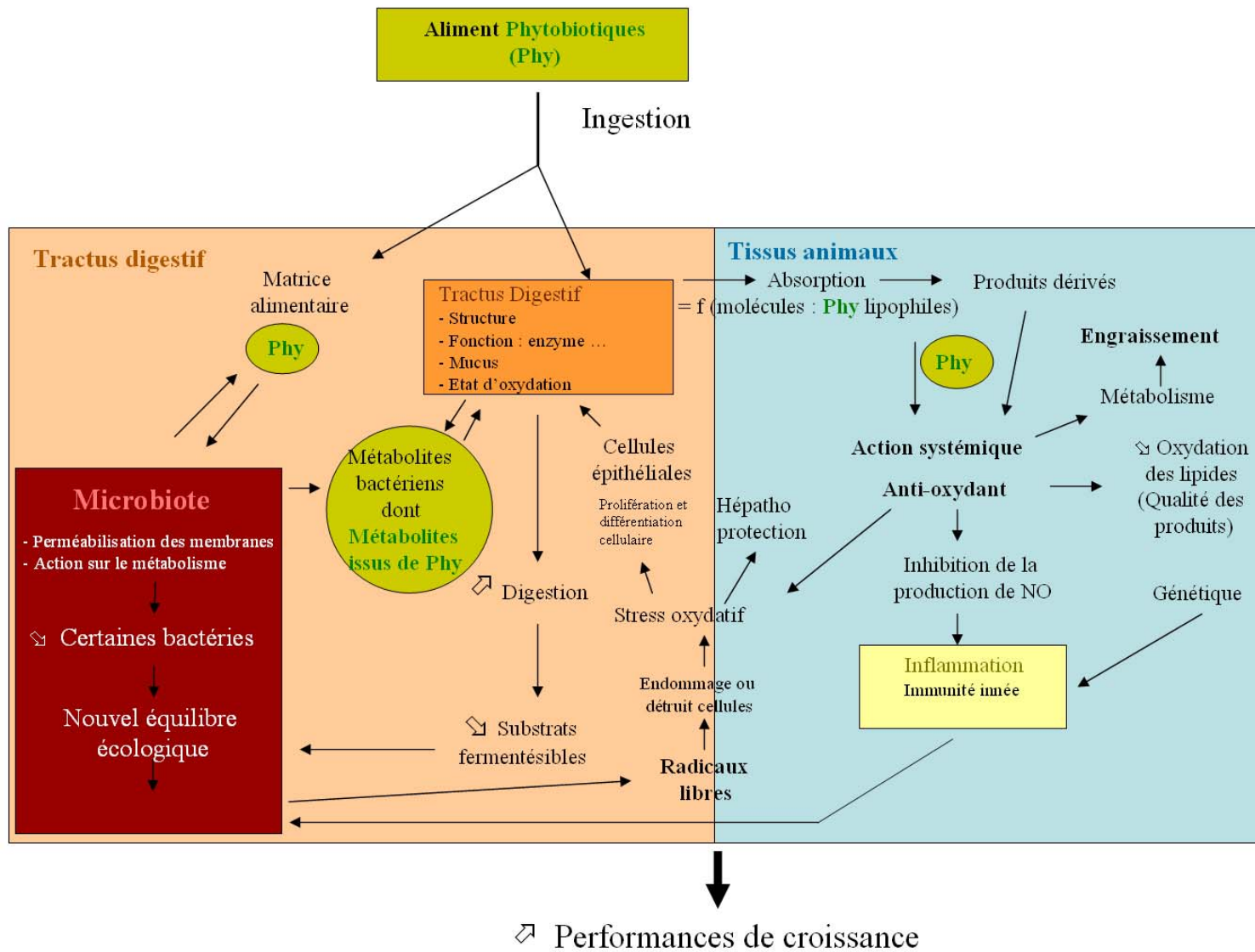


Figure 2 : Mécanismes d'actions principaux possibles des phytobiotiques

2.4.1 Devenir après ingestion : Présence dans les contenus digestifs, absorption, métabolisme et biodisponibilité des phytobiotiques

Le devenir des phytobiotiques une fois ingéré (pharmacocinétique) est relativement peu documenté, du fait de la complexité des extraits composés de très nombreuses molécules, et du manque de connaissances des principes actifs. Les analyses existantes ont principalement été réalisées chez l'Homme ou les rongeurs, ainsi que quelques rares études chez les animaux d'élevage, mais à notre connaissance, il n'existe pas d'étude disponible chez l'oiseau. Or il peut exister des différences entre espèces animales concernant la pharmacocinétique et pharmacodynamique des molécules, en particulier leur métabolisme (Toutain et al, 2010).

Après ingestion, les molécules composant les phytobiotiques se retrouvent dans la lumière de la partie supérieure de l'appareil digestif, du jabot à la fin de l'intestin grêle. Elles peuvent subir des modifications par le microbiote bien que probablement réduites dans cette partie antérieure du tractus digestif, mais aussi agir sur ce microbiote. Lors de leur absorption par l'épithélium digestif, ces molécules peuvent être métabolisées au niveau des entérocytes. Après passage dans la circulation porte, elles peuvent être modifiées au niveau du foie si elles ont une forte affinité pour les hépatocytes et les enzymes hépatiques, puis elles atteignent la circulation générale. La fraction des molécules qui atteint cette circulation par rapport à la quantité ingérée, correspond à la biodisponibilité. Pour les molécules de phytobiotiques qui ne sont pas absorbées, elles peuvent alors être évacuées avec les contenus digestifs dans la partie inférieure du tractus digestif (Figure 3)

Dans les cas des oiseaux, ces molécules peuvent remonter dans les contenus de caeca par les mouvements de rétro péristaltisme entre le cloaque et les caeca, où elles peuvent comme leurs molécules de départ être modifiées par le microbiote et agir dessus.

Il a été montré que les composant des huiles essentielles, du fait de leur propriété lipophile, sont en partie rapidement absorbées dans l'estomac et la partie supérieure de l'intestin grêle (Westendarp, 2005 ; Michiels et al, 2008), métabolisées et éliminées par les reins sous forme de glucuronides ou de sulfates ou exhalées sous forme de CO₂ (Takada et al, 1979 ; Kohlert et al., 2000, 2002 ; Sharma et al, 2007). Le devenir des phytobiotiques dépend en partie de leur composition.

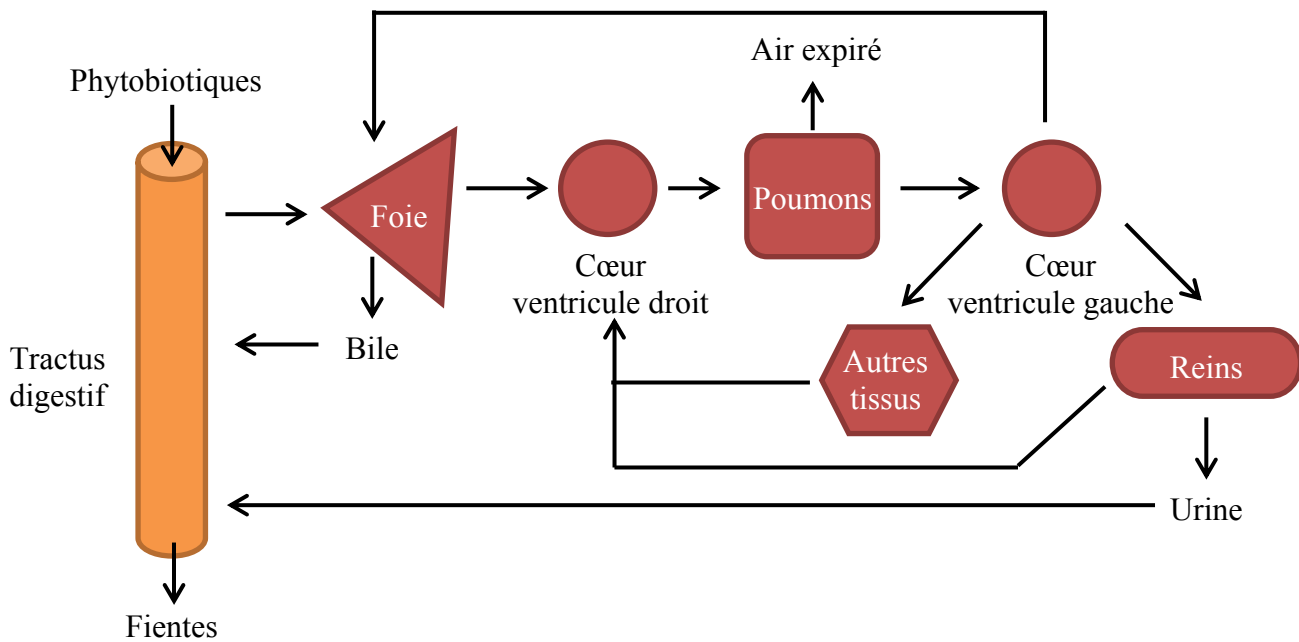


Figure 3 : Trajet d'une molécule de phytobiotique

(adapté d'après le trajet d'un médicament administré par voie buccale,

<http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output/Pharmacocinetiquea5.php>)

Le degré de polymérisation des tannins pourraient avoir un rôle majeur dans leur devenir chez l'animal (Serrano et al, 2009). Ainsi les tannins de faible poids moléculaire sont absorbés, alors que ceux de haut poids moléculaire présentent une faible absorption et un métabolisme limité par le microbiote. Pour les proanthocyanines, il semble que les oligomères puissent être absorbés, alors que la biodisponibilité des polymères soit limitée. Les propriétés de solubilité de ces molécules influent aussi sur leur absorption comme ceci a été observé dans une étude effectuée chez le poulet montrant que les proanthocyanines solubles dans l'eau et l'éthanol sont absorbées et se retrouvent dans le plasma et tous les tissus, alors que les proanthocyanines insolubles dans l'eau et l'éthanol, ne sont pas disponibles (Jimenez-Ramsey et al., 1994). Concernant les tannins hydrolysables, ils semblent être hydrolysés en leurs monomères dans l'intestin grêle (Serrano et al, 2009). Les tannins qui atteignent la partie inférieure du tractus digestif peuvent alors être métabolisés par les bactéries présentes (Serrano et al., 2009).

Concernant les flavonoïdes, ils nécessitent d'être déglycosylés pour être absorbés par l'intestin et exercer leur activité chez l'hôte (Walle, 2004). Ceci peut être effectué par les glycosidases intestinales ou bactériennes, sachant que les premières ne sont actives que sur les

monoglucosides, alors que les secondes sont actives sur une grande variété de diglycosides. Chez l'Homme ce sont des bactéries des genres *Eubacterium* et *Bacteroides* qui ont été rapportées comme ayant des activités d'hydrolyse des diglycosides. Chez le poulet, Iqbal et Zhu (2009a et b) ont mis en évidence dans les caeca, des bactéries du genre *Lactobacillus* capables d'hydrolyser ces molécules. Cependant cette hydrolyse dépend du type de flavonoïdes. Ainsi ces bactéries sont capables d'hydrolyser l'hespéridine et la rutine, mais pas la naringine.

A notre connaissance aucune information n'est aujourd'hui disponible chez l'oiseau pour les autres classes de molécules traitées précédemment.

Les différentes molécules de phytobiotiques non absorbées par l'hôte, et métabolisées par les bactéries conduisent alors à des composés qui peuvent devenir absorbables et être plus actifs que les molécules initiales (Rechner et al., 2004; Aura, 2008; Jacobs et al., 2009; Selma et al., 2009).

2.4.2 Action sur le microbiote digestif

Plusieurs études ont été menées pour déterminer si l'effet facteur de croissance des phytobiotiques est lié à des modifications du microbiote digestif. Cependant les résultats restent ambigus et dépendent fortement des phytobiotiques considérés, et de leur dose d'utilisation. Ainsi une modification du microbiote digestif peut être observée en parallèle d'une amélioration des performances de croissance, comme dans le cas de l'étude de Kumar et al., (2010) montrant une diminution des salmonelles présentes dans les contenus intestinaux chez des animaux dont le poids à 42j avait été amélioré par l'ingestion d'ail. Une modification du microbiote digestif peut être observée, sans que la croissance des animaux n'ait été modifiée comme montré par Dieumou et al., (2009) avec des extraits d'ail ou de gingembre. Enfin, un effet bénéfique sur la croissance peut également être observé sans conséquences sur le microbiote digestif comme montré par Cross et al., (2007) avec de l'huile essentielle de thym.

Le manque d'effet observé sur le microbiote digestif par rapport aux effets observés *in vitro* pourrait être dû à plusieurs facteurs. Les études *in vitro* utilisent des concentrations nettement supérieures à celles utilisées *in vivo* et les milieux biologiques complexes des contenus digestifs sont différents des milieux *in vitro*. Ainsi certains composants alimentaires

réduiraient l'efficacité des composés antimicrobiens. Les teneurs élevées en lipides et /ou protéines protégeraient les bactéries de l'action des huiles essentielles (Aureli et al, 1992 ; Pandit et Shelef, 1994 ; Tassou et al, 1995). Gill et al (2002) suggèrent que la plus grande disponibilité de nutriments dans les aliments par rapport aux milieux de culture *in vitro* pourrait permettre aux bactéries de réparer plus rapidement les dégâts causés par ces molécules.

2.4.3 Action sur le tractus digestif

Des modifications au niveau du tractus digestif et une amélioration des fonctions intestinales sont parfois rapportées suite à l'ingestion de phytobiotiques. Une augmentation des sécrétions enzymatiques digestives ou de la longueur de l'intestin ont pu être observées suite à l'ingestion de thym, d'huile essentielle d'origan, et de mélanges commerciaux d'huiles essentielles contenant du thymol (Jang et al., 2007; El-Ghousein et Al-Beitawi, 2009; Malayoglu et al., 2010). Une amélioration de la digestibilité des protéines ou de l'amidon a pu être observée suite à l'ingestion de *Forsythia suspensa*, d'huile essentielle d'origan, et de mélanges contenant plusieurs huiles essentielles (origan, cannelle et poivre) ou d'extraits (sauge thym et romarin) (Hernández et al., 2004; Wang et al., 2008a; Malayoglu et al., 2010). Cependant, comme les autres mécanismes d'actions observés *in vivo*, les effets sur le tractus digestif et la digestion ne peuvent être généralisés à tous les phytobiotiques, certaines études n'ayant mis en évidence aucun effet (Cross et al., 2007).

2.4.4 Action sur le statut oxydant

Les phytobiotiques peuvent être employés pour réduire l'oxydation des lipides lors de la conservation de la viande (voir paragraphe 2.2.2), leurs propriétés anti oxydantes pourraient également avoir un rôle bénéfique dans la réduction des composés oxygénés réactifs générés chez les animaux de lignées sélectionnées pour leur rapidité de croissance ou élevés dans des conditions générant un stress oxydant important, comme les fortes densités ou les températures élevées (Nain et al., 2008; Simsek et al., 2009). Ainsi, l'utilisation de *Fosythia suspensa* provoque une augmentation de la capacité anti oxydante dans le sérum de poulets élevés en condition de température élevée (32°C) en même temps que de meilleures performances de croissance (Wang et al., 2008a). La modification des capacités anti oxydantes peut également être détectée dans les digesta d'animaux nourris avec des extraits de pépins et de peau de raisin (Brenes et al., 2008).

2.4.5 Action sur l'immunité

Une méta-analyse a pu mettre en évidence les capacités immunomodulatrices de nombreux phytobiotiques (Spelman et al., 2006). Ainsi il a pu être montré *in vitro* comme *in vivo* la capacité de nombreux phytobiotiques dont l'ail et le curcuma à moduler la sécrétion des cytokines et à influencer indirectement l'état d'inflammation en diminuant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

2.4.6. Action sur le métabolisme protéique et énergétique

Des effets bénéfiques de phytobiotiques ont été rapportés sur le métabolisme azoté. Ainsi, Osman et al, (2010) ont observé une meilleure efficacité protéique avec de la marjolaine ou du basilic, et Cao et al (2010) ont observé une amélioration de la rétention azotée avec un mélange commercial de substances actives. Cependant d'autres études ne montrent pas d'effet, comme celle de Westendarp et al, (2006) ou de Jeroch et al, (2009).

Des effets ont aussi été rapportés sur le métabolisme énergétique. Ainsi des travaux ont montré une augmentation de l'énergie métabolisable avec des préparations commerciales (Cao et al, 2010 ; Bravo et al, 2011). Cependant certaines études n'observent pas d'effet (Barreto et al, 2008 ; Jeroch et al, 2009), voir même des effets négatifs (Osman et al, 2010).

III. Les phytobiotiques utilisés au cours de ce travail de thèse

Dans le cadre de cette thèse, deux mélanges de phytobiotiques ont été utilisés. Un premier mélange contenait des huiles essentielles d'eucalyptus, de cannelle et d'ail ainsi qu'un broyat d'ail ; il sera appelé EXVa dans la suite du document. Le second mélange contenait des extraits d'uncaria, d'eleuthérocoque, de curcuma et de pépins de raisins ainsi que de la naringine ; il sera appelé EXVb dans la suite du document. Dans cette section nous allons présenter les principaux composants et activités biologiques de ces différents extraits de plantes pouvant avoir un effet sur la croissance du poulet.

3.1 Eucalyptus

L'huile essentielle utilisée est extraite à partir de feuilles d'*Eucalyptus globulus* dont le nom commun est gommier bleu. Il s'agit d'une plante de la famille des Myrtaceae, originaire d'Australie mais intensément cultivée en Asie, Afrique et Europe pour la production d'huiles essentielles (3728 tonnes produites en 1993 pour les espèces d'eucalyptus productrices de

cinéole dont *Eucalyptus globulus*, (Schwab et al., 2008)). L'huile essentielle de cette plante est principalement composée de 1,8 cinéole (plus de 50%) et de α -pinène (environ 5%), mais d'autres composés peuvent être détectés en proportion non négligeable (0,2 à 5%) comme le limonène, le β -pinène ou l' α -pinéol, etc... Leur présence et abondance dépend des plans et période de prélèvement des feuilles participant à la fabrication de l'huile (Silvestre et al., 1997; Cimanga et al., 2002).

Un effet antibactérien *in vitro* de l'huile essentielle d'*Eucalyptus* a été documenté par de nombreux travaux (Smith-Palmer et al., 1998; Cowan, 1999; 2002; Cimanga et al., 2002; Ceylan et Fung, 2004). Un effet sur l'immunité de poulets de chair et de poules pondeuses lors de l'administration d'huile essentielle ou de poudre de feuilles d'*Eucalyptus* dans l'aliment a également été observé (El-Motaal et al., 2008; Awaad et al., 2010).

3.2 Cannelle

L'huile essentielle de cannelle est produite à partir de l'écorce intérieure de *Cinnamomum zelanicum* (ou *Cinnamomum verum*) de la famille des Lauraceae et originaire du Sri Lanka. Cette plante est largement utilisée comme épice à travers le monde. Elle est principalement composée de cinnamaldéhyde (plus de 75%). On retrouve également de l'eugénol, du linalol, du 1,8 cinéole, de l'acétate dans des proportions variant généralement entre 1 et 5% ainsi que d'autres composants en proportion plus faible (Baseri et al., 2010).

Des études *in vitro* ont mis en évidence les propriétés antibactériennes des huiles essentielles de cannelle (Smith-Palmer et al., 1998; Cowan, 1999; Chang et al., 2001; Ceylan et Fung, 2004). Un effet de mélanges d'extraits végétaux contenant de l'huile essentielle de cannelle ou un effet du cynamaldéhyde ont été observés sur le microbiote digestif du porc (Manzanilla et al., 2004; Castillo et al., 2006 ; Micheils et al., 2009) et du mouton (Ohene-Adjei et al., 2007). Un mélange de cynamaldéhyde et de thymol tend à augmenter la richesse du microbiote de l'iléon de poulet (Amerah et al., 2011). Un effet positif sur les performances de croissance ou l'efficacité de digestion du poulet a également été décrit avec de l'huile essentielle de cannelle (Hernández et al., 2004; Al-Kassie, 2009; Ciftci et al., 2009 ; Toghyani et al., 2011) ou un mélange de cynamaldéhyde et de thymol (Amerah et al., 2011). Mais l'huile essentielle de cannelle est également rapportée ne pas avoir d'effets par d'autres auteurs (Najafi et Torki, 2010).

3.3 Aïl

L'huile essentielle et le broyat d'ail proviennent du bulbe de la plante *Allium sativum* de la famille des Alliaceae. C'est cette espèce d'ail qui est cultivé et utilisée comme aromate en cuisine. Les composants principaux de l'huile essentielle d'ail sont les disulfures, trisulfures et tetrasulfures de diallyle méthylés ou non (Velisek et al., 1997; Dieumou et al., 2009). Le broyat d'ail contient majoritairement de l'allicine, issu de la transformation enzymatique par l'alliinase de l'alliine (Velisek et al., 1997).

Les huiles essentielles d'ail ont été rapportées avoir des propriétés antibactériennes *in vitro* (Naganawa et al., 1996; Smith-Palmer et al., 1998; 1999; Cowan, 1999; Ross et al., 2001; Ceylan et Fung, 2004). Elles semblent capables d'entraîner des modifications du microbiote digestif du poulet, de la vache et du porc (Castillo et al., 2006; Wanapat et al., 2008; Dieumou et al., 2009; Kırkpınar et al., 2010, Kumar et al., 2010). Des modifications au niveau du tractus digestif, caractérisées par une réduction de la profondeur des cryptes, une augmentation de la taille des villosités et une augmentation des sécrétions biliaires et des sécrétions d'enzymes digestives ont également été observées (Platel et Srinivasan, 2004; Demir et al., 2005 ; Abdullah et al., 2010). L'ail a également des propriétés anti-cholestérol qui ont été montrées aussi bien au niveau du sérum ou des œufs de poule ou de caille qu'au niveau de la viande de poulet (Konjufca et al., 1997; 1999; Chowdhury et al., 2002; Yalcin et al., 2007). Enfin, les propriétés facteur de croissance des extraits d'ail ont été montrées dans plusieurs expérimentations (Lewis et al., 2003; Mahmood et al., 2009; Kumar et al., 2010 ; Toghyani et al., 2011) mais ne sont pas systématiquement rapportées (Sarica et al., 2005; Ashayerizadeh et al., 2009, Kırkpınar et al., 2010).

3.4 Uncaria

Les extraits d'Uncaria sont obtenus à partir de l'écorce de la liane *Uncaria tomentosa* de la famille des Rubiaceae. Cette plante provient de la région du fleuve Amazone en Amérique du sud où elle est communément appelée griffe de chat (uña de gato). Elle est couramment utilisée dans la médecine traditionnelle des peuples d'Amérique du sud pour traiter diverses infections et maladies inflammatoires (Valerio Jr et Gonzales, 2005).

Les extraits d'Uncaria contiennent principalement de nombreux alcaloïdes dont une part importante d'uncarines, mais la composition de ceux-ci change de manière importante au

cours des saisons et cycles de vie de la plante (Heitzman et al., 2005; Valerio Jr et Gonzales, 2005).

Les extraits de cette plante ont montré un effet immunostimulant (Heitzman et al., 2005; Valerio Jr et Gonzales, 2005). Ils exercent également une activité anti-inflammatoire par l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires (Sandoval et al., 2002; Heitzman et al., 2005; Valerio Jr et Gonzales, 2005; Spelman et al., 2006) et par leurs propriétés antioxydantes elles-mêmes liées à leur capacité à capturer les radicaux libres (Sandoval et al., 2002; Goncalves et al., 2005; Heitzman et al., 2005; Valerio Jr et Gonzales, 2005; Amaral et al., 2009). A notre connaissance aucune étude n'a été menée concernant l'utilisation de cette plante dans l'alimentation des volailles, ou plus généralement celle des animaux de rente.

3.5 Eleuthérocoque

Les extraits d'eleuthérocoques proviennent de la racine de la plante *Eleutherococcus senticosus*. Cet arbuste de la famille des Araliaceae provient de Sibérie, où il est communément appelé ginseng sibérien. Les principaux constituants extraits à partir des racines sont des saponines appelées Eleuthérosides, les principaux étant l'eleuthérosides B (syringine) et le E ((-) syringaresinol di-O- β - D-glucoside) (Deyama et al., 2001; Harkey et al., 2001; 2006).

Cette plante est utilisée dans les médecines populaires asiatiques. Des effets bénéfiques sur des sujets soumis à des stress généraux, comme la fatigue, ont pu être montrés (Davydov et Krikorian, 2000; Deyama et al., 2001; 2006). Les extraits de cette plante présentent également des propriétés anti oxydantes, anti-inflammatoires et immunostimulantes (Davydov et Krikorian, 2000; Deyama et al., 2001; 2006) qui ont pu être mise en évidence *in vitro* et *in vivo* notamment chez la souris. L'acide caféique qui peut être retrouvé dans les extraits a des propriétés anti bactériennes (Davydov et Krikorian, 2000). Des extraits d'eleuthérocoques ont également été administrés à des animaux de rente. Chez le porc, une modification du microbiote a pu être observée, associée à une modification de la morphologie intestinale, c'est-à-dire, une augmentation de la taille des villosités et une réduction de la profondeur des cryptes (Fang et al., 2009). Chez le poulet, aucun effet sur les performances de croissance n'a été observé, mais l'addition de 1% d'extrait à l'aliment a permis une augmentation de la taille de la bourse de Fabricius (DeYing et al., 2004).

3.6 Curcuma

Les extraits de curcuma sont obtenus à partir du Rhizome de *Curcuma longa* de la famille des Zingiberaceae. C'est une plante originaire du sud de l'Asie et dont le nom commun est safran des Indes. La poudre obtenue à partir du rhizome est beaucoup utilisée comme épice et comme teinture jaune orangée. Le curcuma est également utilisé en médecine traditionnelle africaine et asiatique, et les possibilités d'utilisation de la curcumine, son composant principal, dans le traitement par la médecine moderne de nombreuses maladies, est très étudiée (Sharma et al, 2007 ; Hatcher et al., 2008).

Les extraits de curcuma sont principalement composés de curcumine (diféruoylméthane) et de ses analogues la déméthoxycurcumine et la bis-déméthoxycurcumine (Araujo et Leon, 2001; Epstein et al., 2010).

Le curcuma possède de nombreuses activités, principalement des activités antibactériennes, anti oxydantes, anti-inflammatoires, et immunomodulatrices. Ces activités semblent être largement dues aux curcumines. Elles ont pu être observées *in vitro* mais également sur des modèles animaux et humains, bien qu'avec une plus grande variabilité de résultats (Araujo et Leon, 2001; Jayaprakasha et al., 2005; Spelman et al., 2006; Hatcher et al., 2008; Epstein et al., 2010). L'utilisation de curcuma dans l'alimentation des poulets a permis de mettre en évidence une amélioration des performances de croissance, particulièrement dans des conditions d'élevage défavorables pour les animaux, comme une température élevée (38°C pendant 3 jours toutes les semaines), la présence d'aflatoxine dans leur aliment (1mg/kg d'aflatoxine B1), ou une infection par des coccidies (*Eimeria acervulina*) (Al-Sultan, 2003; Gowda et al., 2009; Ali et al., 2010; Lee et al., 2010). Cette amélioration de la croissance s'est accompagnée d'une réduction de la température corporelle dans le cas d'un stress thermique. Une augmentation de la capacité anti oxydante et une réduction de l'oxydation des lipides ont pu être observées avec des différences très importantes dans le cas des poulets confrontés à l'aflatoxine B1 (Gowda et al., 2009). Une stimulation de l'expression des gènes des cellules hépatiques associée aux activités anti oxydantes ainsi qu'une inhibition de l'expression du gène codant pour l'interleukine 6 ont été observées chez les mêmes animaux, les protégeant partiellement des effets de l'aflatoxine (Yarru et al., 2009). Chez le rat, suite à l'ingestion de curcuma, une augmentation des sécrétions biliaires ainsi que des enzymes digestives pancréatiques et intestinales a été

observée et pourrait contribuer à expliquer l'amélioration de l'efficacité digestive observée par ailleurs (Platel et Srinivasan, 2001; Platel et Srinivasan, 2004).

3.7 Extraits de pépins de raisin

Les extraits de pépins de raisin proviennent du fruit de *Vitis vinifera* de la famille des Vitaceae. C'est la principale espèce de vigne cultivée dans le monde.

Les composés principaux des extraits de pépins de raisins sont des polyphénols, principalement dérivés du flavan-3-ol (catéchinesépicatechines, procyanidines et proanthocyanidines) et dépendent fortement du cultivar considéré (Fulefi et Ricardo da Silva, 1997; Nassiri-Asl et Hosseinzadeh, 2009).

Les extraits de pépins de raisins ont des activités, anti-inflammatoire, et antibactériennes (Nassiri-Asl et Hosseinzadeh, 2009; Xia et al., 2010). Des études menées chez le poulet ont permis de montrer *in vivo* l'effet antioxydant des extraits de pépins de raisins. Chez ces animaux, une augmentation de l'activité anti oxydante a pu être observée dans les digesta de l'iléon, dans les excréta, et dans le sérum, ainsi qu'une réduction de l'oxydation des lipides dans les produits réfrigérés (viande et viande hachée) ou congelés (Goni et al., 2007; Brenes et al., 2008; Sayago-Ayerdi et al., 2009). Cependant ces modifications n'ont pas été accompagnées de modification des performances de croissance. Des études visant à évaluer l'effet protecteur de ces extraits lors d'une infection par des coccidies montrent des résultats contrastés. Ainsi Naidoo et al. (2008) n'ont pas montré d'effet bénéfique alors que Wang et al., (2008b) ont montré une réduction du stress oxydatif associé à l'infection, une réduction des lésions et une amélioration des performances de croissance. Une étude menée chez le rat a quant à elle montré une modification des activités bactériennes dans le caecum (Goni, 2004).

3.8 Naringine

La naringine est un flavonoïde extrait du mésocarpe de pamplemousse (*Citrus paradisi* de la famille des Rutaceae).

Elle est rapportée avoir une activité anti oxydante bien que légère (Benavente-Garcia et Castillo, 2008; Cavia-Saiz et al., 2010). Son effet anti oxydant a été montré *in vivo* chez le lapin, par une stimulation des gènes liés aux activités anti oxydantes et par une augmentation

des activités enzymatiques associées (Jeon et al., 2001) ainsi que chez la souris, par son efficacité à réduire la production de NO lors d'un choc endotoxique (Kanno et al., 2006). Elle permet également de réduire le taux de cholestérol chez le poulet (da Silva et al., 2001). A notre connaissance elle n'a jamais été testée comme facteur de croissance chez les animaux de rente monogastriques.

Résumé

En résumé, les phytobiotiques sont des métabolites secondaires de plantes utilisés en alimentation animale pour améliorer les performances de croissance des animaux et la qualité de leurs produits. Les phytobiotiques regroupent une vaste gamme de molécules (terpènes, polyphénols, alcaloïdes...) possédant de très nombreuses activités biologiques (anti oxydantes, anti-inflammatoires, antibactériennes,...) qui peuvent être renforcées par des synergies entre ces différents composés.

Les études portant sur l'utilisation de phytobiotiques comme facteur de croissance pour les volailles montrent des effets variables en fonction des phytobiotiques utilisés et de leur dose d'administration, de l'alimentation des animaux, de leur génétique, et de leur condition d'élevage. Les mécanismes d'action par lesquels ces molécules permettent d'améliorer la croissance des animaux sont mal connus, mais il semblerait que des modifications du microbiote, de la morphologie et de la physiologie du tractus digestif et du statut antioxydant de l'animal soient impliquées.

Dans le cadre de cette thèse, deux mélanges de phytobiotiques ont été utilisés (EXVa et EXVb). Le mélange EXVa contenait des huiles essentielles d'eucalyptus, de cannelle et d'ail ainsi qu'un broyat d'ail. L'effet biologique principal décrit pour ces composés est antibactérien. Le mélange EXVb contenait des extraits d'uncaria, d'eleuthérocoque, de curcumin, de pépins de raisins ainsi que de la naringine. Les activités biologiques principales de ces extraits de plantes, rapportées dans la littérature, sont anti oxydantes, immuno-modulatrices et anti-inflammatoires.

Chapitre 2 - Physiologie digestive du poulet

Dans ce second chapitre nous traiterons de la physiologie de la digestion chez le poulet. Nous présenterons l'organisation anatomique du tractus digestif et de ses tissus. Nous aborderons son fonctionnement, en particulier le transit digestif, les sécrétions digestives, l'hydrolyse des constituants alimentaires et endogènes, et l'absorption des nutriments. Enfin, nous nous intéresserons aux paramètres physico-chimiques du tractus digestif.

Dans la mesure du possible et sans autre précision, les données présentées proviennent de travaux réalisés chez le poulet, mais en l'absence d'informations disponibles dans la littérature, des observations faites chez d'autres oiseaux ou chez des mammifères monogastriques peuvent être rapportées.

L'anatomie et la fonctionnalité du tractus digestif évolue au cours de la croissance de l'animal (Noy et al., 2001; Batal et Parsons, 2002; Suzuki et al., 2008), et peuvent être modulées par de nombreux facteurs, comme la génétique de l'animal ou son alimentation (Rougière, 2010). De plus, le temps entre éclosion et première alimentation a un impact sur le développement du tractus digestif. En effet, un retard dans l'accès à l'aliment et à l'eau entraîne un retard de maturation du tractus digestif (Noy et al., 2001; Batal et Parsons, 2002; Suzuki et al., 2008). Or, en conditions industrielles les poussins peuvent subir un jeûne pouvant aller jusqu'à 72h qui s'explique par le temps passé par les poussins au couvoir entre leur éclosion et leur sortie de l'éclosoir, au temps nécessaire pour leur sexage, leur vaccinations et leur convoyage jusqu'au lieu d'élevage. Nous avons donc choisi de présenter des résultats moyens portant sur des animaux en fin de croissance.

I. Les organes de la digestion

Dans cette partie, l'anatomie du tractus digestif, le rôle des différents organes, ainsi que certaines de leurs caractéristiques histologiques seront présentées. L'anatomie du tractus digestif du poulet est illustrée par la Figure 4.

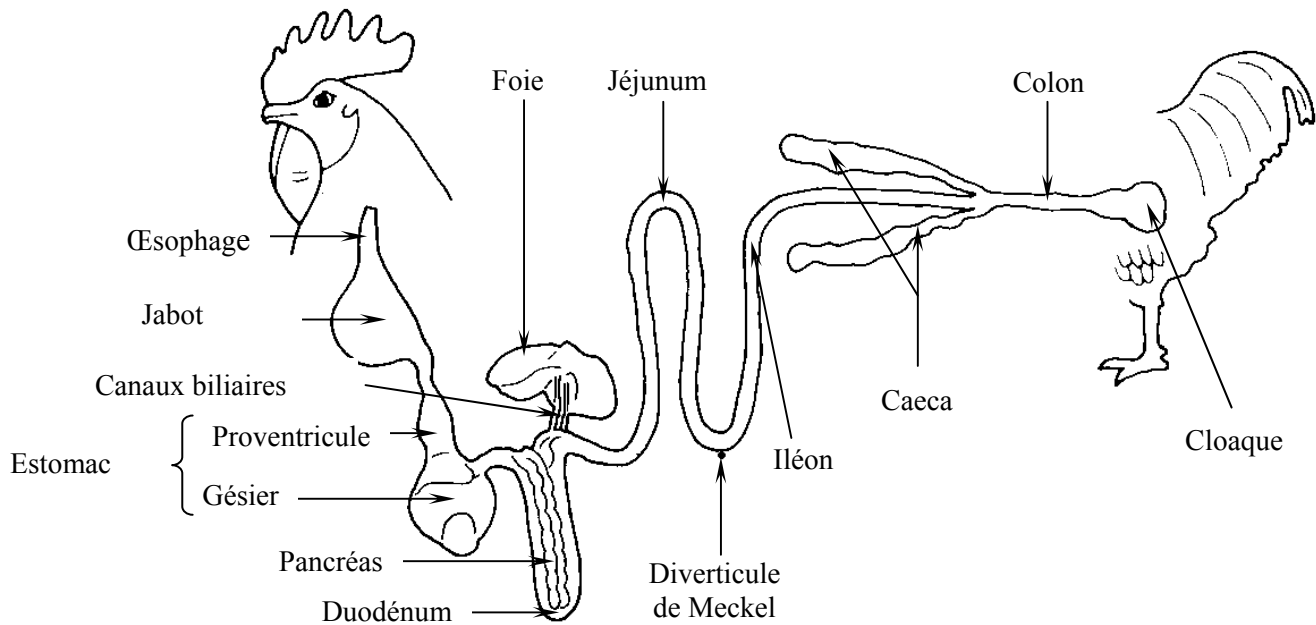


Figure 4 : Le tractus digestif du poulet
(modifié d'après Moran, 1982)

1.1 Du bec au jabot

Le tractus digestif du poulet débute par le bec qui permet la préhension de l'aliment. Ensuite celui-ci est dirigé vers la bouche où la salive permet sa lubrification. Celle-ci est sécrétée par de nombreuses glandes salivaires présentes dans la cavité buccale (Hodges, 1974).

Des récepteurs gustatifs sont présents au niveau de la langue. De plus, le poulet possède de nombreux récepteurs tactiles au niveau du bec, et un système de perception des odeurs très développé (Gomez et Celi, 2008). La perception de l'odeur de l'aliment prépare le tractus digestif à l'alimentation (Brenes et Roura, 2010). La langue permet également de diriger l'aliment dans l'œsophage sans mastication préalable (Klasing, 1998a; Denbow, 1999).

L'aliment est ensuite transféré de l'œsophage vers le proventricule avec un stockage dans le jabot, régulé par le taux de remplissage du gésier, si celui-ci est vide l'aliment est directement transféré dans le proventricule (Klasing, 1998a). Durant son stockage dans le jabot, l'aliment se ramollit sous l'action du mucus et de l'eau ingérée par l'oiseau. L'épithélium du jabot se présente sous la forme d'une épaisse couche d'épithélium stratifié et

incomplètement kératinisé. Des glandes à mucus sont présentes dans la région de la jonction entre l'œsophage et le jabot, mais pas dans le jabot en lui-même (Hodges, 1974).

1.2 Le Proventricule et le gésier

Le proventricule est appelé "l'estomac glandulaire" du poulet. La muqueuse du proventricule contient en effet une abondance de glandes de deux types principaux : les glandes tubulaires qui secrètent le mucus et les glandes gastriques avec leurs cellules oxynticopeptiques qui secrètent de l'HCl et la pepsine (Klasing, 1998). Le proventricule est séparé du gésier par un isthme appelé la zone intermédiaire gastrique (Klasing, 1998a; Denbow, 1999). Le gésier forme "l'estomac musculaire" du poulet. Sa musculature développée permet une réduction mécanique de la taille des particules alimentaires. Il permet également à l'HCl et à la pepsine, mélangés à l'aliment lors du passage dans le proventricule, d'exercer leurs effets protéolytiques. Il y a production de cuticule (caoline) au niveau de cet organe, permettant la protection de l'épithélium. Le gésier se termine par une zone pylorique qui le sépare du duodénum et ne permet le passage vers l'intestin grêle qu'aux particules alimentaires de taille inférieure à environ 1 mm (Klasing, 1998a; Denbow, 1999).

1.3 L'intestin grêle et ses glandes annexes

L'intestin grêle a pour rôle de poursuivre l'hydrolyse enzymatique de l'aliment commencée dans l'estomac et de réaliser l'absorption des produits terminaux de la digestion. Il est habituellement subdivisé en trois segments, le duodénum, le jéjunum et l'iléon, ces trois segments ne présentant pas des caractéristiques histologiques différentes, mais un continuum. Le duodénum est défini comme étant la partie commençant au niveau de la zone pylorique et formant une boucle autour du pancréas, le jéjunum est défini comme la portion suivante s'arrêtant au niveau du diverticule de Meckel (résidu du sac vitellin), enfin l'iléon est défini comme étant la partie allant du diverticule de Meckel à la jonction iléo-caecale (Klasing, 1998a). La muqueuse intestinale porte un grand nombre de villosités qui sont des projections de la muqueuse intestinale dans la lumière permettant d'augmenter la surface d'absorption (Hodges, 1974). A la base des villosités se trouvent les cryptes de Lieberkühn qui sont formées par une invagination de la muqueuse intestinale (Figure 5). L'épithélium intestinal est formé d'une mono couche de cellules, majoritairement des entérocytes, mais également des cellules caliciformes et entéroendocrines. Toutes ces cellules sont produites au niveau des

cryptes et de la base des villosités et migrent en se différenciant, vers le sommet des villosités (Imondi et Bird, 1966, Uni et al, 1998) ou elles sont éliminées dans la lumière (Yamauchi, 2002).

Les entérocytes sont des cellules dont la partie apicale présente une bordure en brosse au niveau de laquelle se trouvent des enzymes et des transporteurs. Les cellules caliciformes ou cellules à mucus sont responsables de la sécrétion du composant majoritaire du mucus, les mucines (les informations se rapportant au mucus sont détaillées dans le paragraphe 3.4.1 de ce chapitre). Les cellules entéroendocrines produisent une grande variété d'hormones peptidiques.

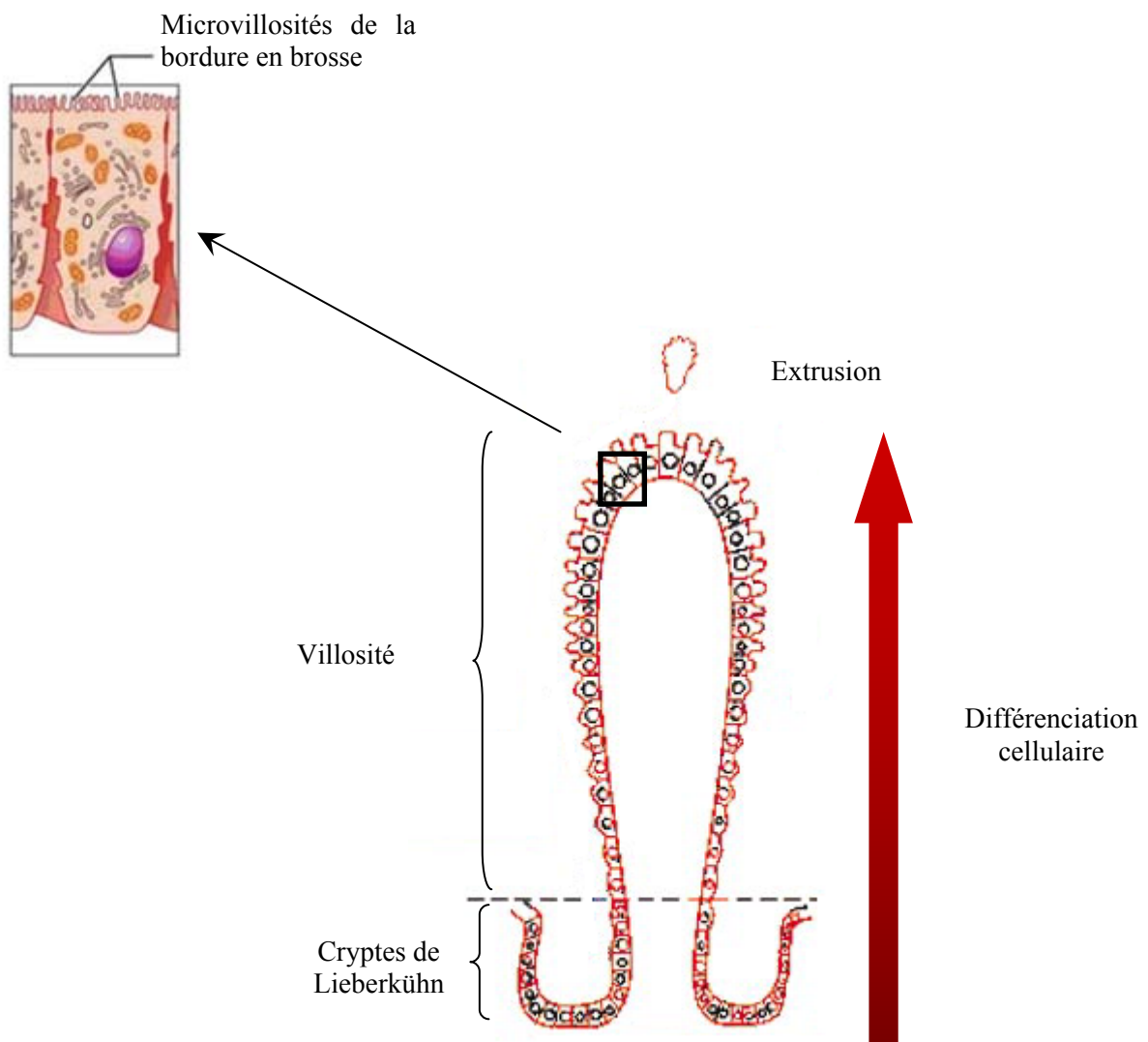


Figure 5 : Structure de la paroi intestinale

L'intestin grêle possède également des glandes annexes et un diverticule : le foie et la vésicule biliaire, le pancréas, et le diverticule de Meckel.

Le foie entoure, *in vivo*, le gésier. Il reçoit le sang chargé des nutriments et des molécules traversant la paroi intestinale. Il a notamment une fonction de détoxification, et peut donc modifier certaines de ces molécules. Il synthétise les sels et acides biliaires qui sont évacués par 2 canalicules soit directement vers le duodénum, soit vers la vésicule biliaire reliée elle-même à la fin du duodénum (Klasing, 1998a).

Le pancréas est une glande annexe de l'appareil digestif qui possède une fonction endocrine et une fonction exocrine. Il sécrète à la fois des hormones et des enzymes impliqués dans la digestion. Les enzymes sécrétées rejoignent le tractus digestif par un conduit situé au niveau du duodénum terminal (Denbow, 1999).

Le diverticule de Meckel est un résidu du sac vitellin. Celui-ci est une formation embryonnaire qui pourvoit aux besoins énergétiques de l'embryon et permet d'assurer la transition alimentaire vers une alimentation exogène qui a lieu les premiers jours après éclosion. A l'éclosion, le sac vitellin représente entre 15 et 25% du poids corporel, et il est réduit à moins de 1% du poids corporel pour la majorité des poussins âgés de 10j (Jamroz et al., 2004). Après éclosion, une partie des nutriments contenus dans le sac vitellin est absorbée directement dans la circulation sanguine via sa membrane, et une partie est expulsée vers la lumière de l'intestin grêle, puis hydrolysée et absorbée de la même manière que les aliments chez les animaux plus âgés (Noy et al., 1996).

1.4 Les caeca

Chez le poulet, les caeca forment deux diverticules d'égale longueur, situés à la jonction entre l'iléon et le colon. A l'entrée des caeca se trouve un sphincter déterminant leur ouverture. L'épithélium au niveau des sphincters est constitué de longues villosités qui forment une sorte de filtre. Ainsi, seuls les fluides et les plus fines particules provenant de l'iléon et du colon peuvent entrer par rétroperistaltisme dans les caeca, empêchant l'entrée de particules fibreuses solides indigestibles. Quatre-vingt-sept à quatre-vingt-dix-sept pourcent des fluides du caeca proviendraient de l'urine.

Leur rôle chez les oiseaux domestiques n'est pas très bien connu, mais il semble participer à l'absorption d'eau et d'électrolytes. Ils pourraient également contribuer à l'apport en acides aminés et l'apport énergétique de l'animal grâce à la production d'acides gras

volatiles par les fermentations bactériennes, bien que leur contribution ne soit pas clairement établie (Clench et Mathias, 1995 ; Jozekiak et al, 2004).

1.5 Du colon au cloaque

Le gros intestin est très court chez le poulet. Il est formé du colon et débouche directement dans le cloaque. Le colon du poulet, contrairement à celui des mammifères et de certains oiseaux herbivores comme l'autruche, n'est pas composé de circonvolutions, n'en faisant pas une chambre fermentaire comme chez ces derniers. Au contraire, il est droit. Le cloaque est composé de trois chambres, en allant de la partie antérieure vers la partie postérieure, le coprodeum, l'urodeum et le proctodeum. Ces deux compartiments ont un rôle important dans la réabsorption d'eau (Denbow, 1999).

II. Transit digestif : durée, mouvement péristaltique et rétropéristaltisme

Le transit digestif est le passage du bol alimentaire le long du tractus digestif. La durée de ce transit peut avoir une influence sur l'efficacité de digestion des aliments en modulant le temps durant lequel les aliments peuvent être digérés, puis absorbés

Le temps de transit total, définit comme le temps de transit de l'entrée à la sortie du tractus digestif varie avec l'âge des animaux et la composition du régime. Golian et Maurice, (1992) montrent que la relation entre transit et âge se présente sous la forme d'une courbe sigmoïde avec un plateau inférieur entre 1 et 2 semaines d'âge, une rapide augmentation entre 3 et 4 semaines d'âge et un plateau supérieur à partir de 4 semaines (Figure 6).

Le temps de rétention moyen (TRM) varie d'un compartiment à l'autre. Au sein d'un même compartiment il est lui aussi affecté par l'âge des animaux (Palander et al., 2010), la composition de leur régime (Ouhida et al., 2000; Weurding et al., 2001; Palander et al., 2010), leur génotype (Shires et al., 1987) ainsi que le marqueur indigestible utilisé pour réaliser l'étude (Sklan et al., 1975) (Tableau 6).

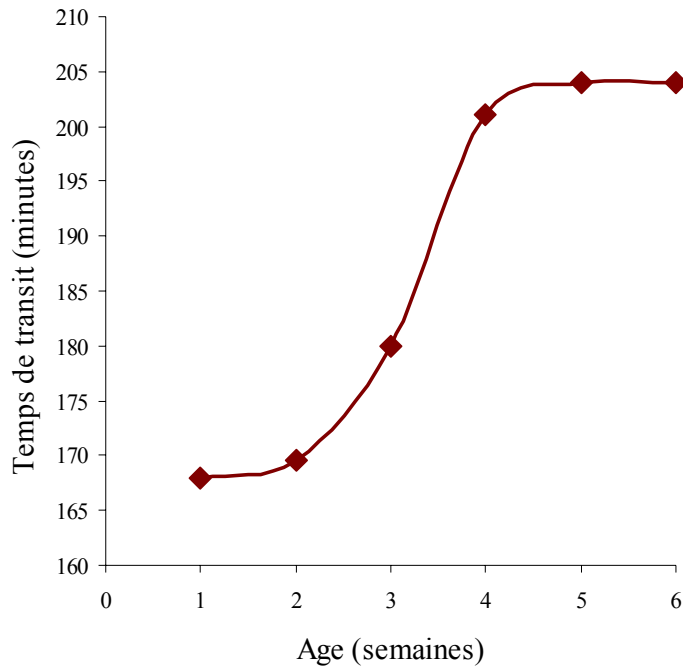


Figure 6 : Variation du temps de transit moyen total avec l'âge des animaux (d'après Golian et Maurice, 1992)

2.1. Partie supérieure du tractus digestif : du jabot à la fin de l'intestin grêle

Dans le jabot, le TRM varie de quelques minutes à plusieurs heures (Tableau 6). Le temps de stockage de l'aliment dans cet organe dépend du taux de remplissage du gésier, ainsi un animal dont le gésier est vide ne stocke pas d'aliment dans son jabot, ce qui explique les TRM, parfois très courts observés (Klasing, 1998a).

Dans le proventricule, le TRM est très court, de l'ordre de quelques minutes, et l'aliment est rapidement transféré vers le gésier. Il existe un mouvement de reflux entre proventricule et jabot qui peut entraîner l'arrivée de contenu gastrique dans ce dernier (Sacranie et al, 2008).

Le chyme reste dans le gésier jusqu'à ce que la taille des particules alimentaires soit suffisamment réduite pour passer la barrière du pylore, soit entre 15 et 85 minutes (Tableau 6). Il existe un mouvement de reflux entre le gésier et le proventricule, favorisant l'action des sécrétions provetriculaires (Denbow, 1999).

Dans l'intestin grêle le TRM augmente en allant du duodénum vers l'iléon, il est extrêmement court dans le duodénum (3 à 18 minutes), il dure entre 20 et 110 minutes dans le jéjunum et entre 30 et 150 minutes dans l'iléon (Tableau 6).

Ainsi en utilisant les observations rapportées dans le Tableau 6, le TRM dans l'ensemble du tractus digestif, à l'exception des caeca, peut être estimé durer de 4 à 7h.

Tableau 6 : Temps de rétention moyen de l'aliment observé chez le poulet

Age ¹	Lignée	M P principales ²	Marqueur	Temps de Rétention Moyen								Référence		
				Jabot	Estomac		Intestin grêle				Colon		Total ⁶	
					Prov ³	Gésier	Estomac ⁴	Duo ⁵	Jéjunum	Iléon				Intestin grêle
3		Maïs soja	TiO2		26				98			Ouhida et al., 2000		
		Orge blé	TiO2		21				104			Ouhida et al., 2000		
		seigle soja	TiO2	60		58	18	110	140	268	36	422	Danicke et al., 1999	
	Ross 208	blé orge	TiO2						52			Palander et al., 2010		
	Ross 208	avoine	TiO2						32			Palander et al., 2010		
4	Ross (femelles)	blé	Cr2O3				64	93				Weurding et al., 2001		
	Ross (femelles)	orge	Cr2O3				53	82				Weurding et al., 2001		
6	Rhode Island x Leghorn		51Cr	166		17	4	20	38	61	27	272	Sklan et al., 1975	
	Rhode Island x Leghorn		91Y	220		50	3	21	45	69	27	366	Sklan et al., 1975	
	Hybro	maïs soja	cr2O3	41		33	5	71	90	166	26	266	Van der Kils et al., 1990	
	Hubbard	maïs soja + maïs colza	103Ru	7	4	50	54	7	60	86	153	44	258	Shires et al., 1987
	Shaver Starcross 208	maïs soja + maïs colza	103Ru	25	3	84	87	7	59	73	139	40	291	Sklan et al., 1975
	Ross 209	blé orge	TiO2						151				Palander et al., 2010	
	Ross 209	avoine	TiO2						89				Palander et al., 2010	

¹Age exprimé en semaines

²M P principales : matières premières principales

³Prov : Proventricule, ⁴Estomac : proventricule + gésier, ⁵Duo : duodénum

⁶Temps de rétention moyen sur l'ensemble du tractus digestif à l'exception des caeca

2.2. Partie inférieure du tractus digestif : les caeca et le colon

Dans les caeca un phénomène de mélange aide l'entrée, apparemment continue, de nouvelles particules alimentaires et de fluide provenant du colon (Savory et Knox, 1991). Le mouvement permet aussi au nouveau matériel de se mélanger avec celui déjà présent dans la lumière caecale. De plus il a été montré que les caeca ne se vidangent que deux fois par jour, au moment des changements d'intensité lumineuse (Duke et al., 1980). A peu près la moitié du contenu des caeca est évacuée à chaque vidange (Akester et al, 1967).

Dans le colon, le TRM dure entre 25 et 40 minutes (Tableau 6).

III. Sécrétions digestives du poulet et digestion

Les sécrétions digestives du poulet varient en fonction de nombreux facteurs comme l'âge et l'alimentation de l'animal. Nous présenterons ici un bilan des résultats obtenus chez l'animal en fin de croissance.

3.1. Sécrétions salivaires

Au niveau de la bouche, les glandes salivaires sécrètent du mucus, composé principalement de glycoprotéines, les mucines (voir détails au paragraphe 3.6.1 de ce chapitre). Le volume de salive journalier est de 7 à 30 ml chez le poulet (Klasing, 1998).

3.2. Sécrétions de l'œsophage et du jabot

Dans l'œsophage et dans le jabot, du mucus est sécrété par les cellules caliciformes. Celui-ci a pour rôle principal de lubrifier et humidifier l'aliment. Il ne contient pas d'enzymes digestives endogènes (Denbow, 1999).

3.3. Sécrétions gastriques

Au niveau du proventricule, les cellules oxyntico-peptiques sécrètent à la fois de l'HCl et du pepsinogène. Celui-ci est converti en pepsine sous l'effet de l'acide présent. Ces sécrétions permettent de débiter l'hydrolyse des nutriments (Klasing, 1998b).

3.4. Sécrétions biliaires

Le foie produit et sécrète la bile. Celle-ci, est composée d'acides biliaires et de sels biliaires. Les acides biliaires, principalement de l'acide cholique et de l'acide chénodéoxycholique sont conjugués avec de la taurine pour donner de la cholyltaurine et de la chénodéoxycholyltaurine (Denbow, 1999). Les sels biliaires, le cholestérol et les phospholipides sont sécrétés dans le canalicule biliaire et transportés vers la vésicule biliaire et le duodénum (Klasing, 1998a). Ils sont impliqués dans la digestion des lipides. La bile contient également de l'amylase et intervient donc dans la digestion des glucides (Denbow, 1999).

3.5. Sécrétions pancréatiques

Le pancréas sécrète de nombreuses enzymes, ainsi que du bicarbonate de sodium, qui vont entrer dans le tractus digestif au niveau de la partie terminale du duodénum. Le bicarbonate de sodium neutralise le chyme acide provenant de l'estomac. Plusieurs types d'enzymes sont sécrétées, dont des lipases (lipase, colipase et phospholipase), de l' α -amylase, et des protéases sous forme de zymogènes inactifs (chymotrypsinogène, trypsinogène A, B et C, procarboxypeptidase A et B, proélastase) (Krogdahl, 1985; Krogdahl et Sell, 1989; Pubols, 1991; Jin et al., 1998; Denbow, 1999). Ces zymogènes doivent être activés dans le lumen de l'intestin par l'entérokinase (Denbow, 1999).

3.6. Sécrétions intestinales

3.6.1. Le mucus

3.6.1.1. Production, composition et caractéristiques

L'épithélium digestif des oiseaux, comme des mammifères, est recouvert d'une couche de mucus. Il est sécrété par des cellules en forme de gobelets, les cellules caliciformes, dites cellules à mucus, situées entre les entérocytes de l'épithélium digestif (voir paragraphe 1.3 de ce chapitre). Le mucus est présent sur toute la longueur de l'intestin sous forme de deux couches, une couche interne, adhérant fermement à l'épithélium digestif, et l'autre externe, peu adhérente. Le mucus est composé à 95% d'eau et de 1 à 10% de mucines, acides nucléiques et minéraux. La matière sèche est composée à 70-80% de mucines. Les mucines sont des glycoprotéines, constituées d'un cœur peptidique formé d'une alternance de

domaines glycosylés et non glycosylés. Des centaines de chaînes oligosaccharidiques sont liées à cette chaîne protéique par des liaisons O-glycosidiques ou N-glycosidiques au niveau de résidus proline, sérine et thréonine (Corfield et al., 1992; Smirnov et al., 2005; Liévin-Le Moal et Servin, 2006). Chez le poulet, les principaux oligosaccharides présents sont du N-acétylglucosamine, et du galactose (Sharma et al., 1997). Les chaînes d'oligosaccharides confèrent aux mucines une grande diversité par leur longueur, leur composition, leur positionnement et leur degré de sulfation et d'acétylation (Podolsky, 1985b; a).

3.6.1.2 Epaisseur

L'étude de l'épaisseur du mucus est difficile à réaliser car celui-ci commence à se désagréger rapidement à la mort des animaux et perd sa structure quand il est exposé à l'air. Cependant des méthodes indirectes mesurant le taux d'absorption d'un colorant et des méthodes directes sur animal anesthésié existent.

En l'absence de travaux présentant des mesures directes chez le poulet, des travaux effectués chez le rat seront présentés (Atuma et al., 2001). Dans l'estomac, une épaisse couche adhérente de mucus est observée (80-154 μm), recouverte d'une couche d'épaisseur similaire de mucus non adhérent (109-120 μm). Dans l'intestin grêle, l'épaisseur de la couche de mucus adhérent est très faible dans le duodénum et le jéjunum (15 μm) et deux fois plus importante dans l'iléon (30 μm). La couche de mucus non adhérent baisse légèrement entre le duodénum et le jéjunum puis augmente fortement dans l'iléon (154, 108 et 447 μm respectivement). Enfin dans le colon une couche importante de mucus adhérent (116 μm) est recouverte d'une couche très épaisse de mucus non adhérent (714 μm) (Figure 7). Des mesures indirectes réalisées chez le poulet suggèrent que les variations d'épaisseur de la couche adhérente de mucus au sein de l'intestin grêle, observées chez le rat, n'existent pas chez cet oiseau (Smirnov et al., 2005). Cependant ces mesures, du fait de la méthodologie employée (mesure du taux d'absorption d'un colorant) ne permettent pas d'avoir de données quantitatives de l'épaisseur de mucus.

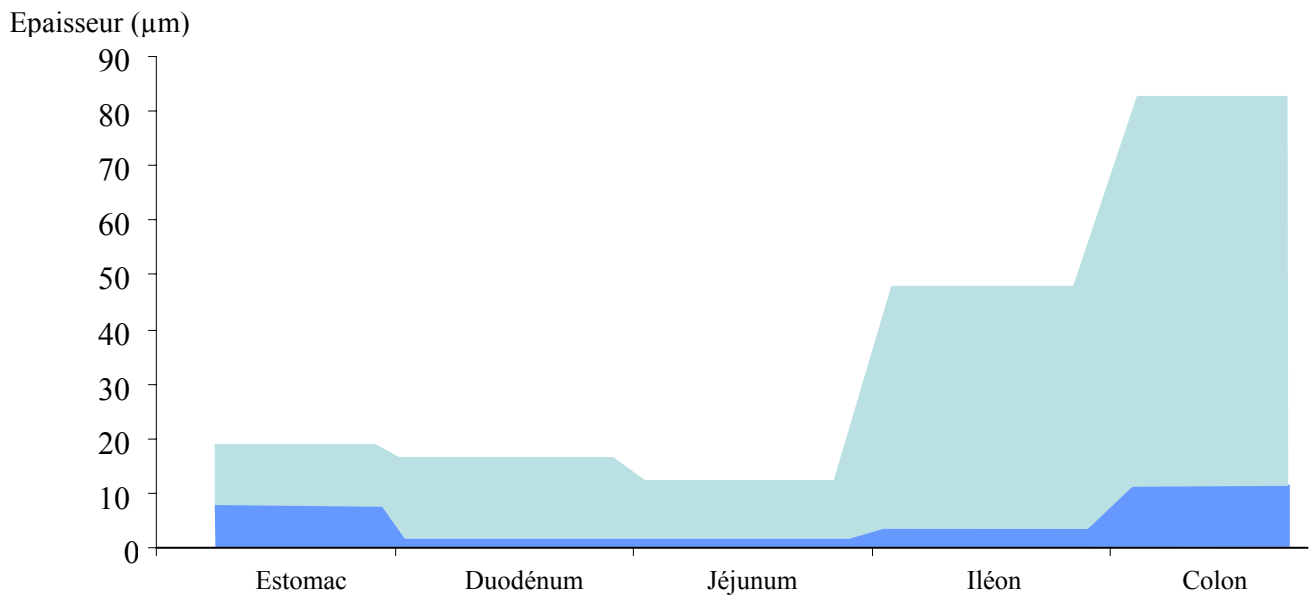


Figure 7 : Evolution spatiale de l'épaisseur des couches de mucus chez le rat (d'après Atuma et al., (2001)). La zone bleu clair représente l'épaisseur de la couche externe de mucus, et la zone en bleu foncé représente celle de la couche interne de mucus.

3.6.2. Enzymes digestives

C'est au niveau de la lumière intestinale que sont activées les enzymes pancréatiques. L'entérokinase hydrolyse le propeptide lié à l'extrémité du trypsinogène, libérant la trypsine sous sa forme active. Celle-ci peut alors permettre l'activation de nombreuses enzymes pancréatiques (Klasing, 1998b). En plus des enzymes pancréatiques, l'intestin contient de nombreuses enzymes intestinales au niveau de la bordure en brosse des cellules épithéliales : des disaccharidases (maltase, saccharase, isomaltase et tréhalase, cette dernière étant caractérisée chez la dinde mais pas encore chez le poulet), de l'amylase, des peptidases (aminopeptidase et dipeptidase), des phosphatases alcalines et acides, des lipases (lipase et phospholipase), et de l'entérokinase (Jin et al., 1998; Klasing, 1998b; Sklan et al., 1999; Denbow, 1999; Iji et al., 2001).

3.7. Protection du tractus digestif

La protection du tractus digestif contre les microorganismes est assurée par la surface épithéliale au moyen de mécanismes physiques, chimiques et bactériologiques, et en faisant

intervenir le système immunitaire. De plus, les dommages causés à la muqueuse digestive sont détectés et entraînent la mise en œuvre de mécanismes de réparation

Ainsi la barrière physique est assurée par le péristaltisme, les jonctions serrées entre les entérocytes et le renouvellement rapide des cellules intestinales, mais surtout par le mucus. Celui-ci est sécrété par l'épithélium digestif et permet une lubrification des parois du tractus digestif qui facilite le passage du bol alimentaire et protège l'épithélium des frottements induits par le passage de l'aliment. Il permet de maintenir un environnement aqueux à la surface de la muqueuse intestinale. Le mucus restreint également la colonisation de l'épithélium digestif à un très faible nombre de bactéries, qu'elles soient commensales ou pathogènes. Il a été observé que la couche externe de mucus est fortement colonisée par les bactéries, ce qui n'est pas le cas de la couche interne (Johansson et al., 2008). En plus de cette protection contre des agressions mécaniques, le mucus protège également l'épithélium digestif d'agressions chimiques engendrées par certains composants présents dans les contenus digestifs, notamment, l'acidité du pH gastrique, les acides biliaires, les enzymes, les substances lumenales toxiques comme des toxines bactériennes ou des composants alimentaires comme les lectines (Allen et Flemström, 2005).

La barrière chimique est notamment assurée par les sécrétions gastriques acides, les enzymes digestives, les sels biliaires et les peptides antimicrobiens sécrétés dans la lumière intestinale (Liévin-Le Moal et Servin, 2006). Chez le poulet, les peptides antimicrobiens sont en partie synthétisés par les cellules épithéliales, mais des cellules spécialisées dans leur synthèse, comme les cellules de Paneth, pourraient également intervenir, bien que leur présence soit encore hypothétique chez les volailles (van Dijk et al., 2008).

Le microbiote commensal intervient aussi en exerçant un effet 'barrière' que nous détaillerons plus loin.

Le système immunitaire intervient également dans cette protection.

IV. Digestion endogène et absorption

C'est dans l'intestin grêle qu'ont lieu la majorité des réactions d'hydrolyse des aliments liées aux enzymes synthétisées par l'animal, ainsi que l'absorption des produits issus

de ces hydrolyses. Celles-ci, leur substrat et les produits qu'elles libèrent, sont récapitulés dans la Figure 8. Par ailleurs le rôle des bactéries dans la digestion ne sera pas évoqué dans ce chapitre car il sera traité dans une section consacrée à l'impact du microbiote sur l'hôte (chapitre 3, paragraphe 3).

4.1 Les glucides

Les glucides sont présents dans l'aliment principalement sous forme d'amidon, composé d'amylose et d'amylopectine, l'amylose étant moins bien digérée par les monogastriques que l'amylopectine. L'amylose est hydrolysée essentiellement en maltose et maltotriose par l' α -amylase. L'amylopectine conduit à des dextrines qui sont des oligosaccharides composés d'au moins quatre molécules de glucose. Le maltose et l'isomaltose pourront à leur tour être hydrolysés en glucose par la maltase et l'isomaltase. Le saccharose sera, quant à lui, hydrolysé en glucose et fructose par la sucrase (Klasing, 1998b; Denbow, 1999) (Figure 8).

Le glucose et le fructose produits sont absorbés principalement au niveau de la muqueuse intestinale, en particulier au niveau du duodénum, bien que l'affinité pour le transport actif du glucose soit plus grande dans l'iléon, permettant ainsi une absorption du glucose qui n'aurait pas eu lieu précédemment (Denbow, 1999). L'absorption s'effectue à 80% par des mécanismes de transport actif (Na^+ dépendant) et par diffusion passive (facilitée par un gradient de glucose) et active (Denbow, 1999).

En plus de l'amidon, des polysaccharides non amylicés hydrosolubles ou non et des α -galactosides sont présents dans les aliments pour volailles. L'animal ne dispose pas d'enzymes hydrolytiques capables de dégrader ces composants. Les polysaccharides non amylicés hydrosolubles augmentent la viscosité du bol alimentaire et limitent l'hydrolyse des différents composants de l'aliment. Les glucides insolubles des parois cellulaires quant à eux peuvent bloquer l'accès des enzymes digestives à leur substrat. Ces différents composants glucidiques sont donc l'objet de fermentations microbiennes comme nous le verrons plus loin.

Selon le régime alimentaire ingéré par les animaux, la totalité de l'amidon ingéré n'est pas digérée en sortie de l'iléon. Ainsi, 20% de l'amidon issu du pois et 2-6 % de l'amidon issu de céréales n'est pas digéré (Weurding et al, 2001).

4.2 Les protéines

Les protéines présentes dans le tractus digestif sont composées des protéines alimentaires, qui peuvent avoir de très nombreuses structures et sensibilité à l'hydrolyse (Rothenbuhler et Kinsella 1985 ; Crévieu-Gabriel, 1997), ainsi que des sécrétions endogènes protéiques de l'animal (protéases, mucines, cellules desquamées).

L'hydrolyse des protéines fait appel à l'action séquentielle de plusieurs enzymes. Elle commence dans le proventricule et le gésier, sous l'influence du pH acide qui dénature la structure des protéines. Les protéines sont ensuite hydrolysées en polypeptides par la pepsine qui a une large spécificité d'hydrolyse. Par la suite, les polypeptides sont hydrolysés par d'autres endopeptidases selon leur composition en acides aminés au niveau intestinal. La chymotrypsine hydrolyse les polypeptides au niveau de liaisons impliquant des acides aminés aromatiques, la trypsine les hydrolyse au niveau de liaisons impliquant des acides aminés basiques, enfin, l'élastase les hydrolyse au niveau de liaisons impliquant des acides aminés portant de petits groupements non chargés. Les produits issus de l'hydrolyse par les endopeptidases sont alors hydrolysés par des exopeptidases. Les produits libérés par la chymotrypsine et l'élastase sont ensuite hydrolysés par la carboxypeptidase A en oligopeptides, acides aminés neutres et acides. Les produits libérés par la trypsine sont, quant à eux, hydrolysés par la carboxypeptidase B en oligopeptides et acides aminés basiques. Les oligopeptides poursuivent leur processus d'hydrolyse en acides aminés sous l'action d'aminopeptidases et de dipeptidases situés au niveau de la bordure en brosse des entérocytes (Klasing, 1998b) (Figure 8).

L'absorption des acides aminés se fait principalement au niveau des entérocytes de l'intestin grêle, bien qu'une absorption soit aussi rapportée dans les parties antérieures du tractus digestif (jabot, proventricule et gésier), ainsi qu'au niveau des caeca et du colon. Actuellement, on ne connaît pas la partie de l'intestin grêle où s'effectue l'absorption la plus importante car il y a désaccords entre les études (Denbow, 1999). Les produits de la digestion des protéines peuvent être absorbés non seulement sous forme d'acides aminés mais aussi sous forme de di et tri peptides (Gilbert et al., 2010). L'absorption intestinale s'effectue par l'action de transporteurs actifs ATP dépendants couplés à du Na^+ . (Denbow, 1999).

De même que pour les glucides, l'ensemble des protéines n'est pas digéré en fin d'iléon. Ainsi 28% de la Cys et 13% de la Met issues des protéines de soja (Cowieson, 2010)

et de 10 à 16% des protéines de pois (Gabriel et al, 2007) ne sont pas digérées. Par ailleurs, les protéines endogènes représentent en fin d'iléon environ 30% des acides aminés (Gabriel et al, 2008).

4.3 Les lipides

Du fait du caractère hydrophobe des lipides présents dans le milieu intestinal, qui lui, est aqueux, leur digestion et absorption présentent deux différences majeures avec la digestion et l'absorption des glucides et des protéines : leur digestion implique une émulsion, et leur absorption par les entérocytes peut s'effectuer par simple diffusion à travers la bicouche lipidique.

La digestion des lipides commence dans le gésier par leur émulsion sous l'influence des contractions du gésier, est facilitée par la présence de peptides issus de l'hydrolyse des protéines (Klasing, 1998b). L'émulsion des lipides se poursuit dans l'intestin grêle sous l'action des acides biliaries. La séquence des étapes de digestion des lipides par les enzymes pancréatiques et intestinales pour aboutir à la libération des acides gras, n'est pas connue chez les oiseaux. Il semblerait que les lipases puissent intervenir en agissant à l'interface eau/lipide, mais cela requiert le pré-attachement d'une colipase et l'action conjointe des phospholipases. Après hydrolyse, les acides gras libérés, les phospholipides et les monoglycérides entrent dans les micelles formées grâce aux acides biliaries (Krogdahl, 1985; Klasing, 1998b). Sklan et al., (1999) ont montré que des lipases et phospholipases présentes au niveau de la bordure en brosse des entérocytes jouent un rôle non négligeable dans la digestion des lipides chez le poulet (Figure 8). Il est à noter que chez le jeune poulet la digestion des lipides est réduite à cause d'une quantité insuffisante de sels biliaries (Krogdahl, 1985).

L'absorption des acides gras a lieu dans la partie distale du jéjunum et dans l'iléon (Krogdahl, 1985; Denbow, 1999). Les mécanismes d'absorption sont mal connus chez les oiseaux. Au niveau de la bordure en brosse des entérocytes, les acides gras peuvent passer la membrane cellulaire par diffusion passive. Il semblerait toutefois que la présence de protéines capables de se lier aux acides gras facilite leur transport. Enfin, la présence d'un transporteur, identifié chez le rat, suggère l'existence de mécanismes de transport actifs (Krogdahl, 1985; Besnard et al., 1996).

La fraction non digérée de lipides à la sortie de l'iléon dépend de nombreux paramètres, notamment l'âge de l'animal, le taux d'incorporation des lipides dans l'aliment, l'origine de ces lipides, et la nature de l'acide gras considéré. Ainsi, la fraction de lipides non digérés issue d'huile de soja est de 1-3% tandis qu'elle est de 5-20% pour un mélange de graisses végétales et animales (Ajuyah et al., 1996).

4.4 L'eau

L'eau, issue de l'aliment, de l'abreuvement et des sécrétions le long du tractus digestif, est absorbée tout le long de l'intestin grêle, du colon et des caeca. Elle diffuse à travers la membrane épithéliale. Dans l'intestin grêle, son absorption est stimulée par l'absorption de certains nutriments (acides aminés et monosaccharides). L'urine produite par les poulets est très diluée et peut remonter dans le colon et atteindre les caeca par mouvement de rétro péristaltisme. L'eau, le chlore et le sodium peuvent alors être réabsorbés dans les différents compartiments que traverse l'urine (coprodeum, colon, caeca) et particulièrement dans les caeca (Klasing, 1998b; Denbow, 1999 ; McWhorter et al., 2009).

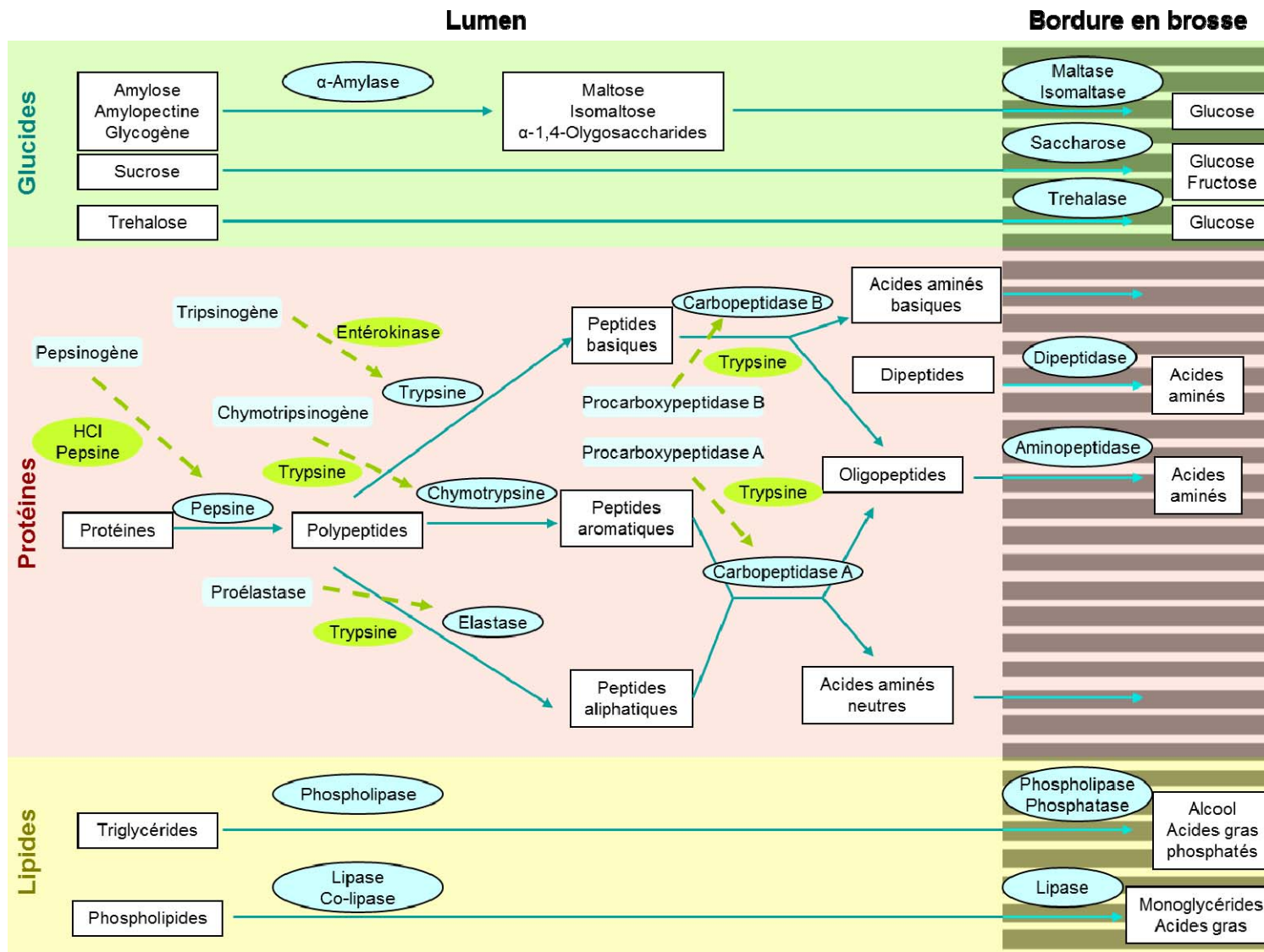


Figure 8 : Principales enzymes et produits d'hydrolyse intervenant dans la digestion des nutriments chez le poulet

V. Paramètres physico-chimiques du tractus digestif

Les milieux digestifs sont caractérisés par différents paramètres physicochimiques comme la teneur en O₂, le pH et la température, ainsi que leur teneur en eau et matières organiques, liés à la physiologie de l'animal et à sa digestion. Les milieux digestifs sont des milieux très hétérogènes. Cependant à l'échelle d'un organe, ou du tractus digestif une organisation peut être observée avec la formation de gradients, aussi bien longitudinaux que transversaux.

5.1 Concentration en oxygène et potentiel redox

La forte proportion de bactéries aérobies ou aérotolérante dans la partie supérieure du tractus digestif, jabot et intestin grêle et, au contraire, de bactéries anaérobies dans les parties distales, caeca et colon (voir le chapitre 3 sur le microbiote digestif) montrent qu'il existe un gradient d'O₂ le long du tractus digestif. Cependant, à notre connaissance, il n'existe pas de mesure directe de la teneur en O₂ dans le tractus digestif chez l'oiseau. Aussi les résultats présentés ci-dessous sont issus d'études réalisées chez des mammifères monogastriques.

La diminution de la concentration en oxygène le long du tractus digestif a été montrée chez la souris, nourrie et anesthésiée, par une méthode directe. Ainsi, une baisse de la pression partielle en oxygène a été observée, de la partie supérieure vers la partie inférieure du tractus digestif : 58 Torr dans l'estomac, 32 Torr dans le duodénum, 11 Torr dans la zone jéjunum / colon intermédiaire (ascendant et descendant), et 3 Torr dans le colon distal sigmoïde (He et al., 1999). Cette diminution pourrait être due au fait que l'intestin grêle a une muqueuse très développée avec de nombreuses villosités et microvillosités, alors que la partie inférieure du tube digestif a une surface de muqueuse très peu développée. Par ailleurs, les mouvements de reflux et les mouvements des villosités dans l'intestin grêle, permettent des échanges importants entre l'O₂ de la muqueuse et les contenus. Au contraire, dans les parties distales du tractus digestif, la teneur en O₂ serait limitée grâce à la présence de l'épaisse couche de mucus et d'une faible motricité limitant les phénomènes de diffusion à partir de la paroi digestive (Moran, 2006).

Par ailleurs, il existe un gradient de concentration d'oxygène croissant à l'intérieur de l'intestin en allant du lumen à la muqueuse (Marteyn et al., 2010). En effet, il existe une zone

proche de la muqueuse intestinale où, grâce à la diffusion d'oxygène issu des capillaires sanguins, la teneur en oxygène est plus importante, en particulier en haut des villosités.

Le potentiel redox est fortement corrélé à la teneur en oxygène. Dans les parties supérieures du tractus digestif, où les teneurs en oxygène sont plus élevées, le potentiel d'oxydo-réduction présente des valeurs fortement positives, alors que dans les parties distales, appauvries en oxygène, ce potentiel présente des valeurs négatives. De même le potentiel d'oxydo-réduction présente un gradient croissant de la lumière digestive vers la muqueuse. Il est le témoin du degré d'anaérobiose des milieux digestifs qui va permettre le développement des bactéries selon leur type respiratoire. Les bactéries aérobies strictes utilisent l'O₂ comme accepteur final d'électrons et ne pourront se développer qu'en présence d'O₂. A l'inverse, les bactéries strictement anaérobies utilisent des molécules organiques comme accepteur final d'électrons et sont sensibles à la présence d'oxygène. C'est l'activité fermentaire des parties distales du tractus digestif qui maintient le caractère réducteur de ce milieu, lequel conditionne le fonctionnement de cette biocénose. Cependant, le potentiel redox a été rarement mesuré, surtout en ce qui concerne les oiseaux.

5.2 Teneur en eau et osmolarité

Du fait de l'absorption d'eau dans l'intestin grêle et dans la partie distale du tractus digestif, la teneur en eau des contenus digestifs diminue le long du tractus.

L'osmolarité des contenus digestifs varie également le long du tractus digestif. Dans le duodénum elle est de 463 mOsm/l, dans le jéjunum de 452 mOsm/l et dans l'iléon de 413 mOsm/l (Mitchel et Moreto, 2006).

5.3. Concentration en matières organiques et minérales

Comme on l'a vu précédemment, l'hydrolyse des différents composants présents dans la lumière digestive conduit à la présence de nombreuses molécules qui peuvent être absorbées par l'hôte. Cependant certains composants ne sont pas hydrolysables pas les enzymes digestives de l'hôte, c'est par exemple le cas de différents glucides (amidon résistant, polysaccharides non amylacés hydrosolubles ou non, α -galactosides), ou de certaines protéines ou peptides, aussi bien issues de l'alimentation que des sécrétions endogènes de l'animal. Certains composants, aussi bien glucidiques, protéiques que lipidiques, peuvent être difficilement accessibles aux enzymes à cause des parois cellulaires ou du fait de la viscosité générée par les polysaccharides non-amylacé hydrosolubles. Par

ailleurs, des composants potentiellement absorbables peuvent persister dans la lumière intestinale si les capacités d'absorption du tractus digestif sont limitées. A ces composants issus de l'alimentation, viennent s'ajouter ceux issus de sécrétions endogènes, notamment le mucus qui comme indiqué précédemment contient principalement des mucines difficilement hydrolysables. Ce bol alimentaire a une structure très hétérogène, il est structuré en fraction liquide et particulaire. Les fractions particulières, qui sont constituées principalement d'aliments non ou partiellement digérés diminuent en taille en allant du jabot vers les caeca. Ainsi l'homogénéité des contenus digestifs est plus forte dans les parties distales du tractus digestif, particulièrement dans les caeca.

5.4 pH et pouvoir tampon

Le pH des contenus digestif varie selon des facteurs intrinsèques et extrinsèques à l'animal, mais aussi en fonction de la méthode d'analyse : animaux morts vs animaux vivants, animaux nourris vs animaux à jeun (Herpol, 1966; Chu et al., 1999).

Le pH des contenus digestifs varie d'un compartiment digestif à l'autre (Tableau 7). Le pH du jabot est très variable mais toujours légèrement acide (4,4 à 6,5) et dépend en grande partie de l'aliment et du temps de séjour de celui-ci dans cet organe (Svihus, 2010). Dans le proventricule le pH diminue fortement (1,8 à 4,8) et reste faible dans le gésier (2,8 à 4,4). Ensuite, dans l'intestin grêle, grâce à la sécrétion de bicarbonate de sodium par le pancréas, les valeurs de pH sont plus élevées (5,7 à 6,4 dans le duodénum ; 5,0 à 6,6 dans le jéjunum et 5,2 à 7,4 dans l'iléon). Enfin dans les caeca et le colon, les valeurs de pH sont légèrement acides (5,6 à 7,0 pour les deux segments) (Tableau 7). Il est intéressant de noter qu'il existe dans l'estomac des mammifères monogastrique, un gradient de pH qui va croissant du lumen vers la muqueuse ; le pH au niveau de celle-ci étant presque neutre. Ce gradient est dû à la présence de la couche de mucus et permet de protéger les cellules épithéliales de l'acidité (Chu et al., 1999; Allen et Flemström, 2005). Un phénomène similaire pourrait exister dans le proventricule et le gésier du poulet.

L'âge des animaux ne semble pas avoir d'effet sur le pH des contenus digestifs, et ce quel que soit le segment digestif (Herpol, 1966).

L'aliment par sa forme ou sa composition peut influencer le pH. Ainsi (Engberg et al., 2002) ont montré une influence de la présentation de l'aliment sur le pH des différents

compartiments, celui-ci étant plus faible dans tous les compartiments quand l'aliment est présenté sous forme de granulé que quand il est présenté sous forme de farine, sauf dans le gésier où l'inverse est observé. Les auteurs expliquent le plus faible pH du gésier quand l'aliment est sous forme de farine en suggérant une stimulation de la sécrétion gastrique. La composition de l'aliment influence également le pH, comme cela a été montré par Jiménez-Moreno et al., (2009) qui ont mesuré des différences de pH en fonction du type de fibres incluses dans l'aliment et du compartiment digestif considéré. Le pH de l'aliment et son pouvoir tampon varient fortement en fonction de sa composition (Giger-Reverdin et al, 2002), ce qui peut expliquer la variation de pH des contenus digestifs observée selon la composition de l'aliment administré aux animaux.

Tableau 7 : pH des contenus du tractus digestif

Référence	Animaux	M P principales ¹	pH des contenus digestifs							
			Jabot	Proventricule	Gésier	Duodénum	Jéjunum	Iléon	Caeca	Colon
(Jiménez-Moreno et al., 2009)	et Cobb 500 25j	régime riz/soja	4,4-5,0	4,0-4,8	2,8-4,4	5,8	5,0-5,8	5,2-6,8	6,0-6,2	5,6-6,2
(Farner, 1942)			4,47-4,54	4,33-4,51	2,46-2,79	5,68-6,07	5,72-6,00	6,18-6,50	5,60-5,83	6,08-6,58
(Pang et Applegate, 2007)	et Ross 308, 21j	maïs soja,			3,07-3,28	6,22-6,31		6,26-7,30		
(Engberg et al., 2002)	et Ross 208	blé-soja			3,82-4,01	5,76-6,29	6,00-6,19	6,73-7,18	6,13-6,73	5,87-6,50
(Langhout et al., 1999)	et Ross, 21j	maïs soja,						6,4-6,8		
(Herpol, 1966)			6,26-6,34	1,77-1,83	2,47-2,53	6,39-6,41	6,58-6,62	7,18-7,22	6,88-6,92	6,98-7,02
(Ao et al., 2008)			6,5		3		7		7,5	
(Gonzales-Alvarado et al., 2008)					3,18-3,34		5,72-5,93	6,52-7,35		

¹M P principales : matières premières principales

5.5 Température

La température interne des oiseaux varie très faiblement selon l'activité et le poids des animaux. Pour un poulet de 2,4 kg au repos dans des conditions de thermo-neutralité elle est de 41,5°C (Dawson et Whittow, 2000).

Résumé

Lorsque l'aliment est ingéré, il est directement transféré dans le jabot ou il est stocké et très peu modifié par les enzymes endogènes. La digestion endogène commence lors du séjour dans le gésier ou l'aliment est broyé mécaniquement et mélangé à la pepsine et l'HCl sécrétés par le proventricule. La digestion se poursuit dans l'intestin grêle sous l'action de la bile et des enzymes digestives pancréatiques et intestinales. C'est également dans cet organe que la majorité des nutriments sont absorbés. Le gros intestin est très peu développé chez le poulet et la principale étape de la digestion qui s'y déroule est la réabsorption d'eau et de minéraux et pour une part plus réduite d'acides gras volatils et de glucides. Le gros intestin débouche sur le cloaque La fraction liquide présente dans ce dernier, riche en acide urique, entre par un mouvement de rétro péristaltisme dans les caeca. A ce niveau, une partie non négligeable de l'eau et des électrolytes qu'elle contient est réabsorbée. Tout le long du tractus digestif, la muqueuse digestive est protégée des agressions physiques et chimiques liées à cet environnement par une double couche de mucus.

Du fait des sécrétions digestives et du déroulement de la digestion, la composition et la structure des digesta (eau, matières organiques et minérales) et les conditions physicochimiques qui y règnent (pH, O₂) varient d'une part le long du tractus digestif (Figure 9), et d'autre part au sein de chaque organe selon un axe muqueuse-lumière (Figures 10).

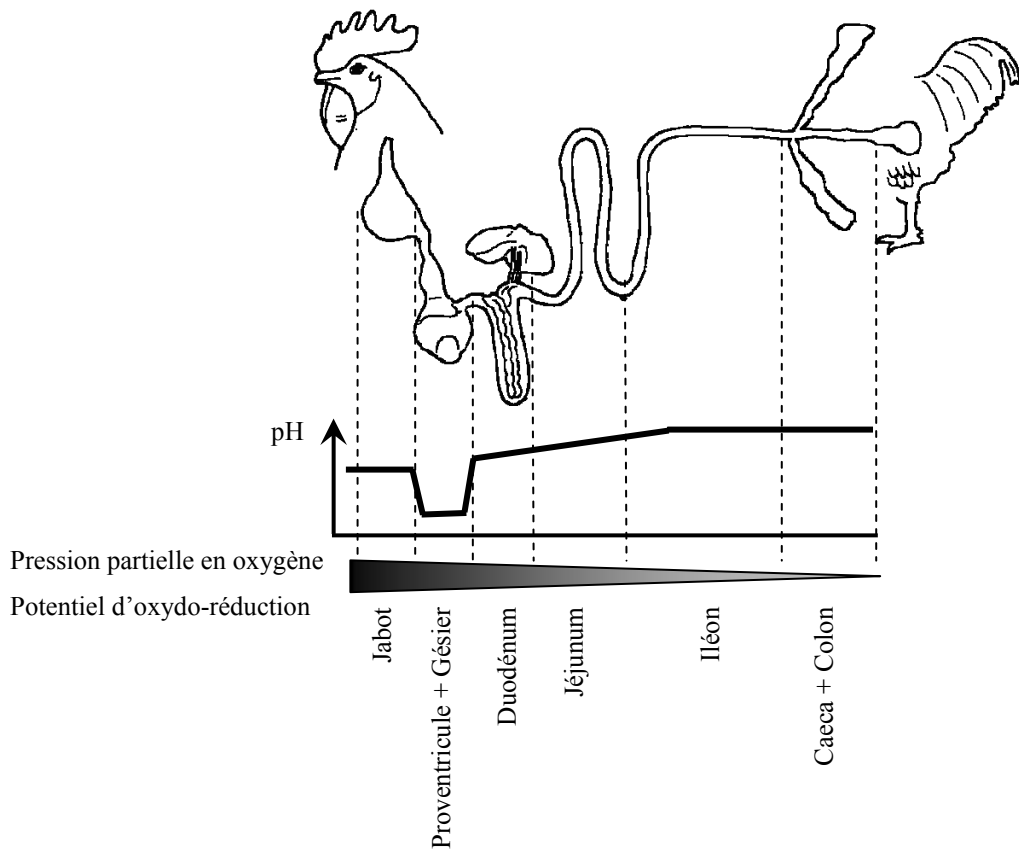


Figure 9 : Représentation schématique de l'évolution des conditions physicochimiques le long du tractus digestif. La pression partielle en oxygène et l'hétérogénéité des digesta diminuent du jabot vers les caeca. Le pH est très faible dans le proventricule et le jabot (1,5-4,0) et légèrement acide dans l'iléon les caeca et le colon.

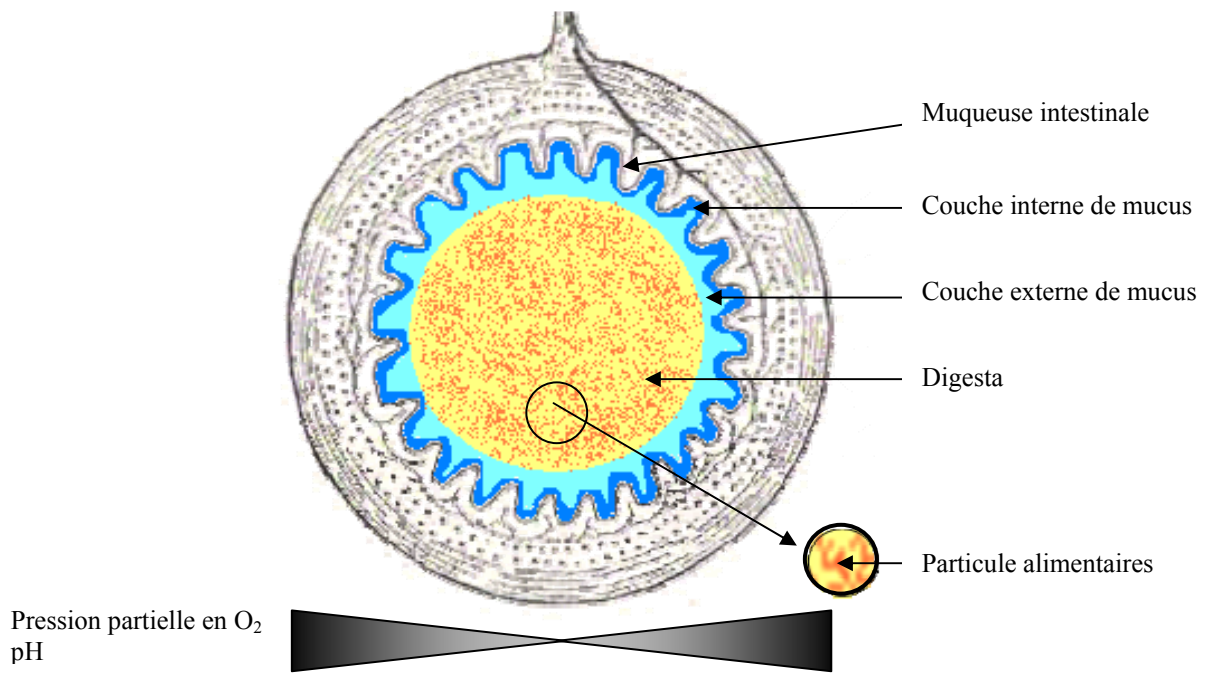


Figure 10 : Représentation schématique de l'évolution transversale des conditions physico-chimiques au sein d'un segment digestif. De la muqueuse digestive vers la lumière, on peut observer la couche interne de mucus (adhérente), la couche externe (non adhérente) et les digesta dans la lumière. Les digesta sont structurés en fractions liquides et particulaires. Les fractions particulaires constitués principalement d'aliments non ou partiellement digérés diminuent en taille en allant du jabot vers les caeca. Au contact de la muqueuse intestinale le pH et la pression partielle en oxygène sont plus élevés.

Chapitre 3 - Le microbiote bactérien digestif

Dans ce chapitre nous traiterons dans un premier temps des différentes méthodes permettant l'étude de la composition des microbiotes bactériens. Ensuite le microbiote bactérien digestif du poulet de chair sera décrit ainsi que son évolution au cours d'une période d'élevage. Enfin, les différents niveaux d'interaction entre hôte et microbiote seront évoqués.

I. Méthodes d'approche des microbiotes bactériens

Différentes méthodes permettent l'étude des microbiotes bactériens complexes comme les milieux digestifs. Elles peuvent être descriptives et permettre ainsi la connaissance des espèces constitutives d'un microbiote (méthodes culturales, microscopie, empreintes et inventaires moléculaires, méthodes de quantification ...). D'autres permettent de s'intéresser aux fonctions portées par les microorganismes : isolement et étude de leur physiologie, étude des génomes complets (métagénomique), étude des ARN messager par transcription inverse d'ARN ciblés ou de façon globale (méta-transcriptomique), études des protéines produites de façon ciblée ou globale (méta-protéomique), étude des métabolites produits de façon ciblée ou globale (métabolomique). Dans cette section nous présenterons brièvement les différentes approches existantes pour étudier les microbiotes digestifs d'un point de vue descriptif (Tableau 8). Nous présenterons plus en détail les méthodes qui ont été utilisées au cours de cette thèse, la PCR en temps réel (Real Time Polymerase Chain Reaction) et la TTGE (Temporal Temperature gradient Gel Electrophoresis).

Tableau 8 : Méthodes de caractérisation de microbiotes bactériens complexes

Objectif	Méthode		Avantages	Limites	
Quantification	Culture	Aérobie	Facilité de mise en oeuvre	Nombreuses bactéries anaérobie stricte	
		Anaérobie		60 à 90% de bactéries non cultivables	
	FISH	Générale		Dessin des sondes	
				Complexité de la matrice digestive	
				Faible temps de stockage des échantillons	
	qPCR		Microscopie	Localisation spatiale	Long
			Cytométrie en flux	Haut débit	Matériel spécifique
SybrGreen			Indépendant de la culture	Extraction d'ADN / PCR	
TaqMan				Spécificité	Dessin des amorces / sondes
Comparaison	Empreinte moléculaire	R/AFLP	Indépendant de la culture	Extraction d'ADN / PCR	
		SSCP		Sans a priori	Nombre limité d'échantillon comparables entre eux (taille du gel)
		DGGE/ TGGE		Relative facilité de mise en oeuvre	Possibilité d'identification non systématique (co-migration)
		TTGE		Possibilité d'identification des bandes	Sensibilité (1%)
		CE-SSCP T-RFLP	Indépendant de la culture	Sans a priori	Extraction d'ADN / PCR
	Biopuces		Haut débit	Pas d'identification possible	
			Sensibilité (0.1%)		
			Indépendant de la culture	Extraction d'ADN / PCR	
			Identification des bactéries	Connaissance à priori	
				Couteux	
				Analyses bioinformatiques complexes	
Inventaire	Séquençage	Clonage	/ Inventaire qui peut être relativement exhaustif selon le nombre de clones	Extraction d'ADN / PCR	
		Séquençage de Sanger		Long	
		Pyroséquençage	Indépendant de la culture	Inventaire exhaustif	Extraction d'ADN / PCR
				Analyses bioinformatiques complexes	

1.1 Systèmes de classification des bactéries

Plusieurs systèmes de classifications des bactéries existent, ils peuvent répondre à deux grands principes : une classification dite phénétique lorsque les organismes sont classés en fonction de critères anatomiques et morphologiques, ou une classification dite phylogénétique lorsqu'ils sont classés sur la bases de leurs probables relations évolutives.

La classification phénétique (ou phénotypique) fait appel à de nombreux critères phénotypique (forme et taille des cellules, spores, mobilité, réactions aux colorations, sources énergétiques et d'azote utilisées, conditions de croissance, type respiratoire, présence de plasmide,...) nécessitant l'isolement et généralement la culture des microorganismes (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007d).

La classification phylogénétique (ou phylétique) est fondée sur les relations évolutives entre espèces. Elle est apparue chez les bactéries avec le développement d'outils permettant la comparaison directe de l'ADN, de l'ARN et, dans une moindre mesure, des séquences protéiques des micro-organismes. Plusieurs méthodes d'études sont utilisées pour caractériser ces probables relations évolutives sur la base de la comparaison des génomes : des comparaisons du contenu en G + C de l'ADN, des comparaisons du taux d'hybridation ADN-ADN ou ADN-ARN entre couples de bactéries, des comparaisons de séquences de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S). C'est cette dernière méthode qui est actuellement la plus utilisée (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007d). Cependant selon les méthodes d'analyses, cela peut conduire à une classification différente des micro-organismes. Cela a conduit au développement d'une classification tenant compte d'un large panel de données phénotypiques, génotypiques et écologiques pour établir une phylogénie consensuelle (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007d).

Les organismes nommés dans ce document le seront autant que possible selon ces normes, cependant quand des articles cités feront appel à une autre classification pour des besoins expérimentaux (inventaires moléculaires basés sur la séquence de l'ADN 16S par exemple), nous citerons les résultats tels que présentés par les auteurs.

1.2 Analyse de la diversité d'un écosystème bactérien

Un écosystème bactérien peut être décrit par la nature des bactéries qui le composent, mais également par leur diversité. La diversité spécifique est une méthode de description d'un écosystème qui évalue le nombre d'espèces différentes présentes dans un biotope. La notion de diversité spécifique associe la notion de richesse spécifique, qui correspond au nombre

d'espèces observées dans un biotope, avec la notion de régularité, qui décrit la façon dont le nombre total d'individus observés se répartit entre les différentes espèces (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007d). Cette mesure permet notamment d'étudier, pour un biotope donné, les successions écologiques, une hétérogénéité spatiale, une évolution temporelle, ou l'effet de facteurs environnementaux. Il est généralement admis que lors des phases de colonisation précoce d'un biotope, la diversité de son écosystème est faible, tandis que la diversité d'un écosystème ayant atteint son équilibre est élevée.

La diversité peut être caractérisée par un grand nombre d'indices écologiques. Parmi ceux-ci, les plus fréquemment employés pour décrire les écosystèmes bactériens sont (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007d) :

- l'indice de Shannon-Weaver qui prend en compte le nombre d'espèces présentes et le nombre d'individu par espèce
- l'indice de Shannon qui exprime l'abondance relative des différentes espèces
- l'indice de Simpson qui mesure la probabilité pour que deux individus choisis au hasard appartiennent à la même espèce
- l'indice de diversité de Hill qui associe les indices de Shannon-Weaver et de Simpson pour mesurer l'abondance proportionnelle
- l'indice de Chao1 qui permet d'estimer la richesse totale d'une communauté

1.3 Méthodes culturelles

La culture des microorganismes constitutifs des microbiotes digestifs, a longtemps été, avec leur observation par microscopie, la seule approche d'étude que nous avons d'eux. Les approches culturelles regroupent (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007c) :

- des méthodes de culture sur gélose nutritive, qui permettent l'isolement, l'identification, la caractérisation et le dénombrement d'espèces bactériennes
- des méthodes de cultures en milieu fermé "*batch*" qui permettent sur un temps assez court d'étudier les métabolites produits ou substrats fermentés par les bactéries inoculées dans le milieu
- des méthodes de cultures continues ou semi continues pour simuler un écosystème digestif

Nous n'aborderons que les méthodes culturelles permettant une description des bactéries composant un microbiote, et leur quantification.

L'isolement, ainsi que la culture et l'identification des microorganismes, se fait à l'aide de différents types de milieux de culture (milieux solides ou liquides, plus ou moins sélectifs, incluant différents types de substrat) dont le choix dépend du type d'organismes que l'on veut cultiver. Les conditions de culture (température, concentration en oxygène, pH, ...) vont également varier selon les bactéries cultivées. Par exemple, le type respiratoire des bactéries va orienter le choix des conditions de croissance. Dans le cas d'organismes anaérobies stricts, des techniques d'anaérobioses sont nécessaires pour permettre leur croissance. Les méthodes culturales, souvent longues et difficiles, permettent l'étude de la physiologie des microorganismes ainsi isolés (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007c).

Cependant, les techniques et milieux de culture actuellement développés ne permettent actuellement la croissance que de 10% à 40% des bactéries existantes (Suau et al., 1999; Lan et al., 2002; Apajalahti et al., 2004). Pour quantifier les bactéries non cultivées, d'autres approches doivent être employées telles que les méthodes moléculaires. Un grand nombre d'entre elles sont basées sur la détection de l'ADN bactérien. D'autres méthodes de dénombrement existent, notamment des techniques de microscopie directe ou de cytométrie de flux qui ne seront pas traitées car elles sont moins employées. (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007c).

1.4 Approches moléculaires basées sur l'ADNr16S

L'utilisation majoritaire de l'ADNr 16S pour réaliser des études phylogénique des bactéries vient du fait que ce marqueur est présent chez toutes les bactéries, qu'il présente des régions très conservées et d'autres très variables, qu'il évolue lentement, qu'il semble peu sujet aux transferts horizontaux entre organismes et qu'il a la même fonction chez tous les organismes (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007d). D'autres marqueurs peuvent cependant être utilisés dans le cas où des espèces sont si proches qu'elles ne possèdent que très peu, voire pas de différences dans les séquences 16S, ou pour discriminer certaines souches d'une même espèce (par exemple une souche pathogène d'une souche non pathogène). Nous ne présenterons ici que les approches basées sur l'ADNr 16S.

1.4.1 Extraction de l'ADN

Les méthodes d'études des microbiotes que nous allons développer dans ce paragraphe font toutes appel à la détection, la quantification ou la caractérisation de l'ADN bactérien. Mis

à part la technique d'hybridation in situ, elles nécessitent toutes que l'ADN bactérien soit extrait des bactéries. Cette étape est donc cruciale car une extraction non exhaustive de l'ADN bactérien, ou une extraction préférentielle de l'ADN de certaines espèces bactériennes, entrainera un biais dans l'analyse du microbiote (Wintzingerode, 1997; Zoetendal et al., 2001b; Liphay et al., 2004).

La composition des matrices où vivent les bactéries est extrêmement variable. Comme indiqué dans le chapitre 2, même en ce qui concerne les matrices digestives, il y a de grandes variations de composition en fonction de l'espèce animale et du segment digestif considéré, mais également de l'âge de l'animal, de son alimentation... De plus la structure des parois bactérienne, et donc leur sensibilité à la lyse, varie fortement d'une espèce à l'autre. De nombreuses méthodes d'extraction de l'ADN bactérien ont donc été développées pour essayer de tenir compte de la complexité des matrices dans lesquelles sont présentes les bactéries (et dont on ne connaît que rarement la composition exacte) et de la variété des organismes cible potentiellement présents. Pour une application particulière il convient donc de choisir la méthode la mieux adaptée ou de développer de façon souvent empirique une méthode plus efficace.

Concernant l'extraction d'ADN bactérien à partir de matrices digestives, il existe à l'heure actuelle de nombreuses approches, plus ou moins automatisées, adaptées à certains types de matrices ou d'applications, mais elles s'articulent toutes autour de 2 étapes clés : la lyse des cellules bactérienne et la purification de l'ADN. La première de ces étapes, la lyse des cellules bactériennes, conduit à la libération de l'ADN. Cette étape peut être réalisée par des approches chimiques, mécaniques, enzymatiques ou par la combinaison de tout ou partie de ces procédés. La seconde de ces étapes consiste à isoler l'ADN des débris cellulaires et des constituants de la matrice entourant les bactéries afin de le purifier et d'éliminer les molécules qui pourraient gêner les méthodes d'analyse ultérieures. Ces procédés doivent entraîner un minimum de dégradation de l'ADN bactérien (Figure 11). Ces deux étapes peuvent être précédées, pour certains types de matrices, d'une étape d'extraction des bactéries de la matrice dont elles sont prisonnières (Nordgard et al., 2005; Rudi et Jakobsen, 2006). Cependant, ce prétraitement pouvant être à l'origine de pertes de bactéries du fait de leurs liaisons aux composants que l'on cherche à éliminer, elle est peu recommandée et peu pratiquée (Roh et al, 2006). L'ADN bactérien récupéré doit être le moins possible contaminé par de l'ADN eucaryote (issu des matières premières ou cellules de l'hôte présent dans les contenus digestifs) pour ne pas interférer avec les analyses ultérieures.

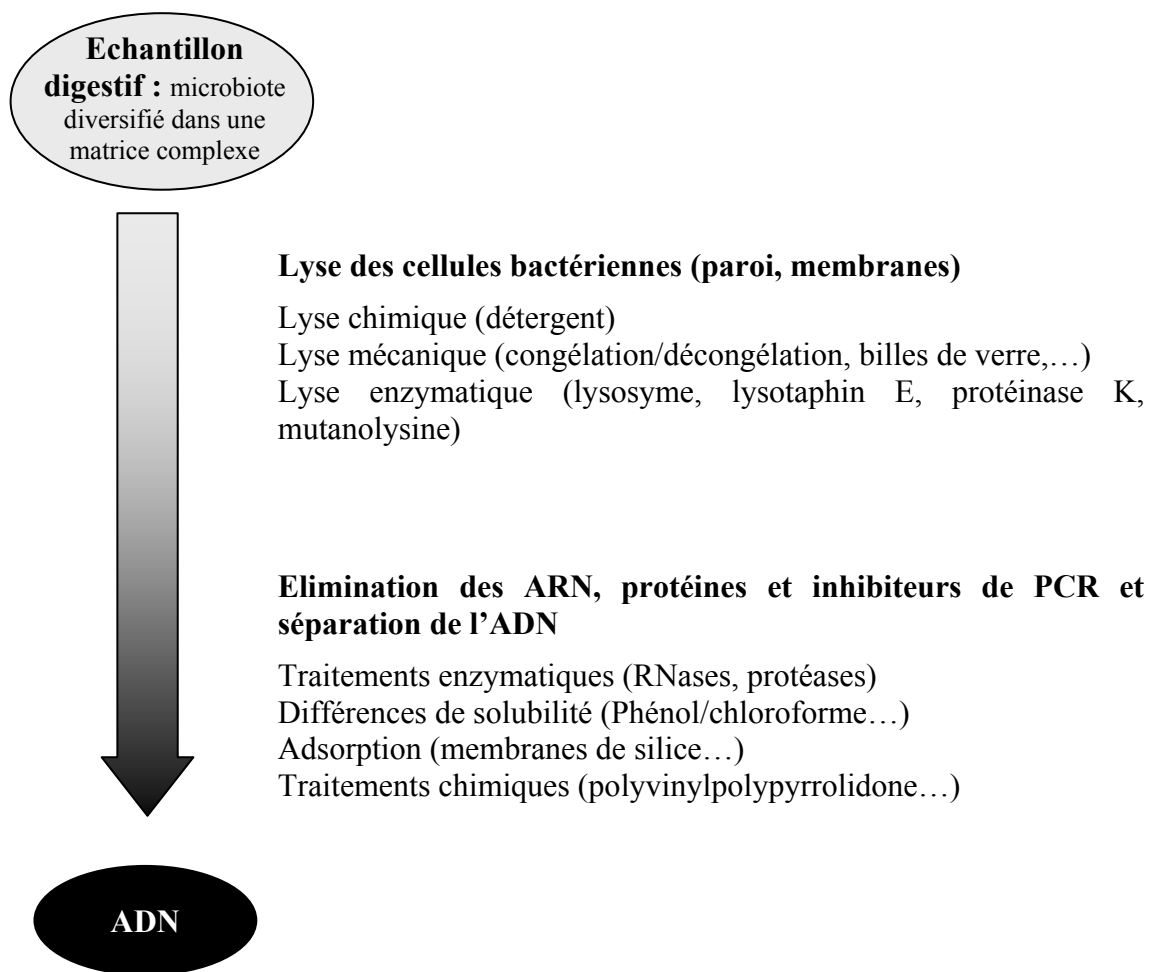


Figure 11 : Les différentes étapes de l'extraction d'ADN bactérien. Les cellules sont lysées, les contaminants protéiques, les ARN et certaines molécules qui peuvent interférer avec les étapes d'analyses ultérieures de l'ADN sont éliminées.

Concernant les bactéries du microbiote digestif, plusieurs études comparatives ont été menées pour déterminer les méthodes permettant l'obtention des meilleurs rendements d'extraction et de l'ADN de meilleure qualité (intégrité, absence d'inhibiteur pour les étapes d'analyse ultérieures). Ces études montrent une efficacité et une qualité d'extraction très variables d'une méthode à l'autre. Ainsi un facteur 1000 peut être observé entre les rendements d'extraction de plusieurs méthodes manuelles ou kits commerciaux testés sur des contenus digestifs (Anderson et Lebepe-Mazur, 2003; Scupham et al., 2007). Ces variations d'efficacité changent selon le segment digestif dont provient l'échantillon, mais également selon l'échantillon (Anderson et Lebepe-Mazur, 2003; Morita et al., 2007). L'efficacité de la lyse des bactéries dépend aussi de leur espèce (Zoetendal et al., 2001b; Morita et al., 2007). La pureté de l'ADN, mesurée par le rapport de l'absorption à 260nm (acides nucléiques) sur l'absorption à 280 nm (protéines), varie également beaucoup, des résultats compris entre 1,4

et 2,2 ont pu être observés selon les kits testés sur des contenus digestifs de dinde (Scupham et al., 2007). Cette mesure représente la contamination protéique de l'échantillon, en général un échantillon est considéré pur pour des valeurs comprises entre 1.7 et 2.

1.4.2 Amplification par PCR de l'ADN bactérien

La majorité des méthodes moléculaires décrites dans ce chapitre font appel au préalable à une amplification de l'ADN bactérien par PCR. Le degré d'inhibition lors d'une PCR faite à partir d'ADN extrait varie lui aussi selon les méthodes d'extraction et le type d'échantillon considéré. Une inhibition des réactions de PCR peut entraîner un biais dans l'analyse ultérieure du microbiote en conduisant à une modification des ratios des différentes séquences d'ADN initialement présentes (Wintzingerode, 1997; Kanagawa, 2003). De nombreuses molécules présentes dans l'échantillon de départ peuvent inhiber la PCR en interagissant avec l'ADN cible ou en le dégradant, mais aussi en inhibant l'action de la polymérase en interférant avec ses cofacteurs comme le Mg^{2+} (Wilson, 1997). Ces composés peuvent se trouver dans la matrice de l'échantillon (polysaccharides végétaux, composés phénoliques... ; Tableau 9). Ils peuvent également provenir des cellules lysées (Wilson, 1997; Monteiro et al., 2001; Santini et al., 2001) et des substances apportées par l'extraction elle-même (Cankar et al, 2006). Leurs effets peuvent être variables selon les amplicons (Cankar et al, 2006).

Comme indiqué précédemment une partie de ces inhibiteurs peut être éliminée lors de l'extraction de l'ADN par différents traitements mécaniques enzymatiques ou chimiques. Il existe également de nombreux procédés de purification de l'ADN, notamment sous forme de kit, qui peuvent être employés après les purifications utilisées lors de l'extraction. Cependant tous les inhibiteurs ne peuvent pas toujours être éliminés, ce qui conduit à l'utilisation d'autres méthodes pour s'en affranchir. La méthode la plus couramment employée étant d'utiliser des échantillons d'ADN très dilués afin de diluer les inhibiteurs dans le volume de réaction PCR pour amoindrir ou stopper leurs effets.

Le choix des amorces influence également la sensibilité de la méthode. Les amorces doivent être spécifiques du groupe de microorganisme étudié pour ne pas détecter d'organismes extérieurs à ce groupe. Elles doivent également cibler une zone suffisamment variable entre les espèces de ce groupe pour que la résolution soit suffisante pour permettre de différencier les espèces de la population (Yu et Morrison, 2004).

Tableau 9 : Nature et origine des inhibiteurs de PCR pouvant être présents dans des échantillons d'écosystèmes digestifs (modifié d'après Wilson, 1997 et Radstrom et al, 2004)

Origine	Nature	
Aliment et animal	Polysaccharides	Polysaccharides non amylacés hydrosolubles des végétaux
	Polysaccharides	Polysaccharides non amylacés non hydrosolubles des végétaux
	Métabolites secondaires de plante	Notamment composés phénoliques
	Composés polyphénoliques	Pigment
	Additifs dans aliment	
	Sels biliaires	
	Produit de dégradation de l'hémoglobine	Bilirubine
	Lipides	Lipides
	Protéines	Tous types
	Minéraux	Ca ²⁺
ADN	ADN non cible (bactérien ou eucaryote)	
Constituants des cellules bactériennes	Glucides, peptides	
Molécules d'origine bactérienne		Acides humiques
		Stercobiline
Contamination lors des prélèvements		Hémoglobine (Noyau porphyrique)
Méthode d'extraction de l'ADN		Sel (NaCl, KCl, ...)
		Détergent
		Solvant organiques
Produits de laboratoire		Poudre de gant
		Matériaux de laboratoire : plastique

1.4.3 Empreinte moléculaire

1.4.3.1 Les différentes méthodes d'empreintes moléculaires

Les méthodes d'empreintes moléculaires permettent d'étudier de manière globale une population bactérienne. Ces études sont basées sur des variations de séquences ou de longueur d'une séquence d'ADN qui va servir de marqueur de la population étudiée. On peut ainsi choisir d'étudier la population bactérienne dans son ensemble ou des sous populations d'intérêt. Ces approches permettent un suivi global et rapide d'une population bactérienne. Elles demandent peu de connaissances du microbiote et sont beaucoup moins coûteuses que les autres techniques permettant une étude des populations globales (bio puces ou séquençage). Ces techniques consistent à amplifier une séquence d'ADN cible, souvent une

région de l'ADNr 16S, permettant de détecter la population microbienne ciblée et de séparer les espèces qui la composent en fonction de cette séquence d'ADN. La séquence est choisie en fonction des objectifs de l'analyse, on peut ainsi cibler les bactéries totales pour avoir une vision globale des populations bactériennes dominantes, ou se focaliser sur une sous population telle que les Lactobacilles (Gérard et al., 2008). Les fragments d'ADN sont alors séparés par électrophorèse soit sur gel, soit sur capillaire. Dans le cas des séparations sur gel, une identification des séquences, et donc des espèces microbiennes, est possible. Cette identification se fait en excisant les bandes du gel pour en séquencer l'ADN, soit directement, soit après clonage dans un plasmide, transformation dans une bactérie compétente, culture et isolement des clones. Les séparations sur capillaire, quant à elles, permettent de traiter de nombreux échantillons en parallèle, mais ne permettent généralement pas d'identification.

Plusieurs méthodes d'empreinte moléculaires existent dont les principales sont : AFLP, RFLP, T-RFLP, ARISA, DGGE et ses dérivés, SSCP et CE-SSCP, ARDRA, RAPD, PFGE, ARISA... Les plus utilisées pour l'étude des microbiotes digestifs notamment de volaille sont présentées ci-dessous :

- l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) et la T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) : les amplicons sont traités par des enzymes de restrictions ce qui permet d'obtenir des fragments de taille différente. Dans le cas de l'AFLP ils sont séparés sur gel et dans le cas de la T-RFLP ils sont séparés sur capillaire.

- l'ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) : les séquences d'ADN inter-géniques situées entre l'ADNr 16S et 23S sont séparées par électrophorèse capillaire sur la base de leur longueur. Cette technique est très discriminante.

- la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), la TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) et la TTGE (Temporal Temperature gradient Gel Electrophoresis) : ces techniques sont basées sur la séparation des fragments d'ADN en fonction de leur vitesse de dénaturation qui est liée à leur composition en base (figure 12). Les fragments d'ADN ayant une plus forte proportion de bases G et C ont une température de dénaturation plus élevée car il faut apporter plus d'énergie pour ouvrir une paire de base GC (3 liaisons) qu'une paire de base AT (2 liaisons). Dans le cas de la DGGE la séparation se fait sur gel contenant un gradient d'un agent dénaturant, l'urée. Dans le cas de la TGGE et TTGE il s'agit de gradients thermiques le long du gel (TGGE) ou établis dans le temps (TTGE). Les

séparations se faisant sur gel, les microorganismes peuvent être identifiés. La DGGE est très couramment utilisée pour l'étude de microbiotes digestifs, notamment ceux de volailles, et la TTGE est également utilisée pour ce type de microbiote bien que moins fréquemment.

- la SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) et la CE-SSCP (Capillary Electrophoresis Single-Strand Conformation Polymorphism) : ces méthodes sont basées sur la séparation des fragments d'ADN simples brins, dénaturés en fonction de leur conformation. Cette conformation est liée à la séquence du fragment. La séparation se fait sur gel dans le cas de la SSCP et sur capillaire dans le cas de la CE-SSCP.

1.4.3.2 Méthodes d'analyses des empreintes moléculaires

Les gels, une fois révélés, se présentent sous la forme de pistes constituées de bandes d'intensités différentes, tandis que les résultats des méthodes sur capillaires en sortie d'analyseur se présentent sous la forme de courbes d'intensité en fonction du temps d'analyse. En première approximation on considère qu'une bande, pour les gels, ou un pic, pour les capillaires, correspond à une espèce bactérienne. Cependant, la co-migration d'amplicons de séquences proches peut conduire à un biais d'interprétation, une bande ou un pic pouvant être la contribution de plusieurs espèces.

Ces méthodes permettent la détection des espèces contribuant pour plus de 1% à la population ciblée totale, mais pas des espèces moins abondantes (Muyzer et Smalla, 1998).

Les gels ou profils bruts peuvent donner des informations : ils peuvent permettre de détecter la disparition, l'apparition ou un fort changement d'importance d'une bande. Celle-ci pouvant être identifiée par séquençage de l'ADN contenu dans la bande (Zhu et al., 2002; Thompson et al., 2008) (Figure 13 A). Il est à noter que la taille des amplicons dépend du couple d'amorce choisis pour l'amplification. Or la taille des amplicons est un facteur limitant pour leur identification. Plus celle-ci sera importante, plus la précision de l'identification sera grande. Une taille d'environ 500pb est recommandée (Muyzer et Smalla, 1998).

Le traitement des images de gels ou des courbes d'intensité des capillaires et leur analyse statistique permet d'avoir accès à d'autres types d'information comme la similarité des profils au sein d'un groupe d'échantillon ou entre groupes d'échantillons, l'influence d'un facteur sur cette similarité ou la localisation des zones du profil impliqués dans la variabilité observée en comparant plusieurs profils (Fromin et al., 2002; Zhu et al., 2002; Thompson et al., 2008; Michelland et al., 2009) (Figure 13 B).

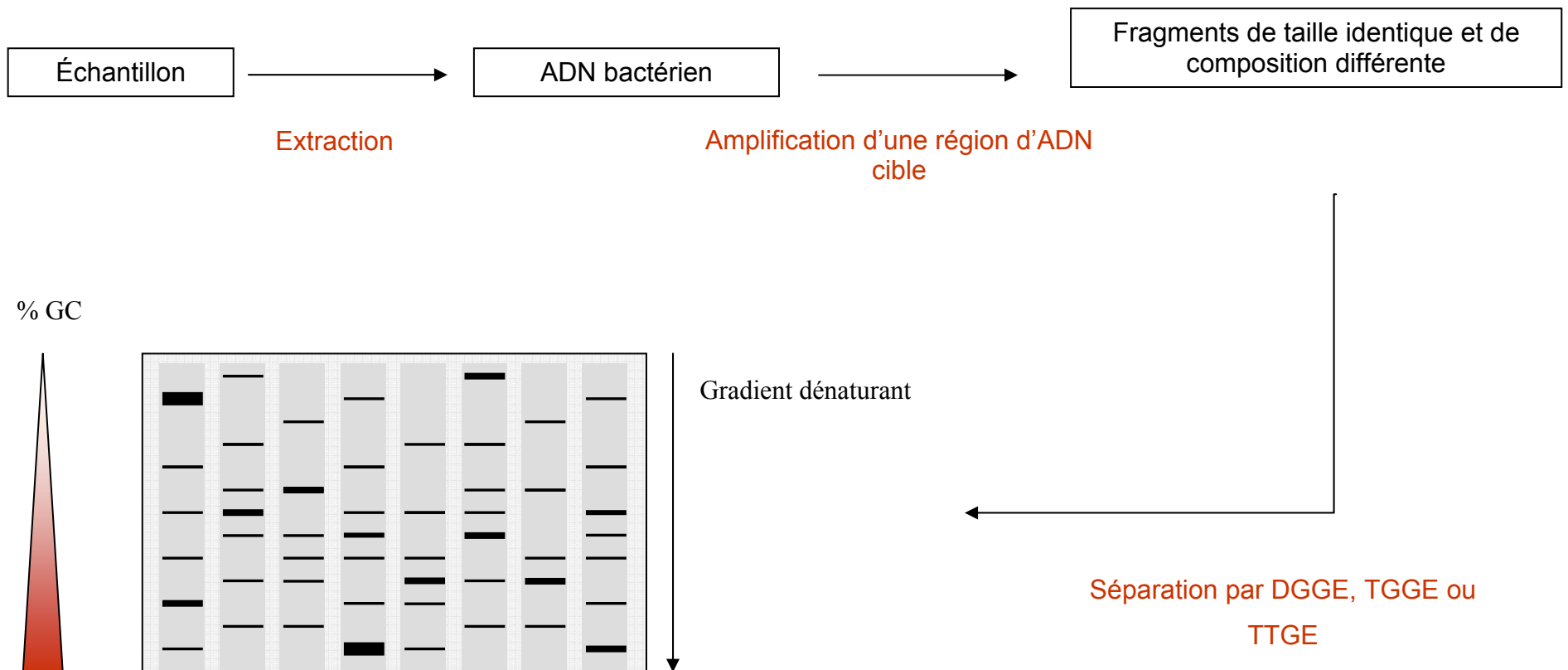


Figure 12 : Les étapes de l'analyse par DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) ou TTGE (Temporal Temperature gradient Gel Electrophoresis) d'une population bactérienne. Dans un premier temps l'ADN bactérien est extrait de l'échantillon. Ensuite une région d'ADN cible est amplifiée, choisie en fonction du groupe bactérien à étudier (Bactéries totales, Famille ou genre particulier, espèce pour étudier son polymorphisme...). Enfin les fragments d'ADN produits sont séparés en fonction de leur composition en bases G et C par électrophorèse sur gel en fonction d'un gradient de température dans le temps.

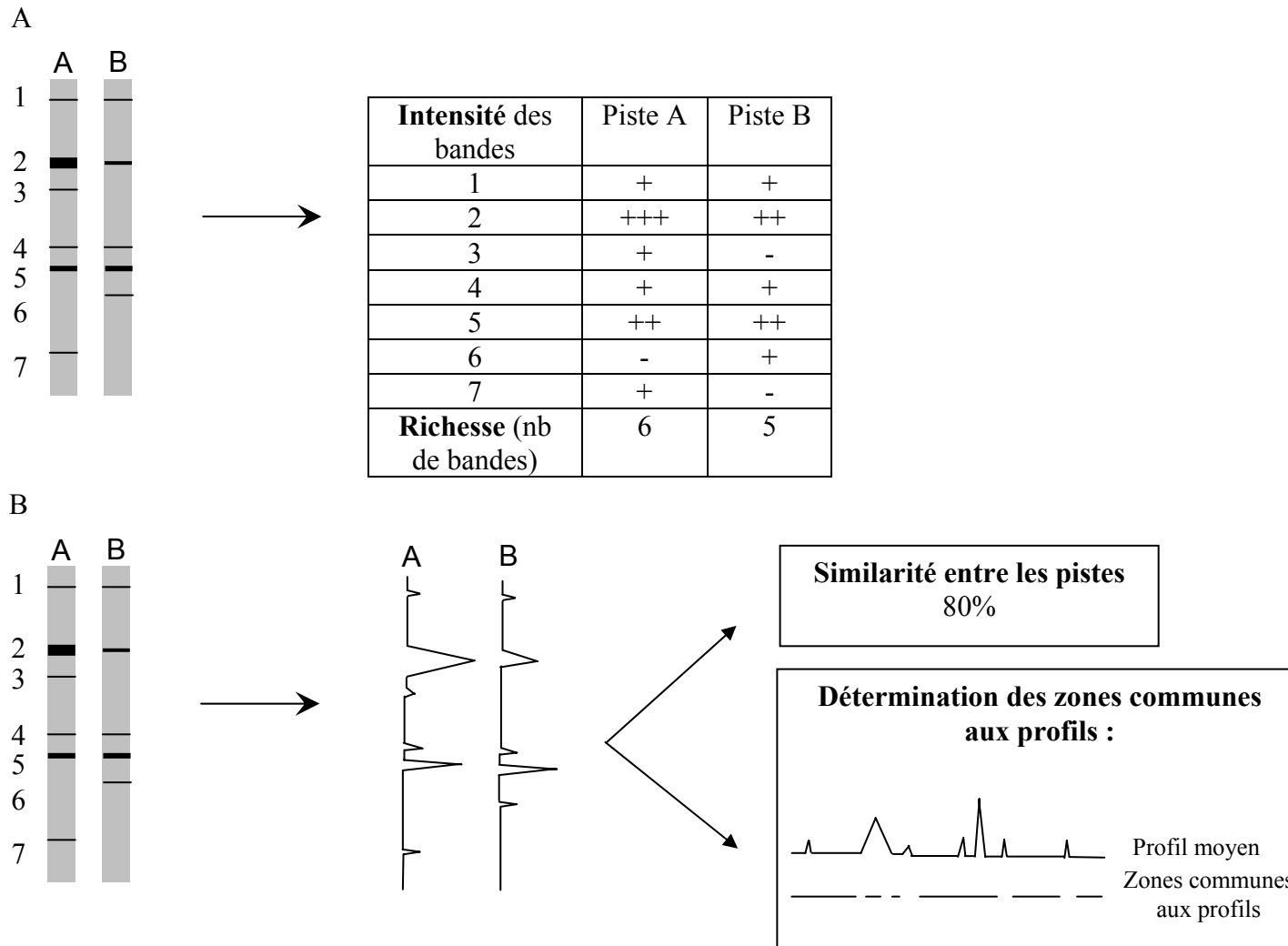


Figure 13 : Représentation schématique des analyses effectuées sur les profils d’empreintes moléculaires sur gel. (A) A partir des gels bruts l’apparition, la disparition ou le changement d’intensité de bandes peut être mis en évidence, et la richesse déterminée. (B) A partir des courbes d’intensité ou de profils binaires (présence ou absence de bande) obtenus en numérisant les images, des analyses statistiques peuvent être effectuées concernant la similarité entre profils ou les zones du gel communes à différents profils

1.4.4 Inventaire moléculaire par séquençage

Les méthodes de séquençage permettent de procéder à des inventaires moléculaires d'un microbiote. C'est-à-dire qu'elles permettent de connaître la diversité et l'identité et dans une certaine mesure de quantifier les espèces constituant un microbiote sur la base du séquençage de régions cibles de leur ADNr 16S. Le niveau de connaissance du microbiote dépend alors du nombre de fragments d'ADN séquencés. Plus ce nombre est important plus l'inventaire sera exhaustif et représentatif car en multipliant les fragments séquencés les chances de séquencer ceux d'espèces minoritaires ou rares augmentent, de même que les chances que la population séquencée soit représentative de la population totale. Les réactions de séquençage consistent à effectuer une PCR en détectant les nucléotides incorporés pour synthétiser le fragment d'ADN séquencé (complémentaire au fragment issu de l'échantillon).

1.4.4.1 Clonage et séquençage de Sanger

Dans cette approche le gène d'intérêt, généralement codant pour l'ARNr 16S est amplifié par PCR. Ensuite les amplicons sont insérés dans des plasmides qui sont transformés dans des bactéries compétentes généralement une souche d'*Escherichia coli*. Les cellules sont alors cultivées et chaque clone est isolé. Ensuite chaque clone est séquencé par le protocole de Sanger. C'est-à-dire que dans la réaction de PCR permettant le séquençage, on ajoute aux quatre désoxyribonucléotides nécessaires à la synthèse du nouveau fragment d'ADN (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), une beaucoup plus faible concentration de ces quatre désoxyribonucléotides marqués par quatre fluorochromes différents. Lorsque l'un de ces désoxyribonucléotides marqué est intégré au fragment en cours de synthèse, la synthèse du fragment est stoppée. Les amplicons produits sont donc de tailles différentes et portent un désoxyribonucléotide marqué par un fluorochrome en 3' terminal. Les fragments peuvent alors être séparés par électrophorèse capillaire sur gel de polyacrylamide et leur fluorescence analysée. On peut ainsi déterminer en quelle position se trouve quel nucléotide. Cette approche a été utilisée pour l'étude du microbiote du poulet (Lan et al., 2002; Zhu et al., 2002; Gong et al., 2007). Elle présente cependant l'inconvénient d'être relativement longue et coûteuse, et depuis quelques années des méthodes alternatives se développent.

1.4.4.2 Pyroséquençage

Le pyroséquençage est une approche de séquençage récente qui permet de traiter un grand nombre de séquences simultanément (Ahmadian et al., 2006). Lors de la réaction de pyroséquençage, chaque amplicon à séquencer est fixé sur une bille individuelle et plusieurs dizaines de milliers de billes sont traitées simultanément. L'opération consiste à lire les nucléotides synthétisés au fur et à mesure de la synthèse du brin d'ADN complémentaire à celui fixé. Pour cela un nucléotide déterminé (A, T, G ou C) est ajouté dans le milieu. Si ce nucléotide est incorporé par la polymérase au fragment d'ADN en cours d'élongation, son incorporation entraîne la libération d'une molécule de pyrophosphate (molécule contenant deux groupements phosphate). Une ATP sulfurylase transforme alors la molécule de pyrophosphate et une molécule d'adénosine phosphosulfate en ATP. Cet ATP permet la transformation de luciférine en oxyluciférine par la luciférase. Cette réaction émet un signal lumineux qui est capté par un scanner qui traite séparément chaque bille (Figure 14). Les nucléotides en surplus sont alors dégradés par l'ajout d'une apyrase. Un nucléotide différent est alors ajouté et le processus recommence.

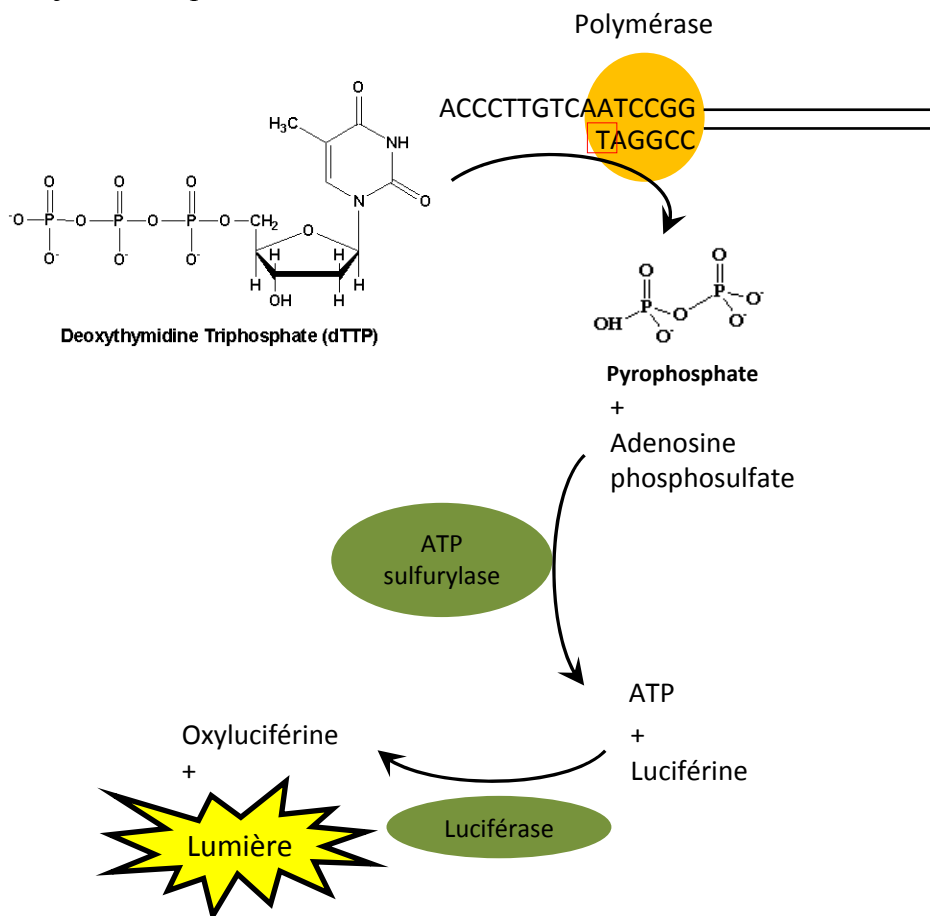


Figure 14 : Représentation schématique d'une réaction de pyroséquençage. Le schéma représente l'incorporation d'un dTTP dans la chaîne d'ADN en cours d'élongation et la cascade de réactions enzymatiques conduisant à l'émission de lumière.

Cette technologie permet d'analyser rapidement un grand nombre de séquences (plusieurs millions de bases par heure). Cependant l'analyse des résultats demande des traitements bioinformatiques qui sont long et complexes. De plus la taille des fragments qui peuvent ainsi être analysés est limitée (<400 pb), bien qu'en constante évolution, ce qui rend difficile les identifications au niveau de l'espèce. Cette technologie n'est encore que peu utilisée pour l'analyse des microbiotes de volaille probablement à cause des limitations liées à la longueur des séquences et au coût qui reste assez important même si inférieur au coût d'un séquençage de Sanger si on le ramène au coût par base. Cependant les premiers travaux concernant les microbiotes digestifs de volaille commencent à être publiés depuis quelques années (Qu et al., 2008; Callaway et al., 2009; Wei et al., 2009).

1.4.5 PCR en temps réel

La PCR en temps réel (ou qPCR pour PCR quantitative) est une méthode permettant de quantifier une séquence ADN cible dans un milieu. Elle est basée sur le principe de la PCR qui permet théoriquement à partir d'une copie d'une séquence d'ADN cible de l'amplifier pour pouvoir la détecter. Dans le cas de la PCR en temps réel, un "*reporter*" fluorescent est ajouté, dont l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Or la quantité d'amplicons produits étant proportionnelle à la quantité d'ADN de départ, on peut ainsi quantifier l'ADN cible (Poitras et Houde, 2002). La PCR en temps réel permet d'effectuer une quantification de l'ADN cible dite absolue, quand une gamme étalon contenant des concentrations connues de cet ADN est utilisée, ou relative, quand le niveau de détection de l'ADN cible est comparé à celui de plusieurs gènes de référence dont la quantité n'est pas forcément connue. Il existe plusieurs méthodes mathématiques de calcul qui permettent de relier la fluorescence détectée à la quantité d'ADN initialement présent dans la réaction et l'exactitude des résultats obtenus en dépend fortement. Ces méthodes permettent de calculer l'efficacité de la réaction d'amplification à partir de la gamme étalon et de l'appliquer aux échantillons analysés selon une équation du type $N_0 = N_t / (E+1)^{C_t}$.

Avec :

- N_0 = la quantité d'ADN cible initiale
- N_t = le nombre d'amplicon au cycle de PCR correspondant au seuil de fluorescence
- E = l'efficacité de la réaction
- C_t = le nombre de cycles atteints au seuil de fluorescence (Rutledge et Côté, 2003; Karlen et al., 2007).

Selon les méthodes mathématiques utilisées par les logiciels de calculs, le calcul de l'efficacité de réaction et la détermination du seuil de fluorescence peuvent être différents.

Le choix des amorces est extrêmement important. Dans le cas de l'étude d'un microbiote digestif, il va conditionner, si l'on quantifie la population bactérienne totale, un groupe de bactéries ou une espèce particulière. Concernant l'étude de groupes bactériens, il faut pouvoir dessiner des amorces capables de détecter le plus grand nombre possible d'espèces du groupe cible tout en ne détectant que très peu de séquences appartenant à d'autres groupes.

1.4.5.1 SYBR Green

Dans le cas de la technologie SybR green, la fluorescence qui va être détectée est produite par le SybR green ajouté dans la réaction. Cette molécule a la propriété de se fixer à l'ADN double brin. Quand elle est libre dans la solution elle n'émet que peu de fluorescence alors que quand elle est liée à l'ADN sa fluorescence est importante et peut donc servir à quantifier le nombre d'amplicons présents. La fluorescence est en effet proportionnelle au nombre de molécules fixées à l'ADN double brin et donc à la longueur et au nombre de fragments d'ADN double brin présents. (Figure 15).

1.4.5.2 TaqMan

Dans le cas de la technologie TaqMan, la fluorescence qui va être détectée est produite par un fluorochrome, appelé *reporter*, fixé sur une sonde complémentaire à une séquence d'ADN situé entre les zones reconnues par les amorces. Sur cette sonde est également fixé un second fluorochrome appelé *quencher*. Le *reporter* transfère sa fluorescence sous forme d'énergie au *quencher* par un principe appelé FRET (fluorescence resonance energy transfer). Lors de l'étape d'hybridation, la sonde se fixe aux amplicons présents dans la réaction, mais lors de l'étape d'élongation la polymérase va dégrader ces sondes grâce à son activité 5' exonucléase. Le *quencher* et le *reporter* vont être séparés, et le *reporter* émet sa fluorescence qui sera détectée et quantifiée. La fluorescence émise est proportionnelle au nombre de sondes qui ont été dégradées pendant la réaction et donc au nombre de molécules d'ADN qui ont été synthétisées (Figure 16).

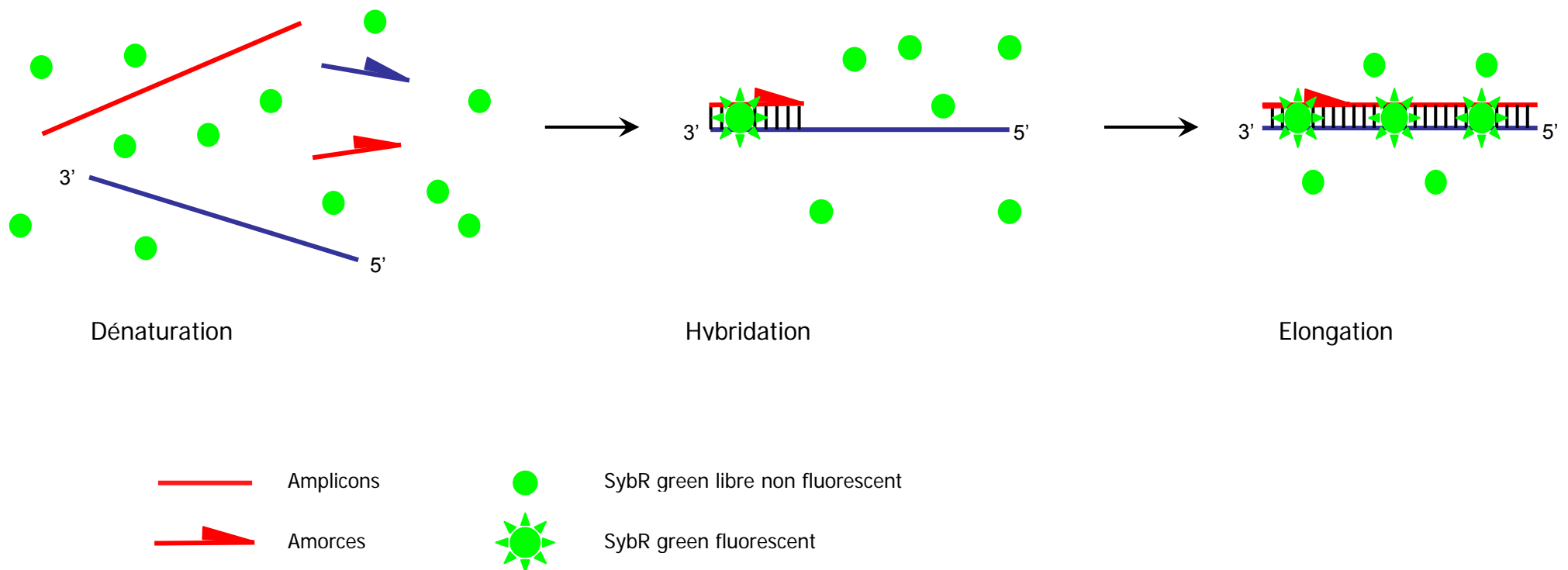


Figure 15 : Les étapes de l'amplification en temps réel par la technologie SybR green. Durant la phase de dénaturation l'ADN cible et les amplicons sont dénaturés. Pendant la phase d'hybridation les amorces se fixent à leur séquence cible et le SybR Green se fixe au fur et à mesure à aux ADN double brin se formant, il est alors fluorescent. Enfin lors de la phase d'élongation la polymérase synthétise un nouveau fragment d'ADN, la quantité d'ADN est alors doublée dans le milieu. Le SybR green se fixe sur l'intégralité de ces fragments nouvellement amplifiés, entraînant une augmentation de fluorescence proportionnelle à la quantité d'ADN amplifiée

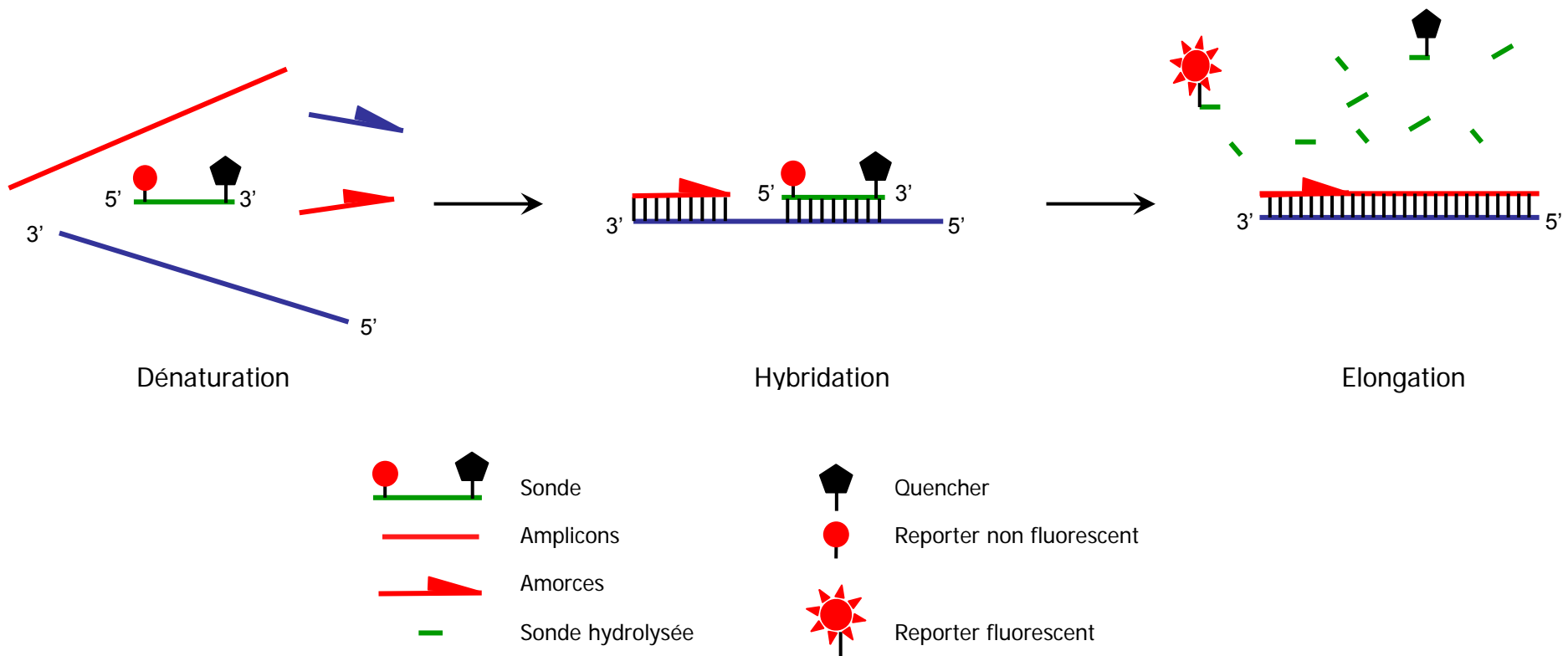


Figure 16 : Les étapes de l'amplification en temps réel par la technologie TaqMan. Durant la phase de dénaturation l'ADN cible et les amplicons sont dénaturés. Pendant la phase d'hybridation les amorces et la sonde se fixent à leur séquence cible. Enfin lors de la phase d'élongation la polymérase synthétise un nouveau fragment d'ADN, la quantité d'ADN est alors doublée dans le milieu. De plus, grâce à son activité 5'exonucléase, la polymérase dégrade la sonde et libère le *reporter* qui devient alors fluorescent.

1.4.6 Méthodes d'hybridation

Les techniques d'hybridation consistent à détecter ou quantifier les bactéries d'un échantillon en hybridant une sonde formée par un oligonucléotide complémentaire à une région de l'ADN spécifique à la cible, généralement une région de l'ADNr 16S. Cela suppose de connaître la séquence du gène cible des espèces recherchées.

1.4.6.1 FISH

L'hybridation *in situ* (Fluorescent In Situ Hybridization, FISH) ne nécessite pas d'étape d'extraction d'ADN. Elle consiste à utiliser des sondes marquées de fluorochromes qui se fixent de manière spécifique à l'ARN ribosomique des bactéries, ce qui permet leur coloration. Les bactéries doivent être préalablement perméabilisées pour permettre l'accès de la sonde. Les bactéries fluorescentes peuvent alors être dénombrées en microscopie à épifluorescence ou par cytométrie en flux. Le principal avantage de cette technique est qu'elle ne nécessite pas d'extraire l'ADN et qu'elle permet de localiser les bactéries dans leur milieu. Cependant c'est une technique qui comme la PCR en temps réel nécessite de connaître la séquence de l'ADNr 16S des bactéries que l'on veut identifier, et donc de rechercher des bactéries ou des groupes bactériens en particulier. De plus, sa sensibilité est moins grande que celle de la PCR en temps réel.

1.4.6.2 Biopuces phylogéniques

Les biopuces sont des supports de la taille d'une lame de microscope sur lesquels plusieurs dizaines de milliers de sondes sont déposés sous forme de spot, chacune correspondant à un gène unique. Ces spots sont composés de plusieurs copies des sondes complémentaires aux séquences d'intérêt. Dans le cadre de l'étude phylogénétique d'un microbiote, ce sont des séquences de l'ADNr 16S des espèces bactériennes potentiellement présentes. Cette méthode permet d'étudier simultanément la présence de plusieurs milliers de bactéries dans un échantillon. Ces méthodes ne sont encore que peu développées pour l'étude des écosystèmes digestifs mais sont prometteuses pour suivre les modifications globales d'un microbiote digestif suite à une perturbation telle que l'apport d'un additif alimentaire (Carey et al., 2007).

II. Microbiote digestif du poulet de chair

Dans cette section nous traiterons du microbiote bactérien digestif du poulet de chair. Nous aborderons les différentes étapes de la mise en place de ce microbiote. Ensuite nous traiterons de sa structuration spatiale. Enfin nous traiterons du métabolisme de certains groupes bactériens majoritaires dans le but d'illustrer quelques mécanismes permettant leur implantation et leur persistance dans le tractus digestif du poulet.

Le microbiote digestif des poulets est constitué en grande majorité de bactéries comme le montre une analyse métagénomique du microbiote de l'intestin grêle de poulet (Kim et Mundt, 2011). Ainsi, la grande majorité de séquences identifiables appartient aux bactéries (91,6%), alors que les séquences d'eucaryotes représentent 4,2% des séquences totales identifiées, les virus 3,8%, et les archaebactéries 0,4%. On peut aussi noter que 59,3% des séquences ne sont pas identifiées. En terme de nombres de cellules, les bactéries représentent 10^{11} cellules / g dans les caeca (Apajalahti et al, 2004) et les archaebactéries représentent environ 10^5 à 10^8 cellules/g (Saengkerdsut et al., 2007). Nous ne traiterons ici que des populations bactériennes qui sont les plus abondantes.

2.1 Colonisation du tractus digestif

2.1.1 Avant éclosion

L'implantation de bactéries dans le tractus digestif du poulet se fait très tôt dans la vie de l'animal. Contrairement à ce qui est rapporté dans de nombreuses revues, cette colonisation semble pouvoir commencer dès la vie embryonnaire (Kizerwetter-Swida et Binek, 2008; Pedrosa et al., 2008 ; de Oliveira et al, 2010). Ainsi, l'équipe de Kizerwetter-Swida et Binek (2008) a pu détecter la présence de bactéries dans les contenus caecaux et le sac vitellin d'embryons de 18j (20% des animaux) et 20j (40% et 60% des animaux dans les caeca et le sac vitellin respectivement), l'éclosion ayant lieu généralement après 21 à 22j d'incubation. Chez ces embryons de 18j, la population bactérienne était de l'ordre de 1×10^2 unités formant colonie/g (UFC/g) dans les deux segments et constituée d'*Enterococcus*, *Staphylococcus* et *Micrococcus*. A 20j d'incubation le microbiote était plus abondant (de l'ordre de 1×10^5 UFC/g) et plus diversifiée dans les caeca (*Enterococcus*, *Staphylococcus*, *E.coli*, *Enterobacter*). Cette colonisation bactérienne pourrait avoir lieu durant la formation de l'œuf comme cela a été montré pour des bactéries pathogènes (Buck et al., 2004), mais également

être due à la pénétration de bactéries à travers la coquille de l'œuf (Berrang et al., 1999; Rosario et al., 2004) qui pourrait avoir lieu lors des différentes étapes de transport et de stockage de l'œuf entre le lieu de ponte et l'incubateur (Figure 17). Cette population bactérienne commensale est très faible et l'on peut penser qu'elle est donc largement supplantée par les bactéries présentes lors de l'éclosion. Cependant, elle pourrait avoir une action sur le tractus digestif du fait des effets des bactéries sur le développement du tractus digestif comme on le verra plus loin.

2.1.2 Après éclosion

Une communauté bactérienne relativement abondante est rapportée dès les premières heures suivant l'éclosion dans le jabot, l'iléon et les caeca : de 10^5 à 10^8 UFC/g de contenus dans le jabot, de 10^6 à 10^9 UFC/g de contenu dans l'intestin grêle et de 10^6 à 10^{10} UFC/g de contenus dans les caeca (Smith, 1965a; Mead, 1989; Guan et al., 2003; Kizerwetter-Swida et Binek, 2008). Ces populations bactériennes sont déjà assez diversifiées, de 8 à 39 bandes ont été détectées par DDGE dans les différents segments digestifs (Hume et al., 2003; Pedroso et al., 2005).

Dans les jours suivants l'éclosion, la population bactérienne augmente en abondance (Barnes 1979 ; Apajalahti et al., 2004). Le microbiote digestif se diversifie et passe par plusieurs phases de colonisation durant la période d'élevage d'un poulet (Gong et al., 2008). Ainsi van der Wielen et al., (2002) ont montré une diversification du microbiote entre 1 et 11j dans tous les segments, puis une stabilisation malgré quelques fluctuations dans le jabot. Lu et al., (2003) ont montré une évolution continue du microbiote de l'iléon et des caeca de poulets de 3 à 49j. De la même manière Hume et al., (2003) et Torok et al., (2007) ont pu montrer une évolution du microbiote du jéjunum et des caeca pendant une durée d'élevage standard (32 et 42j pour ces études respectivement). De même, les études réalisées par culture ont montré que la composition du microbiote se stabilise vers 20j dans l'iléon et vers 30 à 40j dans les caeca (Mead, 1989). Ces modifications pourraient être liées à l'évolution du microbiote vers son état d'équilibre. En effet, lorsqu'un milieu vierge est colonisé, on assiste à l'arrivée successive de différentes populations, d'abord les espèces pionnières, puis l'écosystème se diversifie par l'établissement d'espèces plus spécialisées et les réseaux d'interactions entre espèces se complexifient (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007d). Le développement d'une espèce par rapport à une autre, dans un environnement donné, est fonction de différents paramètres

comme son taux de croissance et son besoin énergétique, son affinité pour les substrats disponibles et sa capacité à y adhérer, ainsi que sa résistance aux conditions environnementales (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007a). De plus, les nombreuses étapes de maturation du tractus digestif qui suivent la première alimentation des animaux pourraient influencer la composition du microbiote digestif et expliquer en partie son évolution au cours de la vie de l'animal (Noy et al., 2001; Batal et Parsons, 2002; Suzuki et al., 2008).

2.1.3. Facteurs influençant le microbiote

Des facteurs génétiques peuvent avoir une influence sur la composition du microbiote comme cela a pu être montré chez l'homme en comparant le microbiote de jumeaux homozygotes dont la similarité est plus élevée que pour des jumeaux hétérozygotes ou des personnes non apparentées (Zoetendal et al., 2001a; Stewart et al., 2005). Le microbiote fécal de souris est également régulé par des facteurs génétiques, ce qui a été montré en comparant des souches congéniques pour le complexe d'histocompatibilité majeur (Toivanen et al., 2001). Dans cette dernière étude, l'environnement génétique des différentes souches avait une influence sur la similarité interindividuelle du microbiote, de même que les gènes codant pour le complexe d'histocompatibilité majeur au sein d'un même environnement génétique. Chez le poulet, un effet du sexe et de la souche ont pu être montrés (Lumpkins et al., 2008; Lumpkins et al., 2010, Konsak, 2011).

La composition du microbiote semble également liée à la nature des bactéries auxquelles sont exposés les animaux. Ainsi, Torok et al., (2007) ont pu montrer que le microbiote de poulets élevés dans des conditions d'élevage standard se différencie de celui de poulets élevés en isolateur contenant une charge bactérienne réduite. De la même manière, Mulder et al., (2009) ont montré une influence de l'environnement des animaux chez des porcs génétiquement apparentés et élevés soit en claustration, soit avec un accès à l'extérieur. Yin et al., (2010) ont également montré une influence des bactéries environnantes en comparant le microbiote digestif de poulets inoculés ou non par différents microbiotes caecaux, mimant ainsi l'ingestion de différentes matières fécales par les animaux.

Comme indiqué dans le chapitre 2 concernant le tractus digestif, la composition des contenus digestifs est fortement influencée par l'alimentation de l'animal en termes de matières premières et d'additifs alimentaires. Or les différents composants des contenus digestif vont interagir avec les bactéries en favorisant (substrats, facteurs de croissance) ou en

inhibant (molécules anti bactériennes) leur croissance, ce qui va modifier la composition du microbiote. De plus, l'aliment et l'eau de boisson n'étant pas stériles, ils peuvent en modifier la composition du microbiote en introduisant de nouvelles bactéries dans le tractus.

D'autres facteurs liés à l'animal peuvent également influencer sur la composition du microbiote digestif. Par exemple celui d'un individu sain se différencie de celui d'un individu malade (Duerkop et al., 2009; Barbosa et Rescigno, 2010). Le niveau de stress joue également un rôle dans la composition du microbiote digestif (Collin, 2009) probablement en modifiant la physiologie digestive (Wood, 2007).

Ainsi, durant sa vie, l'animal est exposé à la présence de nombreuses bactéries dans son environnement qui contribuent à influencer la composition de son microbiote digestif (figure 17). De plus de nombreux facteurs liés à l'animal (génétique, statut sanitaire) et à son mode d'élevage (alimentation, environnement, stress) vont contribuer à le modifier (figure 17).

ORIGINE des BACTERIES dans l'environnement de l'animal au cours de son

FACTEURS pouvant avoir une influence sur les bactéries colonisant

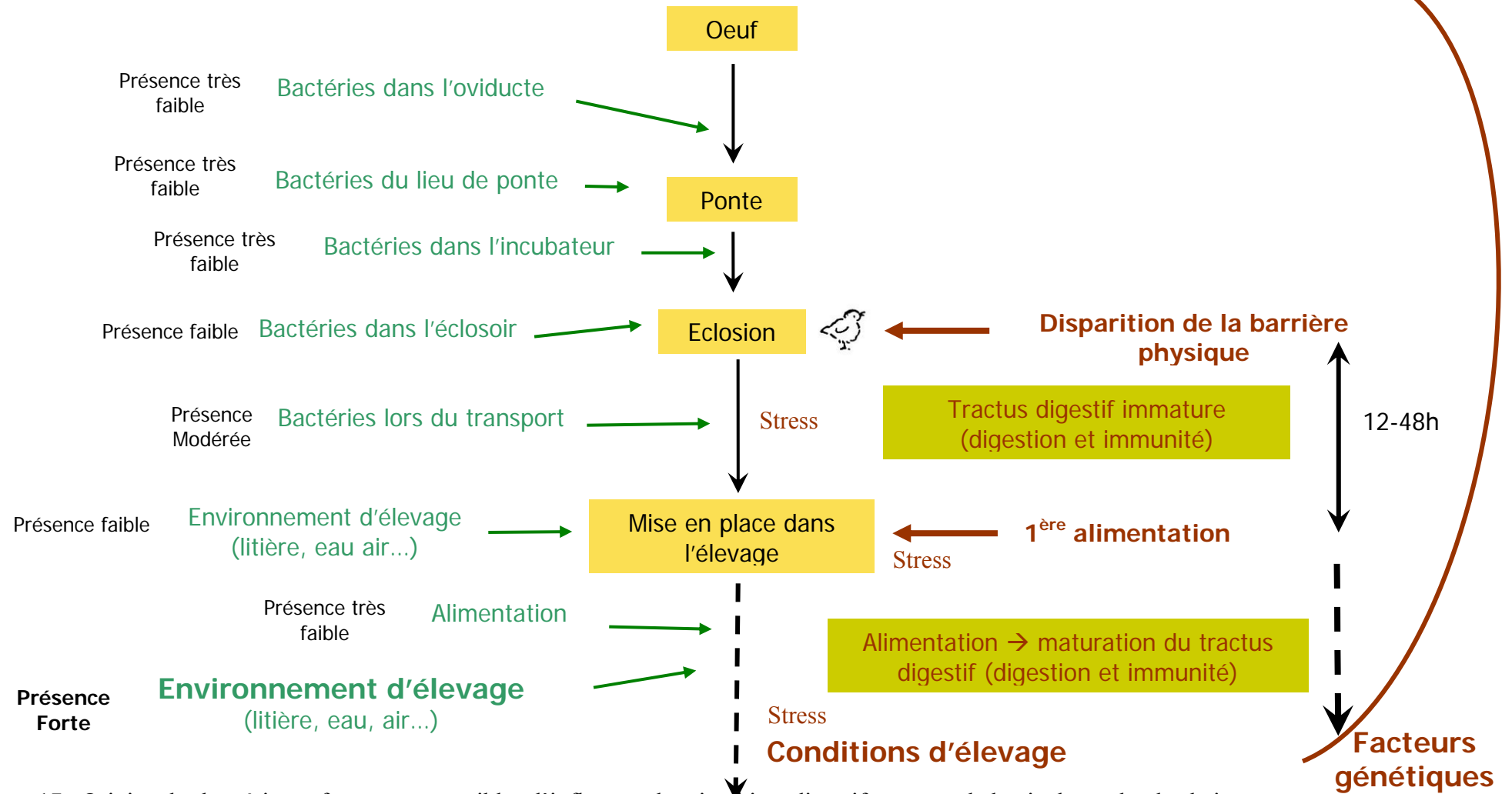


Figure 17 : Origine des bactéries et facteurs susceptibles d'influencer le microbiote digestif au cours de la vie du poulet de chair

2.2 Structuration spatiale du microbiote digestif le long du tractus digestif

2.2.1 Dans les contenus digestifs

Les conditions physico-chimiques (pH, pO₂, ...), le temps de séjour des digesta, le niveau de digestion des aliments, le type de particules, les molécules et enzymes présentes varient d'un segment digestif à l'autre comme indiqué au chapitre 2, consacré à la physiologie digestive. Ainsi, la pression partielle en oxygène et le potentiel d'oxydoréduction diminuent en allant du jabot vers les caeca. Le pH compris entre 4,5 et 6,5 dans le jabot, diminue fortement dans le proventricule et le gésier (1,8 à 4,0) et réaugmente progressivement dans l'intestin grêle pour n'être plus que légèrement acide dans l'iléon, les caeca et le colon. La structure des contenus est très variable d'un compartiment digestif à l'autre et dépend de l'avancement de la digestion. Dans le jabot les contenus digestifs sont très hétérogènes, cette hétérogénéité diminue le long de l'intestin grêle bien que des particules soient encore présentes. Dans les caeca les contenus sont très homogènes et liquides. Au début du tractus digestif, les contenus digestifs sont majoritairement constitués de l'aliment humidifié. Celui-ci est composé d'environ 40-50% de glucides (principalement sous forme d'amidon), 18-24% de protéines et 7-10% de lipides. Le long du tractus digestif cet aliment est mélangé aux sécrétions digestives de l'animal et de son microbiote et est progressivement digéré. A la fin de l'iléon, 5 à 10% de l'amidon, 10 à 20% des protéines et 1 à 20% des lipides ne sont pas digérés.

Chaque segment digestif constitue donc un microenvironnement particulier, biotope, auquel les bactéries s'adaptent pour survivre et se multiplier. Ainsi, le microbiote digestif se distingue d'un compartiment à l'autre comme ont pu le montrer les travaux de van der Wielen et al., (2002) en comparant par DDGE les microbiotes du jabot, du duodénum, de l'iléon et des caeca. Dans ce travail les microbiotes du duodénum et de l'iléon sont plus similaires entre eux qu'avec le microbiote du jabot. Le microbiote des caeca est celui qui se distingue le plus des autres. Ainsi, il semble y avoir un changement progressif de la composition du microbiote digestif d'un segment à l'autre. Une étude réalisée à partir de banques de clones bactériens provenant de contenus digestifs de caeca et d'iléon de poulet montre également des différences entre ces deux compartiments, qui s'accroissent au cours du temps (Lu et al., 2003).

Bien que des bactéries soient présentes tout le long du tractus digestif, les sites majeurs d'implantation du microbiote digestif sont les caeca. Un microbiote relativement important se trouve aussi en position antérieure du tube digestif, au niveau du jabot, et dans une moindre mesure en fin d'intestin grêle au niveau de l'iléon. Le microbiote du tractus digestif du poulet est majoritairement constitué de firmicutes.

2.2.1.1. Jabot

Dans ce segment antérieur, de 10^8 à 10^9 bactéries sont détectées par gramme de contenu digestif (Smith, 1965b; Guan et al., 2003; Bjerrum et al., 2006). Les bactéries du genre des *Lactobacillus* sont majoritaires et présentent une grande diversité (Gong et al., 2007). D'autres bactéries sont présentes, comme des entérobactéries (10^4 à 10^6 / g), des bactéries appartenant aux genres *Bacteroides* (10^4 à 10^7 / g), *Bacillus* (10^3 à 10^5 / g), *Enterococcus* (10^5 à 10^7 / g), et *Streptococcus* (10^4 / g) (Smith, 1965b; Annison, 1968 ; Guan et al., 2003; Bjerrum et al., 2006).

2.2.1.2. Gésier

La charge bactérienne diminue suite au pH acide et est comprise entre 10^7 et 10^8 bactéries par gramme de contenu digestif, principalement des représentants du genre des *Lactobacillus*, mais comme dans le jabot, des entérobactéries (10^3 / g), des entérocoques (10^4 à 10^5 / g) et des streptocoques (10^4 / g) sont détectés (Smith, 1965b; Engberg et al., 2004; Shakouri et al., 2009).

2.2.1.3. Intestin grêle

Dans le duodénum et le jéjunum, de 10^8 à 10^9 bactéries sont détectées par gramme de contenu digestif (Smith, 1965b; Engberg et al., 2004). La composition du microbiote, déterminée par comptage, est proche de celle observée dans les compartiments antérieurs, avec principalement des lactobacilles (10^8 bactéries/g), ainsi que des entérocoques (10^5 à 10^6 bactéries/g), des streptocoques (10^4 bactéries/g) et des entérobactéries (10^2 à 10^6 bactéries/g) (Smith, 1965b; Engberg et al., 2004).

Le microbiote de l'iléon a été étudié plus en détail que celui des compartiments précédemment décrits. Il est composé de 10^8 à 10^9 bactéries par gramme de contenu digestif (Smith, 1965b ; Engberg et al., 2004 ; Apajalahti et al, 2004). Les bactéries du genre

Lactobacillus sont dominantes (10^7 à 10^9 / g) mais d'autres bactéries peuvent être détectées dans des proportions importantes parmi les genres *Escherichia* (10^3 à 10^7 / g), *Enterococcus* (10^4 à 10^7 / g), *Streptococcus* (10^4 à 10^5 / g), *Clostridium* (10^4 à 10^5 / g), et *Bacteroides* (0 à 10^5 / g), (Smith, 1965b; Engberg et al., 2004; Bjerrum et al., 2006; Wise et Siragusa, 2007). Un bilan des genres bactériens et de leur proportion déterminé par clonage-séquençage dans les contenus digestifs d'iléon de poulet est présenté dans le tableau 10. Ces études montrent également une population bactérienne majoritairement constituée de lactobacilles.

2.2.1.4. Caeca

Le microbiote des caeca, qui est le segment le plus étudié chez le poulet du fait de sa richesse, est dominé par des populations anaérobies strictes, à la différence des microbiotes des segments digestifs supérieurs qui sont dominés par des populations aérobies ou aéro-tolérantes. Il est constitué de 10^8 à 10^{11} bactéries par gramme de contenus (Smith, 1965b; Apajalahti et al., 2004; Engberg et al., 2004; Proietti et al., 2009). Les bactéries dominantes appartiennent généralement aux genres *Clostridium* (10^8 à 10^{10} / g), en particulier les groupes *C. leptum* (cluster IV) et *C. coccooides* (cluster XIV). Il existe cependant une grande variabilité quant aux bactéries dominantes observées, mais qui est très probablement due aux méthodes de classifications utilisées pour attribuer une identité aux espèces (voir chapitre 3, paragraphe 1.1 sur les systèmes de classification) plutôt qu'à des réalités biologiques. Ainsi, selon les études, les *Clostridium* ou les *Sporomusa* sont décrits comme majoritaires (Tableau 10). Cependant le terme *Clostridium* ne recouvre pas la même chose dans toutes les études et des bactéries du genre *Sporomusa* peuvent par exemple être identifiées ou non comme *Clostridium* du cluster IX. Les bactéries des genres *Ruminococcus*, *Eubacterium* et *Faecalibacterium* qui représentent une part importante de la population bactérienne des caeca sont généralement regroupées dans les clusters IV et XIV des *Clostridium*. Des bactéries appartenant aux genres *Escherichia* (10^7 à 10^{10} / g), *Lactobacillus* (10^7 à 10^9 / g), et *Bacteroides* (10^7 à 10^9 / g) sont également détectées en quantité importante (Mead, 1989; Lan et al., 2002; Zhu et al., 2002; Lu et al., 2003; Apajalahti et al., 2004; Bjerrum et al., 2006; Wise et Siragusa, 2007, Proietti et al., 2009). Un bilan des genres bactériens détectés par clonage-séquençage dans les contenus digestifs de caeca de poulet est présenté dans le tableau 10. Ces études montrent une population bactérienne appartenant majoritairement à la classe des Clostridia.

Tableau 10 : Bilan des familles et genres bactériens détectés par inventaire moléculaire (clonage/séquençage) dans les contenus digestifs de poulet de chair

Localisation	Iléon		Caeca			
	Lu et al., 2003	Bjerrum et al., 2006	Lu et al., 2003	Zhu et al., 2002	Bjerrum et al., 2006	Lan et al., 2002
Nombre de clones séquencés	610	92	619	231	82	164
Identification (en % du nombre de clones)						
Actinobacteria						
Actinobacteria						
Bifidobacterium	0.2					
Bacteroidetes						
Bacteroidetes						
Bacteroides	0.6		5.0	2.2	4.4	4.0
Flavobacteria						
Flavobacterium			0.2			
Firmicutes						
Bacilli						
Bacillus	0.7		1.5			3.0
Enterococcus	6.4	0.7	1.0		1.3	
Lactobacillus	67.6	93.8	7.8	3.9	5.3	24.0
Staphylococcus	1.0	0.7				
Streptococcus	6.6	3.5	0.7		0.9	
Weisella	1.1		0.5			
Clostridia						
Clostridium	9.7		39.3	9.5	62.4	55.0
Eubacterium	0.7		9.9		15.5	
Faecalibacterium	0.7		13.9			
Ruminococcus	0.4		16.5			
Sporomusa		1.4		84.4	4.9	
Mollicutes						
Mycoplasma	0.0				1.8	
Proteobacteria						
α-Proteobacteria						
Alcaligenes	0.9		0.7			
β-Proteobacteria						
Ochrobactrum	0.2		0.8			
γ-Proteobacteria						
Enterobacteria	0.4		1.3		3.5	1.0
ϵ-Proteobacteria						
Campylobacter	0.9					

2.2.1.5. Colon

La population bactérienne du colon de poulet a été peu étudiée, probablement car le colon est réduit dans cette espèce aviaire et le temps de transit y est très court. La charge bactérienne y est comprise entre 10^9 et 10^{10} bactéries par gramme de contenu digestif. Les bactéries anaérobies et les lactobacilles représentent les populations dominantes (Engberg et al., 2004; Bjerrum et al., 2006).

2.2.2 Dans le mucus

Au sein de chaque organe, la structure, la composition et les paramètres physicochimiques de l'environnement varient entre muqueuse digestive et lumière. Ces variations sont décrites dans le chapitre consacré à la physiologie digestive (chapitre 2). Au contact de la muqueuse digestive se trouve le mucus digestif, formé de deux couches. A ce niveau la pression partielle en oxygène est plus élevée que dans le lumen. Le microbiote de chaque 'microbiotope' est adapté à ces différentes niches écologiques. La couche externe de mucus est fortement colonisée par des bactéries digestives. Ce n'est pas le cas de la couche interne, plus dense, bien que formée des mêmes glycoprotéines, qui forment une barrière imperméable à cette colonisation chez des animaux sains (Johansson et al., 2008). L'absence de colonisation de cette couche interne est renforcée par la sécrétion de peptides antimicrobiens et d'immunoglobulines A qui diffusent principalement dans cette couche de mucus (Figure 18) (Hooper, 2009).

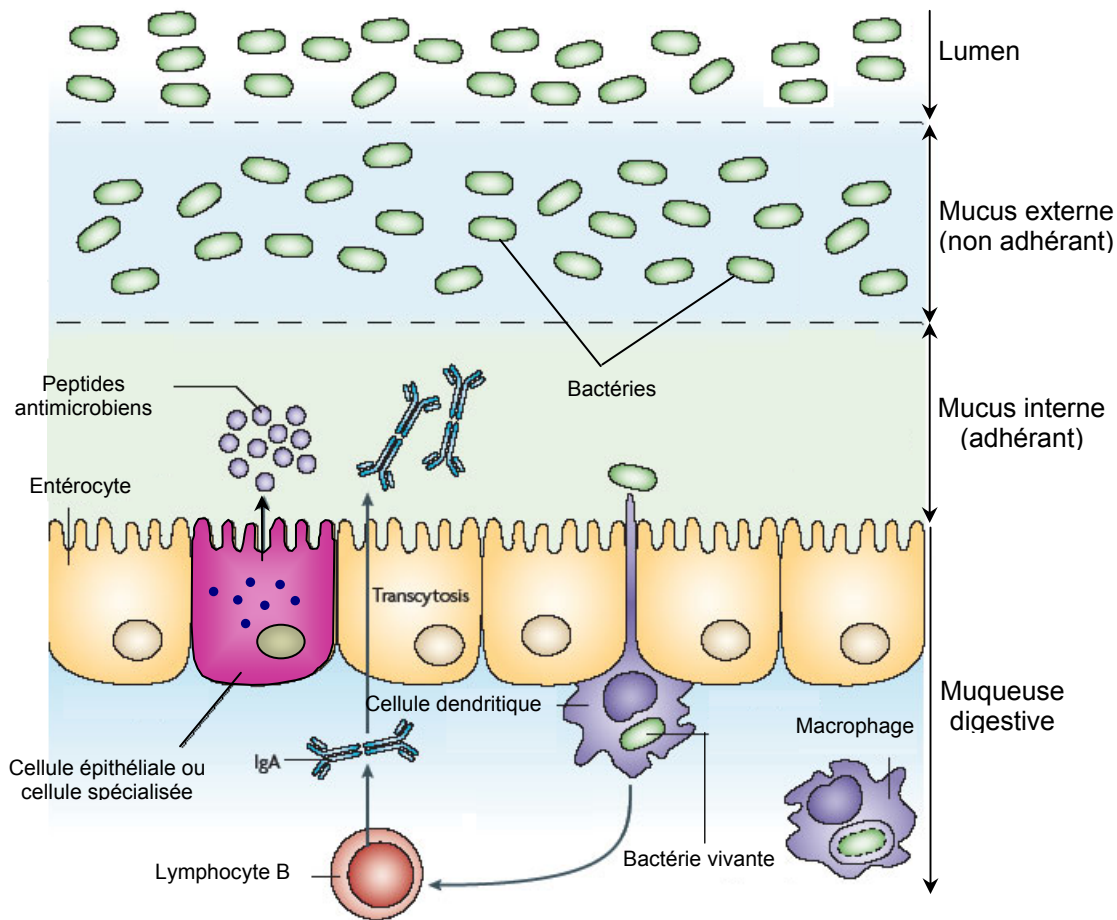


Figure 18 : Localisation de la colonisation bactérienne du mucus intestinal (d'après Hooper 2009). Plusieurs systèmes de défense sont mis en place par l'hôte pour empêcher la colonisation de la muqueuse intestinale par le microbiote digestif. La couche interne de mucus, très dense forme une barrière physique, empêchant le passage de la plupart des bactéries. Les cellules épithéliales (ainsi que des cellules spécialisées qui ne sont pas encore identifiées chez les volailles) sécrètent des peptides antimicrobiens qui diffusent en concentrations plus importantes à proximité de la muqueuse. Les immunoglobulines A ont également un rôle important dans cette lutte en diffusant dans la couche de mucus. Ce rôle est renforcé par les cellules dendritiques qui quand elles détectent des bactéries à la surface de l'épithélium digestif stimulent les lymphocytes B pour qu'ils sécrètent ces immunoglobulines.

2.2.2.1 Méthodes d'isolement des bactéries des muqueuses / mucus digestifs

En comparaison du nombre d'études réalisées sur les bactéries des contenus digestif, les études sur les bactéries du mucus sont moins nombreuses, et ce dans toutes les espèces animales, et en particulier chez la volaille. Les méthodes utilisées pour isoler les bactéries du mucus de celle des contenus digestif, et éventuellement les détacher des tissus, varient d'une étude à l'autre.

Différentes méthodes ont été utilisées dans les travaux publiés sur l'étude du microbiote digestif du poulet. Dans ces différentes études, après élimination des contenus digestifs soit après incision longitudinale (Gong et al., 2002a ; Zhu et al., 2002 ; Collado et Sanz., 2007), soit par pression de la paroi externe (Vahjenet al., 1998 ; Olsen et al., 2008), le tissu était lavé doucement dans une solution physiologique (sérum physiologique, tampon phosphate ou solution de Ringer). Ensuite, selon les études, le tissu était utilisé directement (généralement lors d'études par comptage ou FISH (Olsen et al., 2008)), ou bien les bactéries en étaient séparées par l'action d'un détergent et d'une agitation mécanique forte (Gong et al., 2002a ; Collado et Sanz., 2007), ou par scrapping (Vahjenet al., 1998 ; Zhu et al., 2002, Wise et al., 2007). Cependant, l'utilisation de méthodes de récupération différentes peut conduire artificiellement à l'observation de résultats différents (Costa et al., 2009). L'extraction d'ADN directement à partir de scrapping de muqueuse conduirait à des PCR inefficaces d'après Li et al., (2003) mais les méthodes de lavage des contenus digestifs peuvent également faire l'objet de critiques. En effet, le rinçage au PBS peut entraîner la contamination des muqueuses par le microbiote des contenus digestifs, car la flore des muqueuses est beaucoup moins abondante que celle des contenus digestifs (Zhu et al., 2002). De plus, le mucus étant constitué essentiellement de mucopolysaccharides très hydrophiles, il peut subir en présence d'eau des remaniements importants conduisant à des redistributions artificielles des différents microorganismes présents (Bollard et al, 1986).

Pour les études dans lesquelles un dénombrement des bactéries est effectué, les modes d'expression des résultats varient, ce qui rend les comparaisons entre études difficiles. Ainsi, les résultats peuvent être exprimés en nombre de bactéries par gramme de scrapping, par gramme de tissus, par cm² de tissus, ou par organe.

2.2.2.2 Composition du microbiote le long du tractus digestif

Dans le Jabot

Dans le jabot, la population bactérienne totale des muqueuses est évaluée à 10^7 à 10^9 bactéries /cm² de tissu (Collado et Sanz, 2007). Les bactéries forment une couche presque continue sur l'épithélium du jabot (Fuller et Brooker, 1974). La majorité des bactéries détectées appartiennent au genre *Lactobacillus* avec une forte diversité d'espèces (Fuller et Turkey, 1971 ; Fuller et Brooker, 1974; Gong et al., 2007). C'est un phénomène très spécifique : seuls les lactobacilles isolés des oiseaux peuvent s'attacher aux cellules épithéliales du jabot (Fuller et Brooker, 1974)

Collado et Sanz, (2007) rapportent une population de bactéries lactiques de 10^7 bactéries /cm² de tissu, mais également l'existence de populations non négligeables de bactéries des genres *Atopobium* (10^6 bactéries /cm² de tissu), *Propionibacterium* (10^6 bactéries /cm² de tissu), *Bifidobacterium* (10^4 bactéries /cm² de tissu), *Escherichia* (10^4 bactéries /cm² de tissu), *Bacteroides /Prevotella* (10^3 bactéries /cm² de tissu) et *Clostridium* (10^2 bactéries /cm² de tissu).

Dans le gésier

Dans le mucus du gésier, l'importance de la population bactérienne n'a, à notre connaissance, pas été évaluée. D'après un inventaire moléculaire de Gong et al., (2007) avec 51 clones analysés, cette population semble constituée en grande majorité de bactéries du genre *Lactobacillus*..

Dans l'intestin grêle

Dans le mucus du duodénum Collado et Sanz (2007), rapportent une population de bactéries totales de 10^7 à 10^9 bactéries /cm² de tissu, composée principalement de bactéries lactiques (10^5 à 10^6 bactéries /cm² de tissu), et de bactéries des genres *Propionibacterium* (10^6 bactéries /cm² de tissu), *Bifidobacterium* (10^3 à 10^4 bactéries /cm² de tissu), ainsi que des entérobactéries (10^2 à 10^4 bactéries /cm² de tissu). Vahjen et al., (1998) ont également dénombré majoritairement des bactéries du genre *Lactobacillus* (10^6 à 10^7 bactéries /g de scrapping), mais des coques à Gram positifs (bactéries appartenant aux genres *Enterococcus*,

Staphylococcus, *Streptococcus*) étaient également détectés en quantité importante (10^4 à 10^6 bactéries /g de scrapping).

Dans le jéjunum, Vahjen et al., (1998) rapportent une population majoritairement constituée de *Lactobacillus* (10^7 à 10^9 bactéries /g de scrapping), mais des coques à Gram positifs peuvent être détectés en quantité non négligeable (10^4 à 10^7 bactéries /g de scrapping)

Ces résultats sont en accord avec un inventaire moléculaire effectué par Gong et al (2007) à partir de 52 et 50 clones provenant du duodénum et du jéjunum respectivement, montrant une forte proportion de séquences affiliées au genre *Lactobacillus* (tableau 11).

Dans le mucus de l'iléon la charge bactérienne totale représente 10^8 à 10^9 bactéries /g de tissu ou de scrapping (Vahjen et al, 1998, Olsen et al., 2008). D'après Gong et al (2002a), les profils bactériens sont différents entre contenu et muqueuse, comme ceci a été observé chez le porc (Li et al., 2003). La composition bactérienne et l'abondance relative des différents groupes bactériens est très variable selon les études. Les populations majoritaires peuvent être des Lactobacilles (Gong et al., 2002b; Gong et al., 2007) ou des coques à Gram positifs (Vahjen et al., 1998), mais des proportions importantes de *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterobacteria* ou *Faecalibacterium* peuvent être détectées (Vahjen et al., 1998; Gong et al., 2002b; Gong et al., 2007; Olsen et al., 2008). Ainsi, des populations de 10^7 à 10^8 *Bacteroides*, de 10^6 à 10^8 *Lactobacillus* et coques Gram positif ont été dénombrés par gramme de scraping (Vahjen et al., 1998), ou de 10^7 à 10^8 *Lactobacillus*, de 10^8 *Clostridium*, *Enterobacteria*, et *Enterococcus*/*Streptococcus*/*Lactococcus* par gramme de tissu (Olsen et al., 2008). Le résultat d'un inventaire moléculaire effectué par Gong et al., (2002b) sur 51 clones issus des muqueuses de l'iléon est présenté dans le tableau 11. Il montre des populations importantes de *Lactobacillus* (45% des clones), et *Enterococcus* (29% des clones), ainsi qu'un nombre important de bactéries non identifiées (20%).

Tableau 11 : Bilan des familles et genres bactériens détectés par inventaire moléculaire (clonage/séquençage) associés aux muqueuses digestives de poulet de chair

Localisation	Intestin grêle		Caeca		
	Iléon	Duodénum/Jéjunum/Iléon			
Référence	Gong et al., 2002b	Gong et al., 2007	Gong et al., 2002b	Zhu et al., 2002	Gong et al., 2007
Nombre de clones séquencés	51	252	116	146	98
Identification (en % du nombre de clones)					
Bacteroidetes					
Bacteroidetes					
Bacteroides				3.4	17.5
Firmicutes					
Bacilli					
Bacillus			2.6		
Enterococcus	29.4	0.7	6.0		
Lactobacillus	45.1	55.3	3.4	0.7	5.2
Megamonas					1.0
Peptococcus					1.0
Pseudobutyvibrio					4.1
Streptococcus	2.0		1.7		
Clostridia					
Acetanaerobacterium					2.1
Clostridium		10.5	6.0	13.7	16.5
Eubacterium		5.3	4.3		7.2
Faecalibacterium	2.0	2.6	18.1		6.2
Ruminococcus		0.7	11.2		4.1
Sporobacter					1.0
Sporomusa				82.2	
Subdoligranulum					2.1
Veillonella		1.3			
Proteobacteria					
γ-Proteobacteria					
Escherichia	2.0	2.6	0.9		11.3
δ-Proteobacteria					
Bilophila					3.1
Non identifiés					
Caractérisé					
Candidatus Arthromitus		21.1			
Non identifiés	19.6		45.7		17.5

Dans les caeca

Dans le mucus des caeca, la charge bactérienne est estimée à 10^8 à 10^9 bactéries / g de tissu (Olsen et al., 2008). Là encore les résultats varient d'une étude à l'autre, mais les bactéries appartenant aux groupes *Clostridium*/*Eubacterium*/*Ruminococcus*/*Sporomusa* et *Bacteroides*/*Prevotella* sont généralement majoritaires. Des populations importantes de *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Enterobacteria* peuvent être, elles aussi, présentes (Gong et al., 2002a; Zhu et al., 2002; Gong et al., 2007; Olsen et al., 2008). Ainsi, des populations de 10^8 *Lactobacillus*, de 10^7 à 10^8 *Bacteroides* et *Clostridium*, et de 10^7 *Bacillus*, *Enterobacteria*, et *Enterococcus*/*Streptococcus*/*Lactococcus* ont été dénombrées par gramme de tissu (Olsen et al., 2008). Un bilan des genres bactériens détectés par différents travaux de clonage-séquençage dans le mucus de caeca de poulet est présenté dans le tableau 11 (Gong et al., 2002b ; Zhu et al., 2002 ; Gong et al., 2007). Ces inventaires montrent une population bactérienne majoritairement constituée de bactéries de la classe des Clostridia (37 à 95% des clones), et contenant une part non négligeable de bactéries non identifiées ou caractérisées mais non cultivées (18 à 46%).

Dans le Colon

Dans le mucus du colon, 10^8 à 10^9 bactéries / cm² de tissu ont pu être dénombrées ou détectées (Collado et Sanz, 2007). Ces bactéries appartiennent majoritairement aux genres *Lactobacillus* (10^8 bactéries / cm²), *Enterobacteria* (10^7 bactéries / cm²), *Propionibacterium* (10^7 bactéries / cm²), *Enterococcus* (10^8 bactéries / cm²), *Bacteroides* (10^4 à 10^5 bactéries / cm²) et *Bifidobacterium* (10^3 à 10^5 bactéries / cm²).

2.3 Métabolisme des groupes bactériens

Du fait de la progression de la digestion, la composition en différents substrats varie le long du tractus digestif et au sein de chaque organe. De plus, les apports sont irréguliers du fait de périodes où l'animal ne consomme pas. Pour le poulet, ces périodes correspondent principalement à l'absence de stimuli lumineux ou à une impossibilité d'accès à la mangeoire (concurrence pour l'accès à la mangeoire). De la même manière, la teneur en eau dans le tractus digestif varie au cours de la journée. Ainsi les bactéries du tractus digestif doivent être adaptées à un environnement changeant, et ce, particulièrement dans les parties antérieures du tractus, puisque dans les caeca du fait d'un brassage régulier et de vidanges espacées, le

milieu est plus constant. Dans chaque micro-biotope, les bactéries sont en concurrence pour l'utilisation de ces nutriments. Elles sont également confrontées à la présence de molécules antibactériennes produites par l'hôte (sels biliaires, IgA, peptides antimicrobien, ...) ou contenues dans son alimentation, à un renouvellement de l'épithélium digestif, un transit des digesta rapide et à une osmolarité importante. Celles qui transitent le long du tractus digestif pour s'implanter dans les parties postérieures sont exposées à des teneurs variables en oxygène, et à des pH qui peuvent être acides.

Dans cette section nous essayerons de présenter les métabolismes des groupes bactériens majoritaires et certains mécanismes d'adaptation des bactéries à cet environnement particulier à travers d'exemples concernant certains des groupes bactériens majoritaires présents le long du tractus digestif.

2.3.1 Lactobacillales

L'ordre des Lactobacillales regroupe des bactéries généralement aéro-anaérobies dont celles appartenant au genre *Lactobacillus* (Euzéby, 1998). Les bactéries du genre *Lactobacillus* sont des chimio-organotrophes capables de fermenter de nombreux glucides pour former de l'acide lactique et certaines ont des activités désaminantes (Klein et al., 1998; Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007b). Les espèces présentes chez le poulet sont généralement capables d'hydrolyser l'amidon (Champ et al., 1983). De plus, des transporteurs de fructo-oligosaccharides ont pu être identifiés chez des espèces colonisant les tractus digestifs (Schober et Kurmayer, 2006).

Certaines espèces peuvent adhérer au mucus et aux cellules épithéliales du tractus digestif grâce à différents facteurs d'adhérence protéiques capables de lier le mucus, les cellules épithéliales, ou la matrice extracellulaire protéique ; mais aussi grâce à des facteurs non protéiques comme les exo-polysaccharides ou les acides lipoteichoïques (Edelman et al., 2002; Schober et Kurmayer, 2006; Vélez et al., 2007). Ces facteurs d'adhérence leur donnent un avantage pour la colonisation du mucus et de l'épithélium digestif. Les lactobacilles sont également capables d'hydrolyser les mucines (Fakhry et al., 2009). Enfin, les lactobacilles ont développé des mécanismes de tolérance aux acides et sels biliaires et aux composés phénoliques (Tannock et al., 1989; Ridlon et al., 2006; Schober et Kurmayer, 2006; Louis et O'Byrne, 2010).

2.3.2 *Bacteroides*

Le genre *Bacteroides* regroupe des espèces anaérobies fortement fermentatives (Euzéby, 1998). Parmi les espèces isolées dans des tractus digestifs de monogastriques, on trouve des bactéries capables d'hydrolyser des composés cellulosiques, hémicellulosiques, des pectines, de l'amidon ainsi que des protéines et peptides. On retrouve également des bactéries fermentatives du glucose, du saccharose ou des pentoses (Euzéby, 1998; Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007b). Certains membres de ce genre sont capables de dégrader les mucines (Corfield et al., 1992), et de nombreuses espèces de *Bacteroides* résistent à l'action des acides biliaires en les métabolisant (Euzéby, 1998; Ridlon et al., 2006).

2.3.3 Clostridiales

L'ordre des Clostridiales forme un groupe très hétérogène d'un point de vue des caractères phénotypiques, physiologiques et chimio-taxonomiques mais avec une cohérence phylogénétique. Cet ordre regroupe notamment les familles Clostridiaceae, Eubacteriaceae et Ruminococaceae. Ses représentants sont généralement anaérobies strictes (Euzéby, 1998). Certaines espèces peuvent présenter des activités hydrolytiques, des composés cellulosiques, hémicellulosiques, des pectines, de l'amidon, des protéines, des peptides et des lipides. D'autres, sont des espèces fermentatives à activités saccharolytiques (cellobiose, fructose, glucose, saccharose), désaminantes ou utilisant les acides organiques tels le lactate (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007b). De nombreuses espèces sont capables de dégrader les mucines ou de transformer les acides biliaires (Corfield et al., 1992; Ridlon et al., 2006).

2.3.4 Enterobacteriales

L'ordre des Enterobacteriales est composé de bacilles chimio-organotrophes, aéro-anaérobies qui possèdent à la fois un métabolisme respiratoire et fermentaire. Ils sont notamment capables de fermenter de nombreux glucides (Euzéby, 1998; Jacobs et al., 2009). Certains d'entre eux sont capables de dégrader les mucines (Corfield et al., 1992). Certaines souches, notamment parmi l'espèce *Escherichia coli*, peuvent adhérer au mucus ou aux cellules épithéliales par l'intermédiaire de *pilli* et *fimbriae* (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999), mais ce sont majoritairement des souches pathogènes pour l'animal colonisé (Vidotto et al., 1997). De plus, de nombreuses espèces de cet ordre ont développé des mécanismes de résistance aux acides et sels biliaires (Louis et O'Byrne, 2010).

2.3.5. Interactions bactériennes

Les bactéries ne vivent pas indépendantes les unes des autres dans le tractus digestif, elles forment des écosystèmes complexes au sein desquels elles développent de vastes réseaux d'interactions, du mutualisme (les deux espèces en tirent profit) au parasitisme (dérivation de nutriments des cellules d'une espèce au profit d'une autre espèce) en passant par des relations de type antagonisme, compétition ou amensalisme (suppression d'une espèce par un agent toxique produit par une autre) (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007a). On peut citer quelques exemples observés dans le tractus digestif de monogastriques tels que les oiseaux :

- La nutrition croisée : c'est par exemple le cas des bactéries cellulolytiques qui utilisent l'ammoniac comme source préférentielle d'azote et qui utilisent des acides gras à chaîne courte. Ces composés leur sont fournis par l'activité des espèces protéolytiques, et desaminantes. Les bactéries cellulolytiques fournissent en retour les oses fermentescibles nécessaires à la croissance des bactéries protéolytiques (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007b) (Figure 19). Ces phénomènes peuvent être observés dans le colon des mammifères mais aussi dans les caeca du poulet (Mead, 1989).

- La transformation des acides biliaires : certaines espèces de bactéries sont capables de résister aux acides biliaires, notamment en les transformant en composés non nocifs (Louis et O'Byrne, 2010). Ce n'est cependant pas le cas de toutes les espèces. Les espèces sensibles aux acides biliaires peuvent donc tirer parti de l'activité de celles capables de les transformer.

- L'inhibition de l'adhérence au mucus : certaines espèces de *Lactobacillus* sont capables d'inhiber ou de diminuer l'adhérence d'entérobactéries au mucus digestif (Ma et al., 2006).

- La production de molécules antimicrobiennes : c'est le cas des bactériocines produites par certaines espèces de *Lactobacillus* et toxiques pour d'autres espèces (Schroeter et Klaenhammer, 2009).

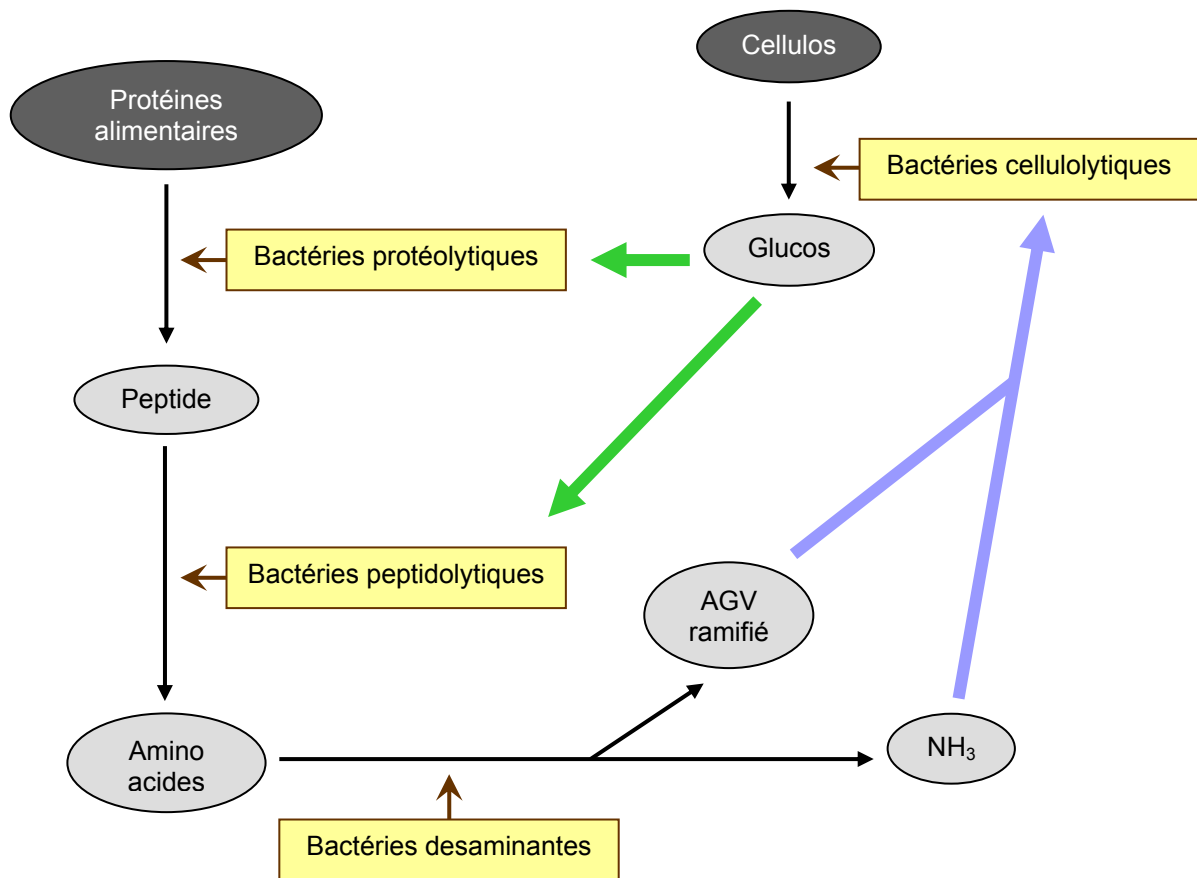


Figure 19 : Exemple de nutrition croisée, le cas des interactions entre bactéries protéolytiques et cellulolytiques (d'après Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007b)

III. Impact du microbiote sur l'hôte

L'hôte, via sa génétique, ses sécrétions digestives, ou son alimentation, a un impact sur l'établissement et l'équilibre de son microbiote digestif. Cependant les interactions ne sont pas unilatérales, et le microbiote digestif a des répercussions sur la croissance et la santé de l'hôte, particulièrement à travers son influence sur le développement du tractus digestif et de son système immunitaire ainsi que sur la disponibilité des nutriments (Figure 20). L'impact des microorganismes sur l'hôte a été en grande partie étudié en comparant des animaux axéniques (sans microbiote digestif), conventionnels (possédant leur microbiote normal), gnotobiotiques (animaux axéniques auxquels on inocule une ou plusieurs bactéries connues), et conventionnalisés (animaux axéniques auxquels on inocule le microbiote d'animaux conventionnels).

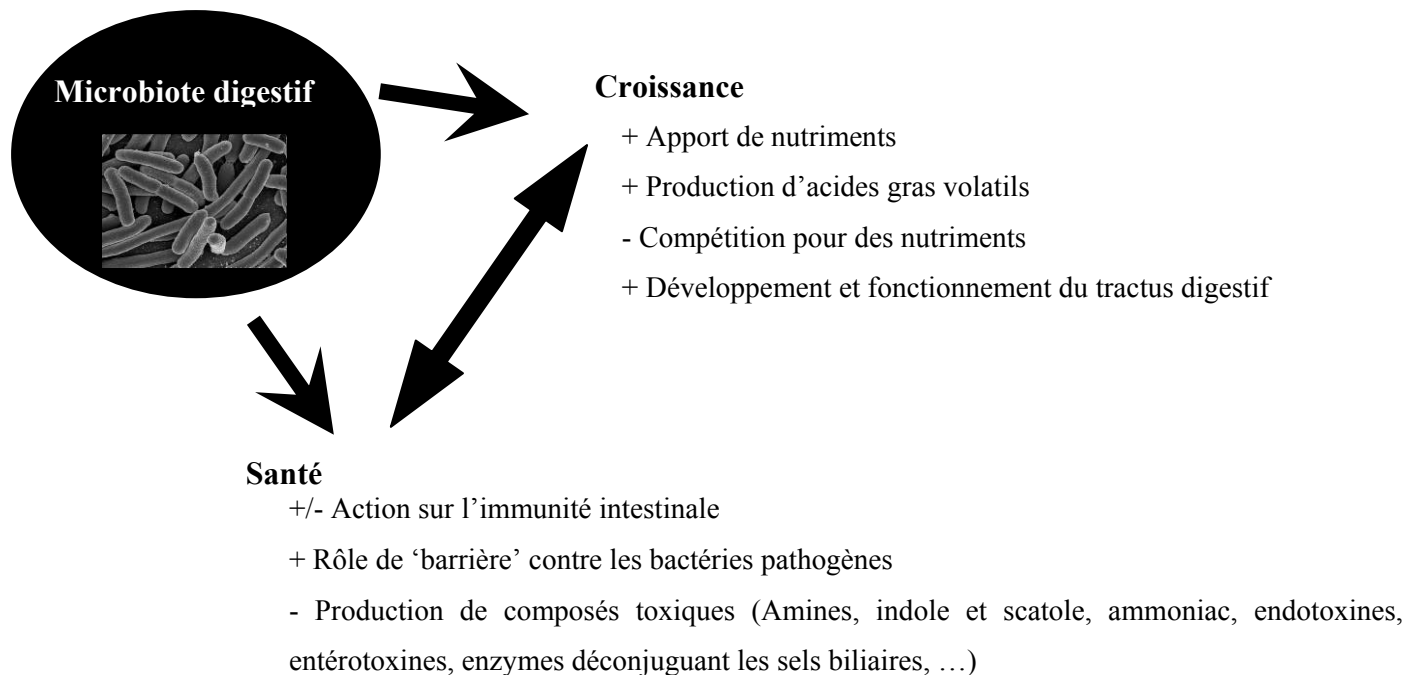


Figure 20 : Impact du microbiote sur la croissance et la santé de l'hôte

(+ : effet positif ; - : effet négatif)

3.1 Sur la structure et la fonctionnalité du tractus digestif de l'hôte

La comparaison de la microarchitecture des segments digestifs, de la production de mucus ou de l'expression de gènes des cellules épithéliales d'animaux axéniques ou conventionnels (rongeurs, porcs, volailles), a démontré que le microbiote intervient dans la maturation du tractus digestif. Ainsi, chez des animaux axéniques le nombre de cellules à mucus est inférieur et la production de mucus plus faible (Deplancke et Gaskins, 2001; Forder et al., 2007). La composition en mucines du mucus est également affectée par le microbiote, les animaux axéniques ont un ratio mucines neutre / mucines acides et sulfo mucines / sialo mucines plus important que les animaux conventionnels (Deplancke et Gaskins, 2001; Forder et al., 2007). Chez les animaux conventionnels, l'appareil digestif est plus important, la muqueuse intestinale est plus épaisse, mais la vitesse de renouvellement des cellules intestinale est plus rapide et l'efficacité alimentaire inférieure (Dibner et al., 2008). L'expression des gènes des cellules des cryptes et villosités de l'intestin grêle est modifiée par le microbiote (Chowdhury et al., 2007). La colonisation bactérienne induit l'expression des gènes impliqués dans le renouvellement des cellules épithéliales, dans la production de mucus, dans la glycolyse, dans le métabolisme des acides gras et dans le transport de certains nutriments (acides monocarboxyliques).

3.2 Sur la disponibilité des nutriments

De nombreux substrats sont disponibles dans le tractus digestif. Ceux-ci proviennent de l'alimentation de l'animal hôte, de molécules endogènes de l'hôte (mucus, sécrétions biliaires, cellules desquamées, ...) ou d'autres microorganismes. Les bactéries et l'hôte sont en concurrence directe pour l'utilisation de certains de ces nutriments, notamment les glucides simples qui sont absorbables au niveau de la muqueuse intestinale et fermentescibles par de nombreuses espèces bactériennes. En effet, du fait de la complexité du microbiote digestif, celui-ci possède de très nombreuses enzymes digestives, en regard de celles de l'hôte. Cependant, le microbiote digestif est également capable d'hydrolyser des substrats indigestibles pour l'hôte, libérant alors des molécules qui pourront être absorbées au niveau de la muqueuse intestinale.

3.2.1. Digestion des glucides

Les bactéries présentes dans le tractus digestif sont capables d'utiliser des glucides digestibles par l'hôte (les oligosaccharides ou les disaccharides), non digestibles par l'hôte (cellulose, hémicellulose, pectine), ou nécessitant une interaction hôte micro-organisme (amidon). D'après Szyllit et al (1980), chez le poulet, les lactobacilles sont essentiels pour la digestion de l'amidon, qui ne peut pas s'effectuer sous la seule action de l'amylase endogène de l'animal. De plus, la salive sécrétée dans le jabot des poulets ne contient pas d'enzymes digestives. En revanche, les populations de *Lactobacillus* qui constituent le microbiote de cet organe sont capable de sécréter des amylases et d'initier la digestion de l'amidon dès le jabot (Champ et al., 1981; Champ et al., 1983). Concernant les glucides non digestibles, ils sont fermentés par le microbiote principalement au niveau des caeca (Mead, 1989).

3.2.2. Digestion des protéines

La digestion des protéines alimentaires par le microbiote digestif est très variable, probablement en relation avec la composition de l'aliment (Gabriel et al, 2005). Le microbiote digestif a un effet bénéfique sur la digestion de protéines de mauvaise qualité, peu digestibles par l'hôte, à condition qu'elles ne soient pas trop altérées par la chaleur. De plus, le microbiote digestif est également capable d'utiliser les protéines endogènes telles que les protéines du mucus, les débris cellulaire, et les protéines de la biomasse (Gabriel et al, 2005).

3.2.3. Digestion des lipides

Le microbiote digestif a un effet négatif sur la digestibilité des lipides, car certaines espèces bactériennes dont les lactobacilles, sont capables de déconjuguer les sels biliaires (Tannock, 1989), ce qui réduit la solubilisation des lipides et donc entrave leur digestion par l'hôte (voir chapitre 2.4.3 sur la digestion des lipides).

3.3 Sur le métabolisme de l'hôte

Le microbiote digestif est capable de produire des métabolites qui peuvent être bénéfiques ou néfastes pour l'hôte. Il peut aussi détoxifier ou rendre certaines molécules présentes dans les digesta, plus toxiques. (Gabriel et al., 2005, Fonty, 2007e).

3.3.1. Métabolisme azoté

Le microbiote digestif peut avoir un effet favorable sur le métabolisme azoté de l'hôte. En effet, les bactéries présentes notamment dans les caeca (*Bacteroides*, *Clostridium*, *eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*) sont capable de métaboliser de l'ammoniac à partir des composés azotés présents dans ces compartiments, notamment à partir de l'acide urique. L'ammoniac ainsi formé peut être utilisé par l'hôte, ou par d'autres bactéries comme source d'azote, donnant lieu à des phénomènes de nutrition croisée (Mead, 1989). Cependant la présence du microbiote digestif représente également un coût pour l'hôte en terme de besoins protéiques, ceux-ci étant plus élevés chez les animaux conventionnels que axéniques (Gabriel et al., 2005).

3.3.2. Métabolisme énergétique

Les microorganismes présents au niveau de l'intestin grêle et des caeca peuvent avoir un effet positif sur le métabolisme énergétique de l'hôte. Ainsi Torok et al (2009) ont mis en évidence un lien entre l'énergie métabolisable apparente corrigée pour un bilan azoté nul (EMAn) et la composition du microbiote digestif en étudiant les liens entre EMAn et distance entre profils du microbiote obtenus par T-RFLP. Cet effet bénéfique sur le métabolisme de l'hôte est vraisemblablement lié à la libération par les microorganismes fermentaires d'acides gras volatils à partir des polysaccharides non amylacés (Jozefiak et al., 2004). La quantité d'acides gras volatils libérée, principalement de l'acétate, du propionate, du butyrate, et du valérate, est directement liée à la composition de l'alimentation de l'animal (Clench et

Mathias, 1995). Chez le poulet ces métabolites peuvent être absorbés par l'animal et apporteraient entre 5 et 10% de l'énergie métabolisable (Annison et al., 1968; Kirchgessner et al., 1999). Cependant ces résultats sont à prendre avec précaution. En effet, ces composés étant absorbés en continu par l'animal, l'évaluation de leur contribution à l'énergie métabolisable doit se faire en mesurant leur concentration dans l'artère et la veine porte et en extrapolant les résultats en tenant compte du débit sanguin mesuré à ce niveau. Or, ce n'est pas toujours le cas à cause de difficultés techniques liées au faible diamètre de la veine porte chez le poulet (Jozefiak et al., 2004).

Le microbiote digestif peut également augmenter les besoins énergiques de l'hôte, ce qui peut s'expliquer par la réduction de la disponibilité de certains nutriments comme indiqué dans le paragraphe 3.2 de ce chapitre (utilisation de nutriments digestible par l'hôte, réduction de la digestibilité des lipides, augmentation des pertes endogènes).

3.3.3. Métabolisme des polyphénols

Une partie des composés phénoliques apportés par l'alimentation doit subir des processus de transformation bactériens avant d'être absorbables par l'animal. Ils sont généralement transformés en acides phénoliques ou lactones qui peuvent présenter des propriétés biologiques différentes des composés initiaux, comme une activité antioxydante plus importante (Aura, 2008; Selma et al., 2009). Il a été montré que le microbiote des caeca de poulet est capable d'effectuer ces biotransformations (Iqbal et Zhu, 2009a; Iqbal et Zhu, 2009b). Ainsi, la biodisponibilité pour le poulet de certains composés phénoliques est liée à son microbiote digestif.

3.3.4. Métabolisme des minéraux et vitamines

Certains travaux suggèrent que le microbiote digestif agit également sur le métabolisme des minéraux et des vitamines, notamment en réduisant le transport ou l'absorption du calcium, ainsi que par la synthèse de vitamines comme l'acide folique (Gabriel et al., 2005).

3.4 Sur la santé de l'hôte

3.4.1. Impact sur le système immunitaire

La présence du microbiote digestif permet le bon développement du système immunitaire de l'hôte, notamment au niveau du tractus digestif. Ainsi, la conventionnalisation d'animaux axéniques stimule la synthèse et la sécrétion de molécules caractéristiques de la réponse immunitaire innée et adaptative, tels que des peptides antimicrobiens, des interleukines (IL8), ou l'expression des molécules de classe 2 du complexe majeur d'histocompatibilité à la surface des cellules épithéliales (molécules présentatrices des peptides issus de la dégradation d'un antigène exogène ou endogène, mais transmembranaires, aux lymphocytes T CD4+). Les animaux conventionnels présentent, par rapport aux axéniques, un développement plus rapide des cellules immunitaires de la *lamina propria*, un plus grand nombre de cellules productrices d'immunoglobulines A, un développement et une maturation plus grande des tonsils caecaux, et des populations lymphocytaires différentes (Dibner et al., 2008). On remarque chez des porcs conventionnalisés une stimulation, dans les villosités, de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de peptides antimicrobiens et des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (molécules présentatrices aux lymphocytes T CD8+ des peptides antigéniques issus de la protéolyse de protéines endogènes synthétisées par la cellule présentatrice, qu'il s'agisse de constituants naturels ou de protéines virales) (Chowdhury et al., 2007).

Le développement de l'immunité au niveau du tractus digestif, favorisé par le microbiote digestif, permet de lutter contre les pathogènes susceptibles d'entrer dans l'organisme au niveau de la muqueuse digestive. Cependant, la réaction du système immunitaire à la présence de bactéries dans le tractus digestif doit être contrôlée et dirigée contre les agents pathogènes. En effet, elle ne doit pas se faire à l'encontre des populations bactériennes commensales qui participent elles aussi à la protection de l'organisme contre les bactéries pathogènes. De plus, la réponse immunitaire a un coût énergétique important et défavorable à la croissance de l'hôte, qui se traduit par un détournement du métabolisme énergétique et de celui des acides aminés au profit de la réponse immunitaire, par un arrêt du dépôt des lipides et par une perturbation du métabolisme des métaux (Humphrey et Klasing, 2004). Enfin, si la réaction de l'hôte n'est pas modérée, elle se traduit par une importante

inflammation perpétuelle, en réponse à la présence du microbiote, conduisant à des dommages tissulaires.

3.4.2. Protection contre les agents pathogènes

Les premières bactéries qui s'implantent dans le microbiote digestif vont s'opposer à l'implantation d'autres bactéries par un effet appelé « barrière », et notamment à l'implantation de bactéries pathogènes. Cela a été montré en traitant des poussins nouvellement éclos avec un microbiote provenant des caeca de poulets sains adultes, et en testant l'effet protecteur contre l'implantation de bactéries pathogènes comme les salmonelles (Gabriel et al., 2005). De la même façon, certaines bactéries naturellement présentes dans le tractus digestif du poulet ont un effet inhibiteur de la croissance d'autres espèces. Ainsi, certaines espèces de lactobacilles peuvent inhiber l'implantation de souches d'*Escherichia coli*, *Salmonella* ou *Clostridium perfringens* (La Ragione et al., 2004 ; Ma et al., 2006).

3.4.3. Déséquilibre du microbiote digestif

Il a été démontré notamment chez l'homme qu'un déséquilibre du microbiote digestif pouvait conduire à l'apparition de pathologies, sans que des microorganismes pathogènes soient impliqués. Ainsi, il a été observé que dans des maladies comme certaines formes d'obésité ou de diabète, la composition du microbiote est différente entre sujets malades et sains (Duerkop et al., 2009; Barbosa et Rescigno, 2010). La composition du microbiote, même en l'absence de bactéries pathogènes, a donc un impact majeur sur la santé de l'hôte.

3.5. Sur les performances de croissance

Le microbiote digestif a généralement un impact négatif sur les performances de croissance des animaux. Ainsi, les animaux conventionnels présentent une croissance moindre que les animaux axéniques, tout en ayant une consommation similaire (Furuse et Okamura, 1994).

Résumé

En résumé, différentes approches permettent de dénombrer et d'identifier les bactéries composant les microbiotes complexes mais toutes ont leurs limites. Les méthodes culturales ne permettent d'étudier que la fraction des microorganismes actuellement cultivés. Les méthodes moléculaires permettent de s'affranchir de ces difficultés de culture. Cependant leurs résultats peuvent comporter des biais liés à l'extraction de l'ADN ou son amplification. De plus, la précision et l'exactitude des résultats qu'elles apportent est en constante amélioration du fait de l'accroissement rapide de nos connaissances relatives aux séquences d'ADN 16S bactérien.

La combinaison de ces méthodes appliquées à l'étude des écosystèmes digestifs du poulet nous confère une bonne connaissance de ces microbiotes, particulièrement au niveau des contenus digestifs. Ils sont majoritairement composés de bactéries. La colonisation du tractus digestif débute très tôt dans la vie de l'animal, une quantité de bactéries importante est détectée dans tous les segments digestifs quelques heures après l'éclosion. La composition et la diversité du microbiote évolue les premiers jours de vie de l'animal et semble se stabiliser entre 20 et 40j selon les segments digestifs. Le microbiote est structuré dans l'espace, la proportion des différentes espèces bactériennes détectées est propre à chaque segment digestif, mais d'une manière générale la partie supérieure du tractus digestif est majoritairement colonisée par des organismes aéro-anaérobies (Lactobacilles, Entérobactéries) et la partie inférieure par des organismes anaérobies strictes (Clostridiales, Bactéroïdes). Le microbiote est également structuré entre mucus et contenu digestif, ce dernier en contact direct avec l'hôte ayant cependant été beaucoup moins étudié.

Enfin, le microbiote digestif joue un rôle important dans la croissance et la santé de l'hôte à travers son impact sur la structure et le fonctionnement du tractus digestif mais aussi sur son système immunitaire, mais également par son rôle dans la nature et l'abondance des nutriments disponibles pour l'hôte.

Deuxième partie.
Matériels et Méthodes

L'objectif de ce travail était d'approfondir nos connaissances sur les facteurs de variation de l'efficacité des phytobiotiques et sur leurs modes d'action.

La première partie de ce manuscrit nous a permis de mettre en évidence que des facteurs environnementaux et génétiques pouvaient moduler les effets de l'ingestion de phytobiotiques par le poulet. Cette synthèse bibliographique souligne également que de nombreux phytobiotiques possèdent une activité antibactérienne qui pourrait en partie expliquer leurs propriétés facteur de croissance. Cependant les études concernant l'impact des phytobiotiques sur le microbiote digestif conduisent à des résultats contradictoires qui pourraient être liés en partie aux molécules utilisées et à leurs conditions d'application, mais aussi à la complexité des microbiotes digestifs qui rend difficile l'étude de leurs facteurs de variation.

Ce travail nous a donc amené à étudier dans un premier temps le microbiote digestif du poulet le long du tractus digestif et au cours d'une période d'élevage, et plus particulièrement l'influence du mode d'échantillonnage sur l'étude de l'impact de facteurs environnementaux sur la composition du microbiote. Cette première phase d'étude a été réalisée pour disposer d'outils adaptés à l'étude de l'influence des phytobiotiques sur le microbiote digestif du poulet.

Dans un second temps nous avons étudié l'influence des conditions d'utilisation de deux modèles de phytobiotiques sur leur capacité d'amélioration des performances zootechniques des poulets, en tenant compte des conditions environnementales d'élevage des animaux, mais aussi de la variabilité de réponse des individus au sein d'un lot.

Enfin, dans les conditions d'élevage où les animaux répondaient fortement aux modèles de phytobiotiques choisis, nous avons étudié l'effet de ces alternatives aux AFC sur le microbiote digestif des poulets.

Les différents choix méthodologiques faits pour répondre à ces problématiques sont présentés dans cette seconde partie du manuscrit.

Chapitre 1 - Expérimentations conduites sur les animaux

I. Objectifs et déroulement des expérimentations sur animaux

Trois expérimentations sur animaux ont été réalisées au cours de ce travail. La première expérimentation avait pour but d'approfondir nos connaissances du microbiote digestif du poulet et de sa variabilité interindividuelle. La connaissance de la variabilité interindividuelle du microbiote était indispensable pour déterminer les effectifs d'animaux nécessaires pour étudier les facteurs de variation du microbiote digestif. Cette expérimentation devait donc être réalisée préalablement à l'étude de l'impact des phytobiotiques sur le microbiote. Une deuxième expérimentation a été réalisée pour étudier l'impact de deux mélanges de phytobiotiques sur des animaux mis en place dans des conditions de démarrage optimisées pour favoriser leur croissance et élevés aux densités d'élevage minimale et maximales fixées par la directive européenne fixant des règles relatives à la protection des poulets destinés à la production de viande (European Commission, 2007). Enfin, une troisième expérimentation a été réalisée sur des animaux placés dans des conditions de démarrage plus représentatives de celles rencontrées en élevage industriel, et élevés aux deux densités précédentes. Dans cette expérimentation l'impact de deux mélanges de phytobiotiques sur les performances de croissance et le microbiote digestif du poulet a été étudié.

1.1 Expérience 1 : Composition et évolution du microbiote digestif du poulet le long du tractus digestif en fonction de l'âge des animaux (Figure 21)

Dans cette expérience, les objectifs étaient d'une part de déterminer l'effectif nécessaire d'animaux à utiliser pour étudier les facteurs de variation de leur microbiote digestif compte tenu de la variabilité interindividuelle de celui-ci ; et d'autre part de connaître la composition et l'évolution de ce dernier le long du tractus digestif et selon l'âge des animaux. Pour le premier objectif, des essais ont été menés pour déterminer le nombre de poulets à prélever afin d'obtenir un échantillon représentatif de la population. Pour le second objectif, le microbiote total a été étudié dans le jabot, l'iléon et les caeca, lors de son implantation (1 semaine), en milieu et en fin de période d'élevage (3 et 6 semaines

respectivement). Le microbiote des contenus digestifs ainsi que celui du mucus ont été étudiés par empreinte moléculaire (TTGE).

Cette étude s'est déroulée de 1j à 44j sur 480 poulets de chair mâle de souche Ross PM3 issus d'un couvoir industriel. Les poulets ont été répartis à l'arrivée dans 16 parquets à raison de 12 animaux/m². Ils ont reçu un aliment riche en blé, tourteau de soja et maïs. Cet aliment a été choisi pour être représentatif de la pratique française, même si pas optimal pour la croissance à cause de sa forte teneur en blé. La mortalité a été enregistrée et des relevés de poids et de consommation ont été effectués à 10j, 24j, 36j et 44j. Les prélèvements du microbiote ont été effectués à 8j et 9j, 22j et 23j, sur 5 poulets/parquet dans 8 des 16 parquets choisis aléatoirement, ainsi qu'à 43j et 44j dans les 8 parquets restants, soit 80 échantillons par période, segment digestif et localisation dans le segment.

1.2 Expérience 2 : Impact de phytobiotiques sur les performances de croissance de poulets éclos à proximité de leur lieu d'élevage (Figure 22)

L'expérience 2 a eu pour but d'étudier l'effet d'un mélange de phytobiotiques à effet antibactérien et d'un programme commercial incluant ce même produit et précédé par une combinaison aux propriétés principales immunomodulatrices et antioxydantes, selon la densité d'élevage, sur des poulets placés dans des conditions post-éclosions optimales pour leur croissance. De plus l'effet d'additifs facteurs de croissance tels que les antibiotiques étant modulé par les conditions d'élevage des animaux, nous voulions évaluer l'effet de ce facteur sur l'efficacité de mélanges de phytobiotiques. Nous voulions également étudier si l'ensemble des animaux réagissaient de la même manière aux phytobiotiques, ou si des disparités apparaissaient en fonction de leur potentiel de croissance.

Cette étude s'est déroulée de 0 à 41j sur 1872 poulets mâles de souche Ross PM3. Deux combinaisons de phytobiotiques décrits dans le paragraphe 2 de ce chapitre ont été étudiées.

Afin de placer les animaux dans des conditions post-éclosions optimales pour leur croissance, le stress post-éclosion liés au transport a été réduit en faisant éclore les oiseaux dans un couvoir expérimental situé sur le site où étaient implantés les bâtiments d'élevage. Cela a permis la réduction du temps entre éclosion et première alimentation, ce qui avait pour but de diminuer les retards de croissance associés.

Nous avons cherché à déterminer l'effet de la dégradation des conditions d'élevage sur l'efficacité des phytobiotiques en faisant varier la densité d'élevage. En effet, de nombreux

travaux suggèrent que la densité est un modèle pertinent de détérioration des conditions d'élevage, car il a un impact négatif fort sur la croissance (pour revue, Estevez, 2007). De plus, contrairement à un modèle de détérioration basée sur une augmentation de la pression sanitaire, ou de la chaleur, l'augmentation de la densité d'élevage permet de travailler avec des animaux élevés dans la même cellule, et ainsi de s'affranchir d'effets extérieurs du type « effet bâtiment ». Les animaux ont été placés en densité faible ou forte, (12 et 17 animaux /m² respectivement d'après la directive 2007/43/EC comme indiqué dans le paragraphe 4.3 de ce chapitre.

Afin de tester l'effet du potentiel de croissance des animaux sur leur réponse aux phytobiotiques, nous avons cherché un indicateur permettant de prédire le poids des animaux en fin d'élevage à partir de données précoces. Le poids à l'éclosion est un mauvais indicateur du potentiel de croissance des oiseaux (Molenaar et al., 2008) car il dépend de l'âge des reproducteurs (Almeida et al., 2006; Yilmaz-Dikmen and Sahan, 2009), et du poids du résidu du sac vitellin (Wolanski et al., 2007). Or, dès 9j, le sac vitellin représente moins de 1 % du poids de l'animal (Huang et al., 2008). Nous avons donc choisi d'estimer le potentiel de croissance des animaux à partir du poids à cet âge.

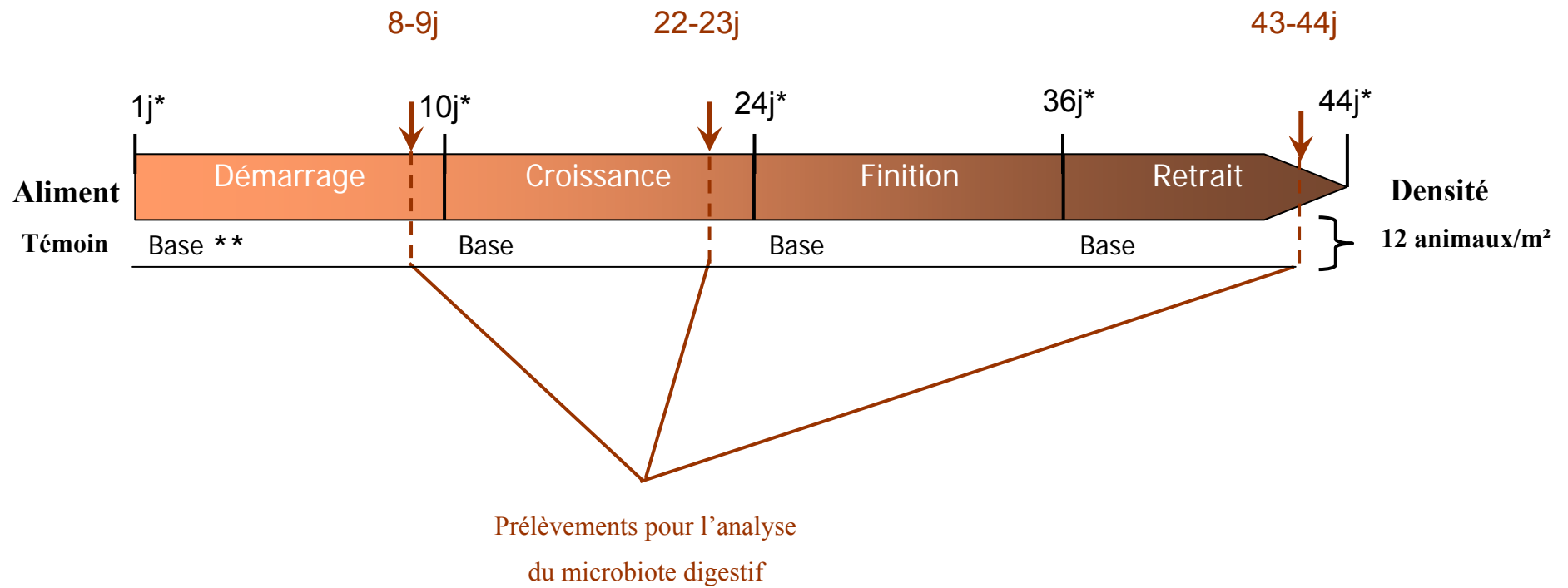
Les poussins ont reçu soit un aliment témoin à base de blé, tourteau de soja et maïs (identique à celui employé dans l'expérience précédemment décrite), soit un aliment contenant l'aliment témoin additionné du mélange à propriété antibactérienne (traitement Exp1), soit un programme commercial dans lequel l'aliment témoin contenait une succession de mélanges de phytobiotiques (traitement Exp2). Exp1, contenait une combinaison d'extraits végétaux naturels à activité principale antimicrobienne (EXVa) à partir de 22j à la concentration de 1kg/t. Exp2, contenait une combinaison d'extraits végétaux naturels à activité anti-oxydante et immunomodulatrice (EXVb) à la concentration de 0,3 kg/t jusqu'à 10j puis le mélange EXVa à 0,8 kg/t de 10 à 22j et à 1 kg/t à partir de 22j. Huit répétitions ont été effectuées pour chaque traitement (1 répétition = 1 parquet, sauf pour le poids pour lequel les mesures sont individuelles). Les performances ont été suivies par des relevés de poids et de consommation à 9, 23, 27, 36 et 41 jours. La mortalité a été enregistrée quotidiennement. De plus à 27j, et 35j des animaux ont été euthanasiés pour effectuer des prélèvements complémentaires de tissus et de contenus digestif (432 et 288 animaux respectivement). Ces prélèvements étaient destinés à étudier le mode d'action des phytobiotiques dans le cas où ils auraient entraîné une amélioration des performances de croissance. Les performances de croissance (consommation, poids, gain de poids, indice de consommation) ont été analysées

pour l'ensemble des animaux. Une seconde série d'analyse statistique a été réalisée en fonction du poids des animaux à 9j d'âge, en répartissant les données en fonction de 3 classes de poids à cet âge.

1.3 Expérience 3 : Impact de phytobiotiques sur les performances de croissance et le microbiote digestif de poulets éclos dans un couvoir industriel à grande distance de leur lieu d'élevage (Figure 23)

La troisième expérience avait pour objectif d'étudier l'impact des deux combinaisons d'extraits végétaux précédentes sur les performances de croissance et le microbiote digestif de poulets éclos et élevés dans des conditions les plus représentatives possibles des conditions commerciales. Pour y parvenir, des poussins de 1j ont été obtenus dans un couvoir industriel situé à plus de 100km du lieu d'élevage. La variabilité entre animaux de la durée du temps entre éclosion et première alimentation, était donc représentative de ce qui peut être observé dans élevages industriels. Comme dans l'expérience précédente, nous avons étudié l'effet de la dégradation des conditions d'élevage sur l'efficacité des phytobiotiques en plaçant les animaux à deux densités d'élevage (12 ou 17 poulets/m²). Pour cela les animaux ont reçu les mêmes aliments témoin et expérimentaux que ceux décrits dans l'expérience 2 De la même façon que décrit précédemment, les performances de croissance de l'ensemble des animaux, et les performances en fonction du poids à 10j ont été analysées.

L'expérience s'est déroulée de 1 à 43 jours sur 1920 poulets de chair mâles de souche Ross PM3. Pour chacun des 6 traitements (2 densités et 3 aliments), 6 répétitions ont été effectuées pour les performances de croissance (1 répétition = 1 parquet sauf pour le poids pour lequel les mesures sont individuelles) ainsi que 2 parquets réservés aux animaux utilisés pour les prélèvements pour l'étude du microbiote digestif. Les animaux ont été pesés individuellement à 10j, 24j, 32j, et 39j et la consommation a été contrôlée par parquet à 10j, 22j, 24j, 32j, et 39j. Dix animaux par traitement ont été sacrifiés pour l'analyse du microbiote à 8 et 9j, 22 et 23j, 42 et 43 jours de façon à étudier le microbiote de 4 regroupements de 5 animaux par traitement et classe d'âge. Les modifications du microbiote digestif du poulet ont été étudiées par 2 approches moléculaires : une méthode d'empreinte moléculaire pour l'analyse de l'ensemble du microbiote (TTGE) et une méthode quantitative pour estimer le nombre de bactéries des groupes majoritaires (PCR en temps réel). L'évolution de la qualité de la litière au cours du temps a également été déterminée.

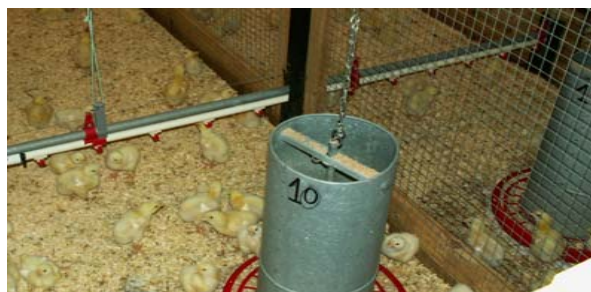
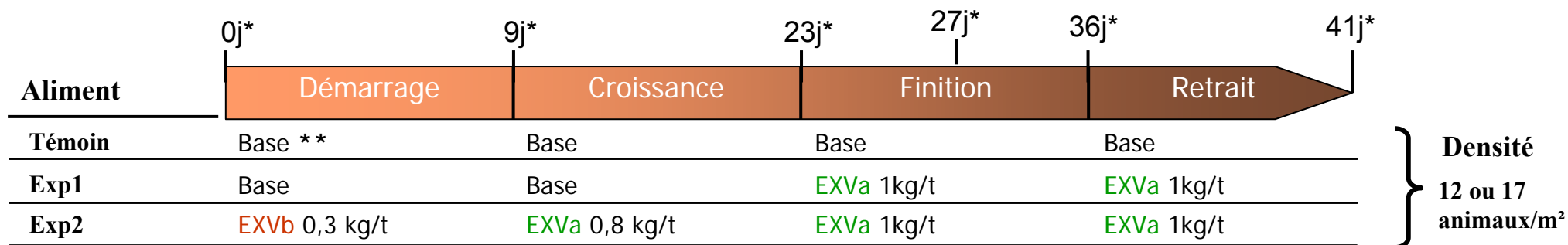


* Pesées des animaux et de l'aliment

** Base : blé / tourteau de soja / maïs (voir tableau 13)

Anticoccidien (Diclazuril) sans effet connu sur les bactéries du tractus digestif

Figure 21 : Organisation de l'expérience 1



* Pesées des animaux et de l'aliment

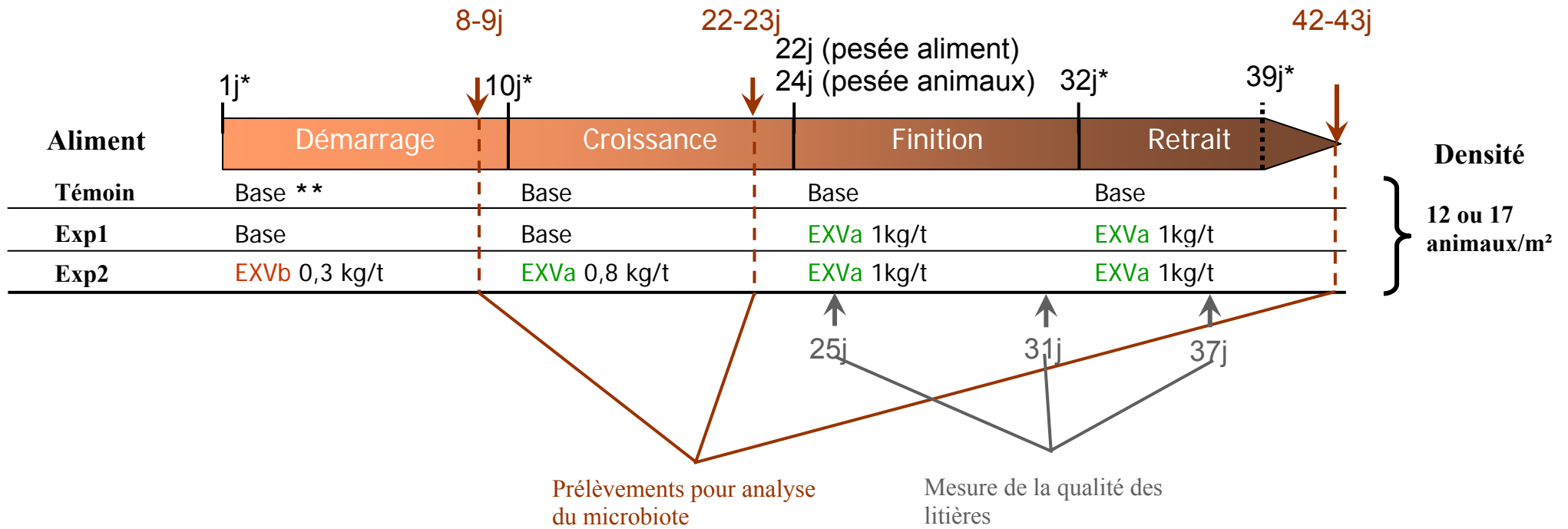
** Base : blé / tourteau de soja / maïs (voir tableau 13)

Anticoccidien sans effet connu sur les bactéries du tractus digestif (Diclazuril)

EXVa : Extraits végétaux naturels avec des propriétés essentiellement antibactériennes

EXVb : Extraits végétaux naturels avec des propriétés essentiellement anti-oxydantes et immunomodulatrices

Figure 22 : Organisation de l'expérience 2



* Pesées des animaux et de l'aliment

** Base : blé / tourteau de soja / maïs (voir tableau 13)

Anticoccidien sans effet connu sur les bactéries du tractus digestif (Diclazuril)

EXVa : propriétés antibactériennes

EXVb : propriétés anti-oxydantes et immunomodulatrices

Figure 23 : Organisation de l'expérience 3

II. Phytobiotiques

La combinaison de phytobiotiques EXVa (Enterocox® Phytosynthèse, Riom, France) utilisée au cours des expériences 2 et 3 était composée d'huiles essentielles d'eucalyptus (*Eucalyptus globulus*), de cannelle (*Cinnamomum zelanicum*) et d'ail (*Allium sativum*) ainsi que de poudre d'ail. *In vitro* ces composés présentent principalement des activités antimicrobiennes (voir la partie 1 étude bibliographique, chapitre 1 phytobiotiques). Il a également été montré que le mélange possède des propriétés antibactériennes *in vitro* (Mathlouthi et al., 2009).

La combinaison EXVb (Immunostart®, Phytosynthèse, Riom, France) utilisée au cours des expériences 2 et 3 était composée d'extrait d'*Uncaria tomentosa*, d'*Eleutherococcus senticosus*, de curcuma (*Curcuma longa*), d'extraits de pépins de raisins (*Vitis vinifera*) et de naringine (extrait du mésocarpe de pamplemousse, *Citrus paradisi*). Ces composés présentent principalement des activités anti oxydantes et immunomodulatrices (voir la partie 1 étude bibliographique, chapitre 1 phytobiotiques).

Les différents constituants des phytobiotiques ont été analysés par le laboratoire d'assurance qualité de Phytosynthèse, d'une part pour détecter la présence d'éventuelles impuretés, et d'autre part pour déterminer la composition en principes actifs après séparation par chromatographie gazeuse et détection par spectrométrie de masse avec comparaison à des bases de données privées.

Ces deux mélanges commerciaux sont des extraits végétaux titrés, c'est-à-dire que leur formulation est effectuée en tenant compte de la concentration des principes actifs de chaque composé pour que ces mélanges contiennent une quantité garantie en composés actifs majoritaires. Ils se présentent sous forme d'une poudre, avec comme support du son de blé de qualité biologique. Contrairement au produit commercialisé auquel ils correspondent, ils n'ont pas pu être encapsulés suite à un problème technique.

Pour chacun de ces extraits de plantes, la partie de la plante utilisée et la composition en principes actifs principaux est donné dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Composition des mélanges EXVa et EXVb et composés actifs majoritaires

Produits	Nom commun	Partie de la plante utilisée	Type de produit	Famille	Genre	Espèce	Composés actifs majoritaires dans chaque constituant
EXVa (Enterocox)	Eucalyptus	Feuilles	Huile Essentielle	Myrtaceae	<i>Eucalyptus</i>	<i>globulus</i>	Monoterpène / Ether : 1,8-cinéole
	Cannelle	Ecorce intérieure	Huile Essentielle	Lauracées	<i>Cinnamomum</i>	<i>zeylanicum</i>	Aldéhydes : (E)-cinnamaldéhyde
	Ail	Bulbe	Broyat	Alliaceae	<i>Allium</i>	<i>sativum</i>	Allicine
	Ail	Bulbe	Huile Essentielle	Alliaceae	<i>Allium</i>	<i>sativum</i>	Disulfures de diallyle Trisulfures de diallyle Tétrasulfures de diallyle
EXVb (Immunostart)	Uncaria	Ecorce	Broyat	Rubiaceae	<i>Uncaria</i>	<i>tomentosa</i>	Alcaloïdes totaux : Uncarines
	Eleuthérocoque	Racine	Broyat	Araliaceae	<i>Eleutherococcus</i>	<i>senticosus</i>	Eleuthérosides
	Curcuma	Rhizome	Broyat	Zingibéracées	<i>Curcuma</i>	<i>longa</i>	Curcumoïdes : Curcumine + Bisdéméthoxycurcumine + déméthoxycurcumine
	Pépin de raisin	Fruit	Broyat	Vitaceae	<i>Vitis</i>	<i>vinifera</i>	Polyphénols : Procyanidine + Catéchine + Epicatéchine
	Naringine (pamplemousse)	Fruit	Extrait purifié	Rutaceae	<i>Citrus</i>	<i>paradisi</i>	Flavanoïde : Naringine

III. Aliment

Dans chaque expérience, l'alimentation a été déclinée en quatre phases, démarrage, croissance, finition et retrait. Dans l'expérience 1, les animaux étaient nourris avec un aliment appelé 'témoin'. Il était constitué principalement de blé, tourteau de soja et maïs et contenait comme anticoccidien, du diclazuryl, ayant un faible effet sur les bactéries digestives (FDA, 1996) (Tableau 13). Cet aliment a été choisi pour être représentatif de la pratique française, n'est pas optimal à cause de sa forte teneur en blé cette matière première couramment utilisé en France (et en Europe) étant riche en facteurs antinutritionnels. Dans les expériences 2 et 3, les animaux ont été nourris avec, soit l'aliment témoin, soit un des deux aliments expérimentaux contenant des phytobiotiques (Exp1 et Exp2). Exp1 contenait la combinaison de phytobiotiques EXVa à la concentration de 1kg/t en période de finition et retrait, soit à partir de 3 semaines d'âge. Exp2 contenait la combinaison EXVb à la concentration de 0,3 kg/t en période de démarrage (les 10 premiers jours), le mélange EXVa à 0,8 kg/t en période de croissance (jusqu'à 3 semaines d'âge) et à 1 kg/en période de finition et retrait (Figures 22 et 23). Les extraits végétaux étaient mélangés au prémix de l'aliment (complexes minéraux-vitaminiques) en remplacement d'une quantité équivalente de blé, avant d'être mélangés aux matières premières.

Comme indiqué dans les figures 21 à 23, les phases d'alimentation étaient : démarrage (les dix premiers jours), croissance (jusqu'à 3 semaine), finition (4ème et 5ème semaine), et retrait sans anticoccidien (au moins les 5 derniers jours avant abattage). Lors des 3 expériences, l'aliment était donné ad libitum, sous forme de granulés (granulation à la vapeur). Les animaux avaient libre accès à l'eau.

Tableau 13. Composition des aliments du traitement témoin

	Démarrage	Croissance	Finition	Retrait
Composition (g/kg)				
Blé	370,0	400,0	450,0	500,0
Tourteaux de soja	326,1	284,4	263,3	214,0
Maïs	162,0	151,4	194,6	181,5
Pois	60,0	80,0		
Gluten de maïs			8,0	24,0
Huile de soja	46,2	50,0	50,0	50,0
Phosphate bicalcique	16,6	16,0	14,7	12,2
Carbonate de calcium	10,3	9,7	10,4	11,0
NaCl	3,0	3,0	3,0	3,0
Premix ¹	4,0	4,0	4,0	4,0
HCl Lysine			0,6	
Méthionine DL	1,6	1,3	1,2	0,3
Anticoccidien (Clinacox)	0,2	0,2	0,2	
Caractéristiques nutritionnelles (g/kg)				
Energie Métabolisable (kcal/kg)	2 938	2 986	3 033	3 105
Protéines	215	202	190	180
Lysine	11,6	10,7	9,8	8,2
Met + Cys	8,4	7,7	7,5	6,5
Tryptophane	2,6	2,4	2,3	2,1
Thréonine	8,0	7,5	6,9	6,5
Calcium	10,0	9,5	9,3	8,7
Phosphore disponible	4,2	4,1	3,9	3,5

¹ par kg d'aliment : Co (0,4 mg); Cu (16 mg); Fe (40 mg); I (1,6 mg); Mn (64 mg); Se (0,2 mg); Zn (72 mg); acétate de rétinyle (12 000 IU); cholecalciférol (3 440 IU); acétate de DL-alpha tocophéryle (80 mg); mononitrate de thiamine (4 mg); riboflavine (6,4 mg); pantothénate de calcium (20 mg); cyanocobalamine (0,02 mg); ménadione (4 mg); chlorhydrate de pyridoxine (5,6 mg); acide folique (2,4 mg); biotine (0,24 mg); niacine (80 mg); chlorure de choline (440 mg); anti oxydant (buthylhydroxyanisole, gallate de propyl et ethoxyquine, 40 mg).

IV. Animaux

4.1 Souches

Pour les trois expérimentations, les animaux utilisés étaient des poulets de chair à croissance rapide de souche Ross PM3.

4.2 Provenance des poussins et mise en place

Pour l'expérience 1, les poussins ont été obtenus auprès de l'accoureur Grelier (Volnay, France). Ils ont été incubés selon les procédures standard de l'accoureur (22j d'incubation), vaccinés contre la bronchite infectieuse et sexés au couvoir, puis transportés jusqu'à leur bâtiment d'élevage au centre INRA de Tours situé à une distance de 100 km. A leur arrivée, les poussins sont répartis dans le bâtiment d'élevage selon le protocole expérimental, et l'aliment et l'eau sont mis à disposition *ad libitum*. Dans ce cas, les poussins peuvent avoir été à jeun pendant 24 à 72 h.

Pour l'expérience 2, les œufs fécondés ont été obtenus auprès de l'accoureur Grelier (Volnay, France). Afin de limiter le retard d'alimentation qui a un impact sur le développement du tractus digestif, les œufs ont été incubés au couvoir expérimental de l'UEPEAT (centre INRA de Tours) situé sur le même site que le bâtiment d'élevage. Les poussins ont été incubés 21j (au lieu de 22j dans les pratiques standards commerciales dont l'objectif est de maximiser le nombre de poussin éclos) même si tous les œufs n'étaient pas éclos. Les poussins ont été vaccinés contre la bronchite infectieuse, sexés et rapidement mis en place (dans la demi-journée suivant l'éclosion) dans leur bâtiment d'élevage, avec un accès *ad libitum* à leur aliment et à l'eau.

Pour l'expérience 3, les poussins ont été obtenus auprès de l'accoureur Boye (St Hilaire de Loulay, France). Ils ont été incubés selon les procédures standard de l'accoureur (22j d'incubation), vaccinés contre la bronchite infectieuse et sexés au couvoir, puis transportés jusqu'à leur bâtiment d'élevage au centre INRA du Magneraud situé à une distance de 145 km. De même que lors de l'expérience 1, les animaux ont été répartis à leur arrivée dans les parquets expérimentaux avec un accès *ad libitum* à de l'eau et à leur aliment. Ils peuvent donc avoir subi une durée de jeune importante, de 24 à 72h.

De plus, tous les poussins utilisés au sein d'une même expérimentation étaient issus de reproducteurs ayant le même âge.

V. Conditions d'élevage

5.1. Densité d'élevage

Les densités d'élevage utilisées au cours des 3 expérimentations sur animaux effectuées pendant ce travail de thèse, densité appelée faible (12 poulets/m²) et forte (17 poulets/m²) par la suite, ont été choisies pour s'approcher de densités maximales de base ou sous dérogation telles qu'imposée par la directive européenne fixant des règles relatives à la protection des poulets destinés à la production de viande et applicable depuis juillet 2010 en France (European Commission, 2007). Cette directive impose aux éleveurs de ne pas dépasser 33 kg/m² sauf sous conditions leur permettant d'atteindre une densité de 42 kg /m². Durant l'expérience 1 les oiseaux ont été élevés à une densité de 12 poulets/m² Pendant les deux autres expériences ils ont été placés à une densité de 12 ou 17 poulets/m². Ces densités ont été calculées à partir des objectifs de croissance de ROSS PM3 de 2007 (AVIAGEN) à 6 semaines pour correspondre à une charge de 33 et 47 kg/m² à cet âge.

5.2 Bâtiments et parquets

Lors des expériences 1 et 2, les animaux ont été élevés dans des bâtiments d'élevage de l'UE PEAT (Unité Expérimentale Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours, INRA, Nouzilly, France). Pour l'expérience 3, ils étaient à l'UEASM (Unité expérimentale Elevage Alternatif et Santé des Monogastriques, INRA, Magneraud, France). Ils ont été placés dans des parquets d'environ 3m². L'aliment était distribué dans des nourrisseurs trémies circulaires suspendus et l'eau était distribuée par des lignes de pipettes avec récupérateur lors des expériences 1 et 2 et par des abreuvoirs à quatre coupes pour l'expérience 3.

Les bâtiments d'élevage étaient des bâtiments de type Louisiane avec un sol en béton, et équipés d'une ventilation dynamique. La litière des parquets était composée de copeaux de bois (6 kg/m²). Cette densité de litière a été choisie pour ne pas avoir besoin de procéder à des ajouts en cours d'élevage, ce qui aurait faussé la charge bactérienne dans l'environnement direct des animaux. Une évaluation régulière de l'état de la litière et de l'état sanitaire des animaux a été effectuée afin de s'assurer que ce procédé ne mettait pas en danger la santé des poulets, particulièrement en fin d'élevage. De plus, des cloisons en bois d'une hauteur de 20 cm, surmontés d'un grillage jusqu'à 1m du sol ont été mis en place pour séparer les parquets, afin d'éviter les projections de litière entre parquets, et de limiter les contaminations bactériennes d'un parquet à l'autre (par les fientes et la litière). Un système a été développé

pour réduire la surface des parquets après les prélèvements ou suite à une forte mortalité, afin de maintenir les densités (en nombre d'animaux/m²) constante tout au long des expérimentations.

5.3 Température

La température a été fixée selon le programme présenté dans le tableau 14 et adapté en fonction du comportement des animaux

Tableau 14 : Températures de consignes pour les trois expériences

Age (en jour)	Température de référence (en °C)
0-3	32
4-6	30
7-13	28
14-20	27
21-27	24
28-39	22
40-44	20

5.4 Eclairage et programme lumineux

Le programme lumineux était constitué de 23h de lumière par jour de 1 à 5j, de 20h de lumière de 6 à 11j et ensuite de 18h de lumière jusqu'à la fin. Une seule période d'obscurité était appliquée quotidiennement. L'intensité lumineuse était de 30 à 50 lux les 3 premiers jours, puis progressivement réduite à 20 lux en fin d'élevage pour les expériences 1 et 2 et à 5 à 10 lux pour l'expérience 3.

VI. Suivi des performances zootechniques de croissance

Lors des 3 expériences, les pesées des poulets ont été effectuées individuellement sur les animaux sans mise à jeun. Les contrôles de consommation ont été effectués par parquet.

Ces mesures ont été effectuées à 10j, 24j, 36j et 43j pour l'expérience 1, à 9j, 23j, 27j, 36j et 41j pour l'expérience 2, et à 10j, 22j (consommation uniquement), 24j (poids des animaux), 32j, et 39j pour l'expérience 3. Les gains de poids (GP) des animaux par période, ont soit été exprimés tels quels, soit sous forme de gains moyens quotidiens (GMQ).

6.1 Animaux éliminés des calculs de poids

Les femelles et les animaux ayant une très faible croissance (inférieure à la moyenne moins 3 écarts types) ont été exclus des analyses de poids et de gain de poids. Pour les calculs d'indice de consommation, seuls les animaux présentant un gain de poids négatif ont été exclus.

6.2 Calcul de l'indice de consommation

L'indice de consommation (IC) correspond au ratio entre la consommation et le gain de poids. Il a été calculé par parquet, et comme indiqué précédemment, les GP négatifs ont été éliminés du calcul.

6.3 Calcul de la consommation individuelle

Les consommations sont mesurées par parquets, et doivent être calculées par individu pour pouvoir comparer les différents traitements car le nombre d'animaux varie selon les parquets et les périodes (densité d'élevage, dé-tassage, prélèvements, mortalité).

Pour ce faire, dans les expériences 1 et 2, les consommations ont été calculées en prenant en compte le nombre d'animaux réellement présents chaque jour dans chaque parquet, c'est-à-dire que dans le cas des animaux morts en cours de période, seuls leurs jours de présence ont été pris en compte. De plus, dans le cas de la troisième expérience, l'augmentation croissante de la consommation quotidienne des animaux a été prise en compte pour les animaux morts en cours de période, en utilisant un coefficient correctif. Celui-ci est calculé à partir des valeurs de consommations quotidiennes théoriques d'animaux de même souche (Broiler Ross 708, Performances Objectives, juin 2007).

La prise en compte de la disparition d'animaux en cours de période dans les calculs, évite de conduire à une sous-estimation de la consommation individuelle.

6.4 Analyses des gains de poids en fonction du poids des animaux en début d'élevage (9 ou 10j)

Lors des expériences 2 et 3, l'effet des traitements expérimentaux sur le gain de poids des animaux a été étudié en fonction du potentiel de croissance des animaux. Celui-ci a été estimé à partir de leur poids en début d'élevage à 9 ou 10j, pour les expériences 2 et 3 respectivement. Cependant il est à noter que des extraits végétaux étant présents dès le premier jour avec Exp2, ceux-ci ont pu agir sur le poids à 9-10j des animaux de ce traitement,

ce poids ne représentant donc plus uniquement le potentiel de croissance des animaux. Cependant, à la vue des résultats, ne montrant pas d'effet important de ce traitement sur les performances des animaux au cours de la période de démarrage, l'analyse a pu être effectuée sans biais important.

L'analyse des résultats en fonction du poids 9-10j a été réalisée grâce à une analyse de covariance (ANCOVA) à deux facteurs (densité d'élevage et aliment) avec comme co-variable le poids à 9-10j des animaux. Comme cette analyse a permis la mise en évidence d'une interaction entre le poids à 9-10j et l'aliment ou la densité, les résultats ont été repris en fonction de catégories de poids à 9-10j. Ces catégories ont été définies comme suit : les données ont été classées pour chaque parquet en 3 groupes de poids 10j d'effectif similaire à cet âge (appelés 'Petits', 'Moyens', 'Gros'). Au sein de chacun de ces groupes de poids les effets de la densité d'élevage et du traitement alimentaire ont été étudiés par ANOVA à deux facteurs (densité et aliment), et les différences significatives entre groupes ont été déterminées en utilisant le test de Student-Newman-Keuls ($p \leq 0.05$).

VII. Suivi de la qualité des litières

La qualité des litières a été notée dans l'expérience 3 à 25j, 31j et 37j par 2 personnes. Ces notes ont été attribuées en fonction de l'aspect de la litière (couleur, humidité, formation de croûtes) sur une échelle allant de 0 pour des litières de très bonne qualité (litière propre, sèche, pas de croûtes) à 5 pour des litières très dégradées (litière sale, humide en profondeur, collante ; tableau 15). Pour chaque parquet, le pourcentage de surface correspondant à chaque note est estimé (par tranches de 5% de surface), et une note moyenne est attribuée au parquet

Tableau 15 : Echelle des scores de notation de litière

Score	Définition
1	Friable, ni croûte, ni compacte
2	Légère croûte par-dessus une couche friable
3	Surface croûtée et compactée
4	Surface humide et collante
5	Litière humide en profondeur et pâteuse

Chapitre 2 – L'étude des microbiotes digestifs

I. Prélèvement des échantillons

1.1. Euthanasie des animaux

Pour homogénéiser le taux de remplissage du tractus digestif entre animaux, avant leur euthanasie les poulets ont subi un jeûne de 3 à 9 heures, suivi d'une période de réalimentation de 3 heures.

Tous les animaux sur lesquels des prélèvements ont été effectués ont préalablement été euthanasiés par inhalation de CO₂ en les plaçant dans une enceinte étanche emplie de CO₂ (soit environ 4 litres de CO₂ détendu par animal).

1.2. Prélèvements des contenus digestifs

Toutes les étapes ont été réalisées avec du matériel et des gants stériles, et dans un environnement propre. Juste après avoir été euthanasié, chaque animal a été plumé au niveau de l'abdomen et du cou, et la peau a été nettoyée à l'alcool à 70°C pour limiter les contaminations bactériennes de l'environnement d'élevage. Une incision a ensuite été pratiquée au niveau du cou pour dégager le jabot. Celui-ci une fois clampé en amont et en aval, a été extrait. La cavité abdominale de l'animal a ensuite été ouverte pour prélever l'iléon et les caeca, après les avoir clampés. Chaque type de segment digestif a été traité par une personne différente afin que les prélèvements soient faits sur un temps le plus court possible.

Les différents segments prélevés – le jabot, la moitié distale de l'iléon et les 2 caeca – ont été ouverts longitudinalement. Leur contenu a été vidé dans des pots stériles, à l'aide d'une spatule stérile pour le jabot, et par légères pressions externes pour les deux autres segments, en faisant attention à ne pas endommager la muqueuse. Les contenus ainsi prélevés ont été stockés à 4 °C jusqu'à avoir regroupé les contenus digestifs de 5 animaux. L'échantillon ainsi formé a ensuite été homogénéisé et stocké à -20°C de 6 à 48h, selon les possibilités de stockage du site expérimental, puis transporté et stocké à -75°C jusqu'à utilisation.

1.3. Prélèvements au niveau du mucus

Comme cela a été décrit dans l'étude bibliographique (Partie 1, chapitre 3.2.2.2), plusieurs méthodes permettent de prélever les échantillons destinés à l'étude du microbiote des mucus. Les méthodes d'analyse du microbiote digestif du mucus par approche moléculaires utilisées dans ce travail impliquent une extraction d'ADN et une amplification de cet ADN par PCR. Or, l'utilisation de scrapping de muqueuse (Vahjenet al., 1998 ; Zhu et al., 2002, Wise et al., 2007), méthode rapide, conduit à des PCR inefficaces (Li et al 2003). Cette approche n'as donc pas été retenue. Nous nous sommes donc orientées vers des méthodes d'isolement des bactéries par rupture de leurs liaisons avec le mucus. Ainsi, nous avons retenu la méthode de Gong et al. (2002) qui permet l'extraction de 93 à 97% des bactéries observables par comptage dans le mucus. Nous y avons apporté quelques modifications, pour qu'elle soit compatible avec le prélèvement à la fois des contenus digestifs et du mucus. Elle consiste dans un premier temps à éliminer les restes de digesta par une solution physiologique puis à déstructurer le mucus par l'association d'une approche mécanique et chimique afin d'en séparer les bactéries.

Plus précisément, les différentes étapes de ce protocole sont les suivantes (protocole détaillé dans la partie matériel et méthode des articles présentés dans la partie 3 chapitre1.1):

- **Les restes de digesta de chaque organe sont éliminés.**

Pour y parvenir, les segments digestifs sont ouverts longitudinalement puis lavés dans une solution physiologique stérile à température ambiante par agitations manuelles douces dans trois bains successifs, de façon à ne plus observer de particules alimentaires sur les segments digestifs.

- **Le mucus est déstructuré pour collecter les bactéries qui le colonisent.**

Pour cela, le tissu est plongé dans deux bains successifs composés de sérum physiologique contenant 0.1% de Tween 80, et les tubes sont agités vigoureusement manuellement d'après la méthode de Gong et al., (2002). Les lavages des tissus digestifs de 5 animaux par traitement ont été regroupés dans un pot à centrifuger stérile et stockés à -20°C pendant 24 à 48heures.

- **Les bactéries sont récupérées par centrifugation.**

Après centrifugation, les culots de tous les échantillons ont été stockés à -75°C jusqu'à leur utilisation.

II. Extraction de l'ADN bactérien

Comme présenté dans l'étude bibliographique (partie 1, chapitre 3.1.3.1), de nombreuses méthodes sont utilisées en écologie microbienne pour extraire l'ADN bactérien des écosystèmes digestifs. Ces méthodes ont en commun de grands principes de base, mais sont adaptées empiriquement aux bactéries présentes qui ont des structures différentes et aux matrices complexes dont la composition varie (aliment en cours de digestion et sécrétions endogènes).

Dans le cadre des travaux présentés dans ce manuscrit, nous avons dans un premier temps choisi d'utiliser une méthode d'extraction de l'ADN adaptée à l'étude de la diversité du microbiote par empreinte moléculaire. Nous avons choisi une méthode rapide issue du Kit QIAamp® DNA stool de Qiagen, développé pour des fèces humains et utilisée par de nombreux laboratoires de recherche étudiant le microbiote digestif du poulet (PoultryFlorGut, 2005-2008 ; Johansen et al., 2007). Elle a été validée pour l'étude de microbiotes digestifs par empreinte moléculaire (Li et al., 2003). Cette méthode a été appliquée aux échantillons de contenus digestifs et de mucus de l'expérience 1 et aux échantillons de l'expérience 3.

Dans un second temps, pour quantifier les groupes bactériens majoritaires par PCR en temps réel, nous avons utilisé une méthode plus longue, mais plus exhaustive. Cette méthode a été développée à partir du kit G'Nome de Bio101 développé initialement pour des fèces humains, en en modifiant le protocole. Elle a été validée pour des études écologiques de microbiotes digestifs de différentes espèces animales par PCR en temps réel (Furet et al., 2009). Cette méthode a été appliquée aux échantillons de contenus digestifs de l'expérience 3

2.1 Kit QIAamp® DNA stool de Qiagen modifié

L'efficacité du kit QIAamp® DNA stool (Qiagen, Courtaboeuf, France) pour l'extraction de l'ADN bactérien et la qualité de l'ADN récupéré a été étudiée dans plusieurs études. Cependant les résultats sont variables. Ainsi, Li et al., (2003) ont montré une efficacité de lyse de 95% et Morita et al., (2007) une efficacité de 38% à 69%. Cette méthode est considérée comme permettant l'extraction d'un ADN peu dégradé et moyennement contaminé par des inhibiteurs de PCR (Scupham et al., 2007). Nous avons utilisé ce kit selon le protocole du fournisseur (Qiagen) modifié par une étape de lyse avec du lysozyme pour améliorer l'extraction de l'ADN en particulier des bactéries à Gram positif (Johansen et al., 2007) (Figure 24). L'ADN extrait était ensuite stabilisé par l'ajout de Ribonucléase-A et d'albumine de sérum bovin (Gabriel et al, 2008). Dans ce protocole, la lyse cellulaire est donc effectuée

par une lyse chimique (détergent) ainsi qu'une lyse enzymatique (lysozyme). La purification de l'ADN se fait en utilisant une matrice adsorbante destinée à capturer un certain nombre de substances pouvant inhiber les réactions de PCR, et par adsorption de l'ADN sur une colonne de silice. Le détail de l'extraction est présenté dans le matériel et méthode des articles présentés dans la partie 3 chapitre1.

2.2 Kit G'NOME de BIO 101 modifié

La méthode utilisée est dérivée de la méthode développée par Suau et al., (1999) dont la rapidité a été améliorée par l'utilisation du kit G'NOME selon le protocole modifié par Furet et coll. (2009) (Figure 24). Les auteurs rapportent une efficacité d'extraction importante et supérieure au kit QIAamp® DNA stool (communication personnelle). Dans ce protocole, la lyse des bactéries est effectuée par la combinaison d'une lyse chimique (détergent) et mécanique (broyage). L'ADN est purifié par des cycles de solubilisation précipitation (alcool/eau) après élimination de molécules inhibitrices de PCR par adsorption sur du polyvinylpyrrolidone. Le détail de l'extraction est présenté dans le matériel et méthode de l'article présenté dans la partie 3 chapitre1.2.

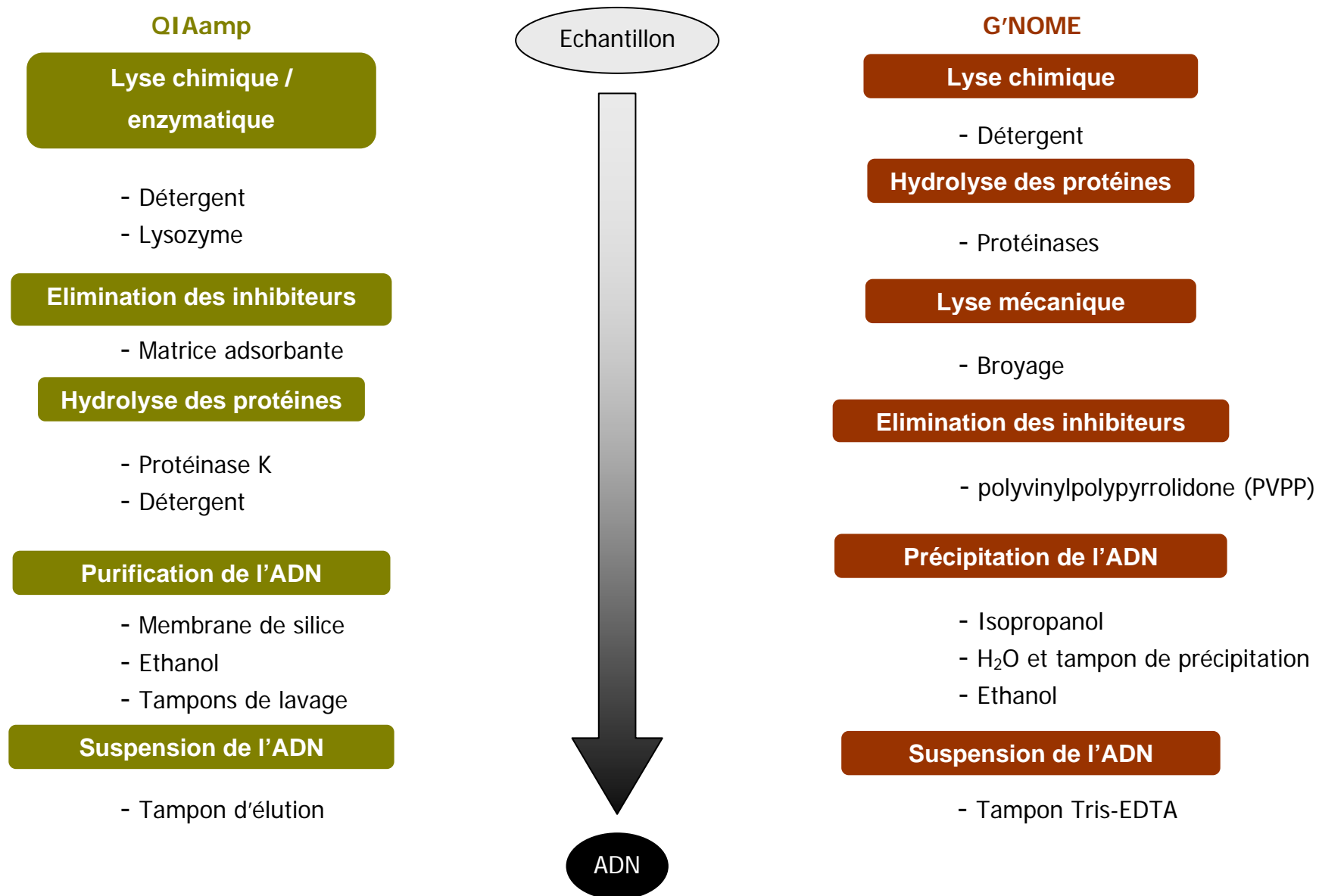


Figure 24 : Principe des méthodes d'extraction de l'ADN bactérien utilisées

2.3 Comparatif de l'efficacité des 2 méthodes

L'efficacité d'extraction d'ADN bactérien par ces deux méthodes a été évaluée en comparant pour un même échantillon dont l'ADN a été extrait par les deux méthodes, la quantité d'ADN bactérien extrait ainsi que la quantité d'ADN extrait appartenant à différents groupes bactériens majoritaires du microbiote digestif du poulet de chair. La diversité et l'abondance des séquences d'ADN obtenues par les deux méthodes ont également été évaluées. Pour la quantité d'ADN, une quantification par PCR en temps réel de l'ADN obtenu a été effectuée sur un animal âgé de 6 semaines pour un échantillon prélevé au niveau des contenus digestifs d'iléon et de caeca et au niveau du mucus de l'iléon. Pour la diversité et l'abondance des séquences d'ADN obtenues, une analyse par TTGE a été réalisée sur les mêmes échantillons ainsi que sur des contenus digestifs du caeca d'un poussin de 1 semaine.

La quantification par PCR en temps réel a été faite en ciblant les bactéries totales et les bactéries appartenant aux groupes *Clostridium leptum*, *C. coccooides*, *Lactobacillus* et *E. coli*. Les résultats de cette analyse montrent une quantité d'ADN bactérien total extraite avec la méthode G'NOME plus importante qu'avec la méthode QIAamp et ce, particulièrement dans les contenus de caeca où les résultats montrent 5.5×10^{11} copies d'ADNr16S bactéries/g de contenu avec la première méthode contre 6.5×10^{10} avec la seconde (Tableau 16). Concernant les différents groupes bactériens les quantités détectées sont globalement plus importantes avec la méthode G'NOME modifiée bien que l'amplitude de ces résultats varie selon la matrice et le groupe bactérien considéré.

L'étude par empreinte moléculaire (TTGE) de la diversité et l'abondance des séquences d'ADN obtenues semble montrer des différences d'extraction selon la méthode utilisée. Certaines bandes sont extraites de manière équivalente par les deux méthodes, mais d'autres sont préférentiellement extraites par l'une ou l'autre des méthodes utilisées (Figure 25).

Ces résultats suggèrent que pour la majorité des bactéries du microbiote digestif du poulet, le kit G'NOME modifié permet une extraction plus exhaustive de l'ADN bactérien que le kit QIAamp modifié. Ces résultats ont donné lieu à une communication en congrès (Guardia et al., 2009).

Tableau 16 : Efficacité d'extraction comparée par PCR en temps réel entre le kit QIAamp modifié et le kit G'NOME modifié sur des échantillons de microbiote de poulet de 6 semaines

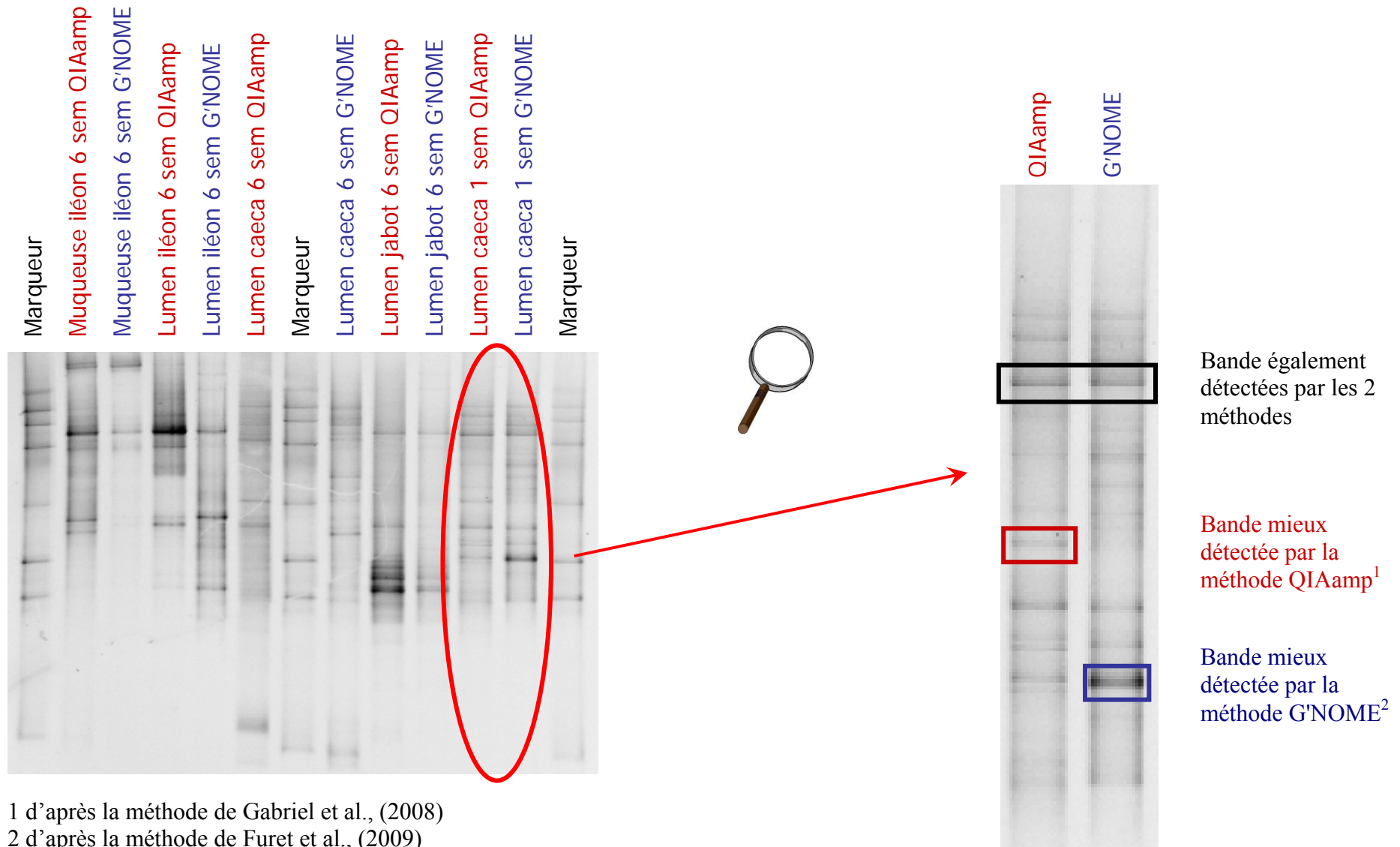
Type d'échantillon	Méthode d'extraction	Log (nombre de copies d'ADNr 16S du groupe cible)					
		<i>All bacteria</i>	<i>C. leptum</i>	<i>C. coccoides</i>	Lactobacilles	<i>E. coli</i>	
Digesta	Iléon	QIAamp ¹	9.6	7.1	nd	8.6	8.1
		G'NOME ²	10.4	7.6	7.5	9.8	7.5
	Caeca	QIAamp ¹	10.8	10.7	8.5	9.2	8.8
		G'NOME ²	11.7	11.8	10.2	10.6	9.0
Muqueuse	Iléon	QIAamp ¹	9.1	nd	nd	8.4	nd
		G'NOME ²	9.5	8.8	nd	8.7	6.9

¹ d'après la méthode de Gabriel et al., (2008)

² d'après la méthode de Furet et al., (2009)

nd : non détecté

Analyses effectuées par J. P. Furet, MICALIS, INRA de Jouy en Josas selon le protocole de Furet et al., 2009.



1 d'après la méthode de Gabriel et al., (2008)

2 d'après la méthode de Furet et al., (2009)

Figure 25 : Qualité d'extraction comparée par TTGE entre le kit QIAamp modifié et le kit G'NOME modifié sur des échantillons de microbiote de poulet

III. Empreinte moléculaire par TTGE

3.1 Réalisation des gels

Les TTGE ont été réalisées à partir de l'ADN bactérien des échantillons, amplifié par PCR grâce à des amorces ciblant la région V6-V8 de l'ADNr 16S des bactéries totales (Zoetendal et al., 1998). Les gels et la migration ont été effectués selon la méthode décrite précédemment par (Seksik et al., 2003). Le détail de la réalisation des gels, des conditions de l'électrophorèse et de la révélation des gels est présenté dans le matériel et méthode des articles présentés dans la partie 3 chapitre 1.

3.2 Identification de bandes

Lors de l'expérience 3, nous avons cherché à identifier les espèces bactériennes affectées par les différents traitements alimentaires. Suite à l'observation des gels, des bandes présentant une différence d'intensité entre échantillons digestifs d'animaux ayant consommés différentes traitements alimentaires ont été détectées. Pour identifier les bactéries à l'origine de ces différences d'intensité, l'ADN de ces bandes a été excisé des gels. L'ADN est isolé de ces bandes par diffusion dans de l'eau. L'ADN ainsi obtenu a été amplifié par PCR en utilisant les amorces et les conditions d'amplifications utilisées préalablement à la TTGE. La pureté de l'ADN a été vérifiée en comparant les profils de migration TTGE de l'échantillon digestif de départ avec l'échantillon ré-amplifié (Figure 26). Une fois la pureté établie, le produit PCR a été séquencé (Genome Express, Meylan (France)). Les séquences ont ensuite été contrôlées et nettoyées à l'aide du logiciel BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA). Leur identification a alors été recherchée par comparaison de leur séquence avec celles de la base de données internationale de GenBank de l'entrepôt américain de données bio-informatiques internationales du National Center for Biotechnology Information (NCBI), en effectuant un alignement local de séquences avec l'algorithme Basic Local Alignment Search Tool (Blast).

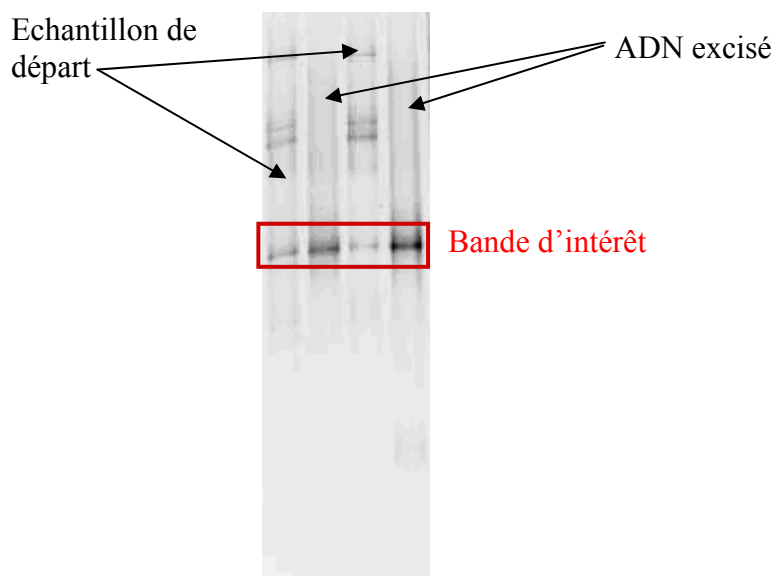


Figure 26 : Contrôle de migration et de pureté d'une bande excisée

3.3 Analyse des profils d'empreintes moléculaires

3.4.1 Traitements de l'image

Un premier traitement des photographies de gels (fichiers 'TIFF') a été réalisé à l'aide du logiciel Fingerprinting II (Bio-Rad, Marnes-la-coquette, France) qui permet d'effectuer des alignements et comparaisons de profils, mais sans analyses statistiques. Les profils de chaque gel ont été alignés entre eux à l'aide des marqueurs de migration et le bruit de fond de coloration des gels a été éliminé.

Ensuite les courbes d'intensité de chaque profils ont été exportées pour être analysées à l'aide du package StatFingerprint (version 1.3) développé sous R (version 2.9) par l'équipe Tandem de l'INRA de Toulouse (Michelland et al., 2009). Les données ont été normalisées de façon à ce que l'intensité totale de chaque profil soit égale à 1. De cette façon, le biais lié à une quantité d'ADN déposée différente entre les profils est éliminé.

L'intensité détectée pour une bande n'est pas directement proportionnelle à la quantité de séquences d'ADN présente car elle dépend à la fois de la quantité d'agent intercalant fixé sur l'ADN - qui dépend lui-même du nombre de séquences, de leur longueur, et du niveau d'exposition du gel à l'agent intercalant - et du niveau d'exposition du gel aux ultraviolets.

Lors des comparaisons entre gels, pour éviter les biais de coloration entre gels, les profils sont transformés en données binaires de type « présence/absence ». Pour chaque point du profil, la valeur 1 correspond à un point localisé dans une bande, et la valeur 0 s'il est en dehors. Les bandes sont détectées automatiquement en paramétrant les caractéristiques de reconnaissance d'un pic en fonction de la forme des courbes d'intensité obtenues. Cette transformation est également effectuée pour analyser la richesse des profils (nombre de bandes).

3.4.2. Analyse d'un profil : estimation de la richesse et de la diversité

La richesse de la population bactérienne dominante (nombre d'espèce) d'un échantillon est estimée par le nombre de bandes observées sur le profil TTGE de l'échantillon digestif (Thompson et al., 2008). Les bandes sont détectées automatiquement en utilisant le logiciel StatFingerprint après transformation des profils en données de type « présence/absence ».

La diversité a été mesurée par le logarithme négatif de l'indice de diversité de Simpson, particulièrement adapté à l'évaluation de la diversité d'une communauté bactérienne à partir de profils d'empreinte moléculaire (Michelland, 2009). Dans le cas de l'analyse d'un microbiote par empreinte moléculaire, l'indice résume par une seule valeur, une communauté complexe en tenant compte le nombre (nombre de pics) et leur abondance relative (aire sous chaque pic). L'indice de diversité de Simpson utilisé ici, correspond au logarithme négatif de l'indice de Simpson. L'indice de Simpson D est défini de la façon suivante :

$$D = \sum (n_i / N)^2$$

n = nombre total d'organisme d'une espèce

N = nombre total d'organismes toutes espèces confondues

La valeur de D varie entre 0 et 1, la valeur 0 représentant une diversité infinie, et la valeur 1, aucune diversité. Dans ce cas, plus la valeur de D est élevée, plus la diversité est faible, c'est pourquoi cet indice est souvent transformé, par exemple en en prenant le logarithme négatif (- Log D). Ainsi avec le logarithme négatif de l'indice de Simpson, les valeurs vont de zéro à l'infini, pour des milieux de diversité croissante. En pratique, une valeur faible de cet indice est obtenue pour un profil comprenant peu de bandes (faible diversité) et une valeur élevée pour un profil comprenant de nombreuses bandes de même intensité (diversité élevée). De plus la valeur de cet indice est plus faible pour un profil contenant de nombreuses bandes dont seulement quelques-unes ont une intensité très élevée, que pour un profil contenant de nombreuses bandes toutes de même intensité.

3.4.3. Comparaison de profils entre eux

Deux types de coefficients de similarité peuvent être utilisés lors des comparaisons de profils entre eux.

Des coefficients prenant en compte la globalité des informations portées par les profils (par exemple le coefficient de Pearson) : les espèces présentes (position des bandes) et leur abondance (intensité des bandes). Cependant ces coefficients ne peuvent être utilisés dans les cas de comparaisons inter-gel, car comme expliqué précédemment, l'intensité des pics dépend de l'exposition du gel au colorant et aux ultraviolets.

D'autres coefficients qui ne prennent en compte que la présence des espèces bactériennes (position des bandes) peuvent alors être utilisés (coefficient de Dice par exemple).

3.4.3.1 Estimation de la similarité inter-pools

La similarité inter pool a été calculée pour déterminer le seuil de similarité positive de la TTGE au cours de ce travail (seuil de similarité à partir duquel 2 échantillons sont considérés comme identiques), ainsi que pour déterminer la variabilité inter pools d'échantillons de même type.

Ces analyses ont été effectuées en comparant les profils d'échantillons déposés sur un même gel (coefficient de Pearson), ou sur différents gels (coefficient de Dice). Ces comparaisons de profils ont été effectuées en utilisant les logiciels Fingerprinting II ou StatFingerprint. La similarité inter pool moyenne pour un groupe d'échantillon est calculée à partir de la moyenne des coefficients de similarité des échantillons comparés 2 à 2.

3.4.3.2 Analyse de la structure des profils

L'analyse de la structure des profils consiste à comparer des profils TTGE d'échantillons issus d'animaux recevant des traitements différents. Cela permet d'avoir une vision globale des modifications de la communauté bactérienne (apparition, disparition, changement d'abondances d'espèces bactérienne). Ces analyses font appel à des analyses statistiques multidimensionnelles. Elles s'effectuent à partir de matrices de proximité établies à l'aide d'indices de proximité calculés pour toutes les comparaisons d'échantillons 2 à 2.

Ces matrices ont été analysées statistiquement afin de déterminer si deux groupes d'échantillons différaient significativement ou non. Ces analyses réalisées par analyse de similarité (ANOSIM) sont basés sur des permutations de Monte Carlo (Michelland, 2009; Michelland et al., 2009). La valeur de R obtenu indique le degré de séparation des groupes.

Les groupes sont considérés comme différents pour $p < 0,05$ et $R > 0,25$. Une valeur de R comprise entre 0,25 et 0,5 indique des groupes différents mais montrant de forts recouvrements, une valeur comprise entre 0,5 et 0,75 indique des groupes séparés avec des recouvrements modérés, et une valeur supérieure à 0,75 indique des groupes bien séparés.

Le résultat de ces matrices de corrélation a été représenté graphiquement par ordination ou par classification ascendante hiérarchique. Pour la représentation par ordination (représentation des profils TTGE multidimensionnel sous forme de points dans un plan à 2 dimensions) nous avons choisi d'utiliser des analyses multidimensionnelles non-métriques (nMDS) en utilisant le logiciel StatFingerprints (Michelland et al., 2009). Cette méthode consiste à représenter les rangs des valeurs de la matrice de proximité dans un plan à 2 dimensions (Figure 27), ce qui aboutit cependant à une perte d'information liée à une simplification de la matrice à n dimensions à seulement 2 dimensions. Pour la représentation par regroupement hiérarchique nous avons utilisé l'algorithme *Average* du logiciel StatFingerprints. Le regroupement hiérarchique consiste à représenter des profils TTGE sous la forme d'un arbre hiérarchique. Plus les échantillons sont ressemblants dans la matrice de proximité, plus ils vont être représentés par des branches proches, ces regroupements étant eux-mêmes regroupés en classes de proximité et cela jusqu'à former l'arbre complet (Figure 27).

3.5 Seuil de similarité positive

Le seuil de similarité positive est le seuil à partir duquel deux échantillons sont considérés comme identiques. Il a été évalué en mesurant pour chaque segment digestif et chaque localisation (contenu, mucus), le coefficient de similarité de Pearson entre les profils d'un même échantillon dont l'ADN a été extrait et amplifié trois fois indépendamment et pour chaque produit PCR analysé deux fois (sur 2 gels ; Figure 28). Dans le cas de cette étude, le seuil est de 97 % en moyenne (Tableau 17).

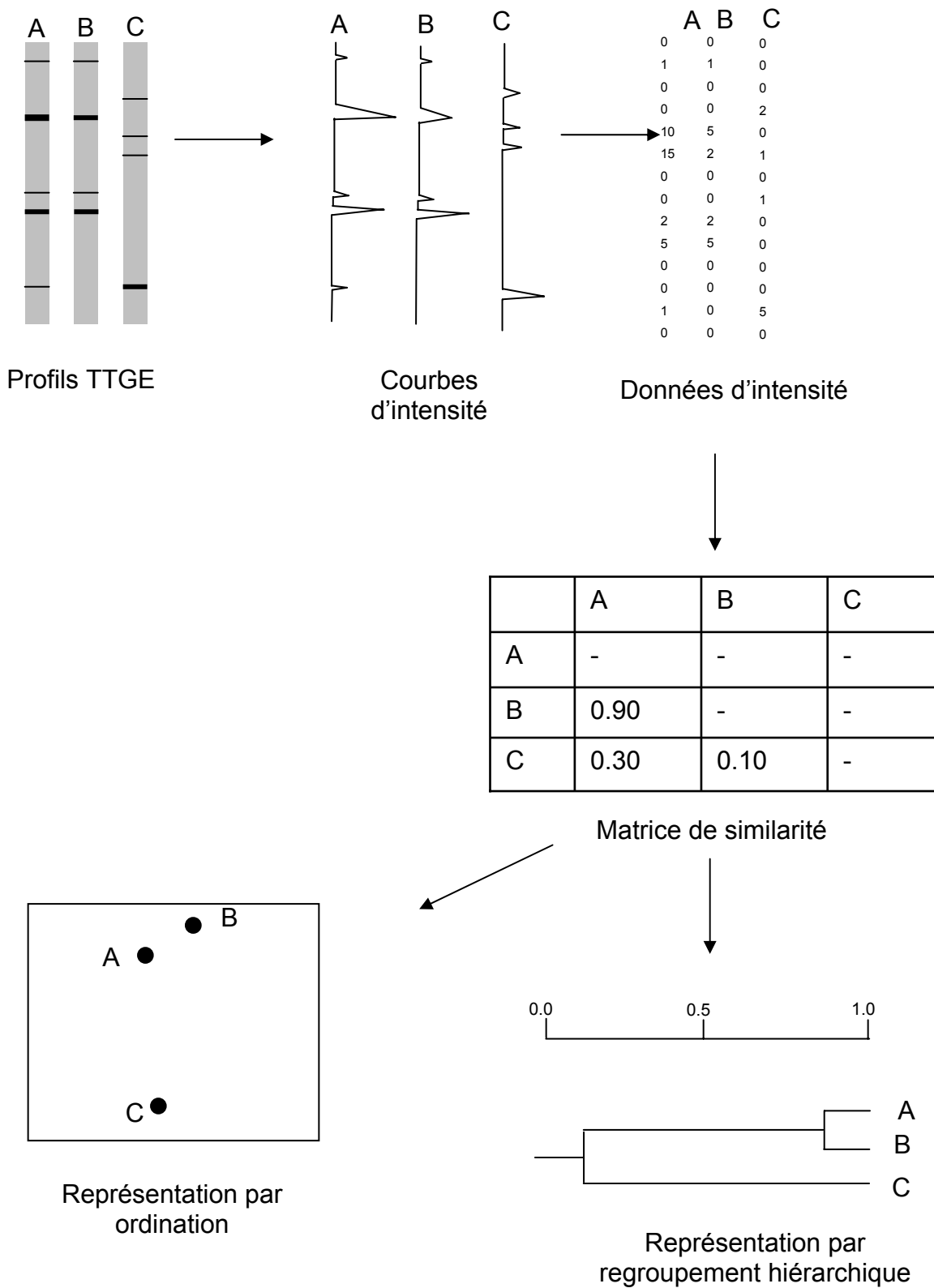


Figure 27 : Représentation schématique des étapes permettant d'aboutir à une représentation graphique des différences de structure entre profils

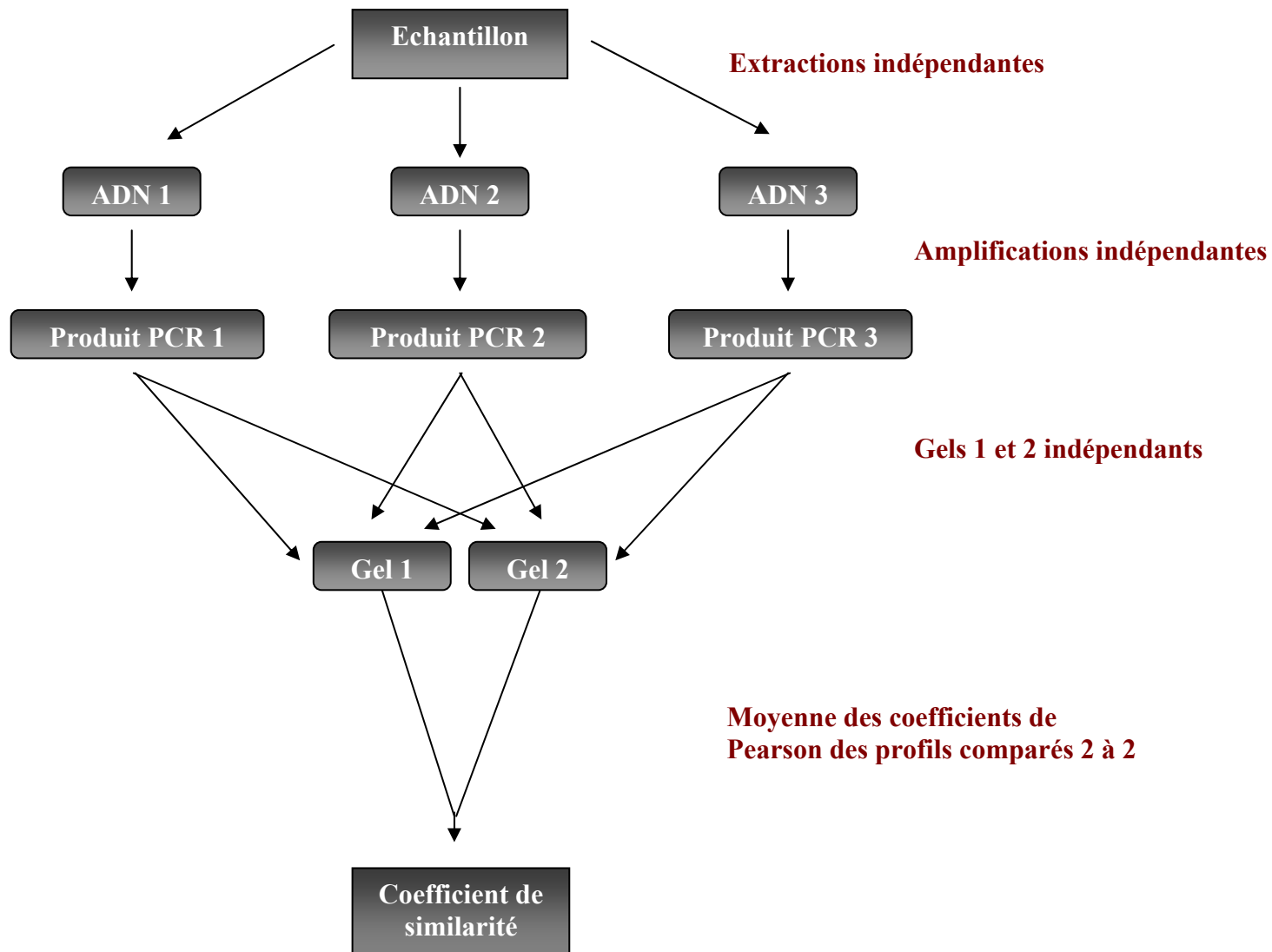


Figure 28 : Processus de détermination du seuil de similarité positive pour un échantillon

Tableau 17 : Seuils de similarité positive en fonction du type d'échantillon

Echantillon ¹	Gel ²	Paire de profils comparés ³	% similarité ⁴	Moyenne du gel ⁵	Seuil de similarité positive ⁶
Contenu du jabot	1	1-2	98.9	98.6	98.6
		1-3	97.7		
		2-3	99.3		
	2	1-2	98		
		1-3	98.2		
		2-3	99.7		
Contenus de l'iléon	1	1-2	98.3	98.2	98.2
		1-3	98.6		
		2-3	97.8		
	2	1-2	nd		
		1-3	nd		
		2-3	nd		
Contenus des caeca	1	1-2	92.3	92.8	95.6
		1-3	96		
		2-3	90.2		
	2	1-2	99.1		
		1-3	97.6		
		2-3	98.6		
Muqueuse de l'iléon	1	1-2	89.8	92.7	95
		1-3	92		
		2-3	96.4		
	2	1-2	95.7		
		1-3	96.5		
		2-3	99.1		
Muqueuse des caeca	1	1-2	98.4	97.2	97.9
		1-3	96.2		
		2-3	97.2		
	2	1-2	98.7		
		1-3	98.9		
		2-3	97.8		

¹Pour chaque localisation, l'ADN d'un même échantillon est extrait trois fois de manière indépendante puis chaque extrait est amplifié lors d'une PCR distincte. Les trois produits PCR sont alors analysés chacun sur deux gels distincts de (donc de façon indépendante)

²Les valeurs d'un même numéro de gel correspondent à des échantillons déposés sur un même gel

³Pour chaque échantillon et chaque gel, les profils des 3 extractions/amplifications de l'échantillon sont comparés deux à deux ; chaque numéro correspond à une extraction/amplification

⁴Pour déterminer leur degré de similarité entre chaque paire d'extraction/amplification, les profils TTGE de produits PCR déposés sur un même gel sont comparés pour calculer un coefficient de similarité de Pearson

⁵La similarité moyenne du gel pour un échantillon est calculée en faisant la moyenne des similarités entre les trois similarités des trois extractions/amplifications déposées sur ce gel

⁶Le seuil de similarité positive pour un type d'échantillon est calculé par la moyenne des similarités obtenues sur les deux gels pour ce type d'échantillon

IV. Dénombrement par PCR en temps réel

4.1 Choix des groupes cibles

Pour réaliser les analyses quantitatives du microbiote de l'expérience 3 par PCR en temps réel nous avons choisi de nous intéresser, d'une part aux bactéries totales, et d'autre part aux groupes quantitativement importants. Dans ce travail, nous avons retenu les 5 groupes les plus abondants dans la partie supérieure de l'appareil digestif (jabot à l'iléon) et dans la partie postérieure (caeca) d'après les données de la littérature issus des travaux les plus exhaustifs effectués par comptage de bactéries cultivables (Smith, 1965 ; Annison, 1968 ; Engberg et al, 2000) et confirmés par approches moléculaires, en particulier les données de clonage et séquençage (Lu et al, 2003 ; Bjerrum et al, 2006 ; Dumonceaux et al, 2006 ; Wise and Siragusa, 2007). Ainsi les groupes retenus ont été des groupes appartenant au phylum des Firmicutes (*Lactobacillus* ; *Clostridium leptum*, *C. coccooides*), des Bacteroidetes (*Bacteroides/Prevotella*) et des Proteobacteria (*E. coli*).

4.2 Amorces utilisées et procédure expérimentale

Pour l'étude des bactéries totales nous avons choisi d'utiliser la technologie TaqMan (voir partie1 étude bibliographique, chapitre 3 microbiote digestif). Le couple d'amorces et la sonde utilisés ont été dessinés par (Suzuki et al., 2000) et modifiés par (Furet et al., 2009). Les séquences des amorces et de la sonde sont données dans le Tableau 18.

Pour la quantification des groupes bactériens nous avons utilisé la technologie SYBR Green (voir partie1 étude bibliographique, chapitre 3 microbiote digestif). Les amorces utilisées sont issues d'articles publiés. L'origine et la séquence des différentes amorces sont listés dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Séquences des amorces utilisées pour la quantification des différents groupes bactériens

Cible	Séquence (5'-3')	Température d'hybridation	Reference
<i>All Bacteria</i>	F : CGG TGA ATA CGT TCC CGG R : TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T P : 6FAM-CTT GTA CAC ACC GCC CGT C	60°C	Suzuki et al. (2000) modifié par Furet et al. (2009)
Groupe <i>Lactobacillus</i> (dont <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Aerococcus</i> , et <i>Weissella</i>)	F: AGC AGT AGG GAA TCT TCC A R: CAC CGC TAC ACA TGG AG	60°C	F: Walter et al. (2001) R: Heilig et al. (2002)
<i>E.coli</i> species	F: CAT GCC GCG TGT ATG AAG AA R: CGG GTA ACG TCA ATG AGC AAA	60°C	Huijsdens et al. (2002)
Groupe <i>Bacteroides Prevotella</i>	F: GAA GGT CCC CCA CAT TG R: CAA TCG GAG TTC TTC GTG	60°C	Bartosch et al. (2004)
<i>Clostridium</i> cluster IV (sous-groupe <i>Clostridium leptum</i> dont <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>)	F: GCA CAA GCA GTG GAG T R: CTT CCT CCG TTT TGT CAA	60°C	Matsuki et al. (2004)
<i>Clostridium</i> cluster XIVa et b (sous-groupe <i>Clostridium coccooides-Eubacterium rectale</i>)	F: AAA TGA CGG TAC CTG ACT AA R: CTT TGA GTT TCA TTC TTG CGA A	60°C	Matsuki et al. (2002)

Le détail des conditions de la réalisation des PCR quantitative, la composition des gammes étalons et les méthodes d'analyse de la fluorescence sont présentés dans le matériel et méthode de l'article présenté dans la partie 3 chapitre 1.2.

4.3 Expression des résultats

Pour toutes les analyses, deux facteurs ont été pris en compte, l'incidence des groupes bactériens et leur abondance. L'incidence a été définie comme le nombre d'échantillons pour lesquels un groupe bactérien donné est détecté par PCR en temps réel (avec une valeur correspondant à une copie ou plus dans le puits). L'abondance correspond à la quantité de bactérie détectée pour un échantillon donné pour un groupe bactérien donné. Elle est exprimée en nombre de copies d'ADNr 16S du groupe recherché.

Pour les analyses statistiques, afin de pouvoir comparer les différents types d'échantillons entre eux, quand l'incidence d'un groupe bactérien était inférieure à 100% pour un type d'échantillon, l'abondance de cet échantillon a été remplacée par la quantité détectable minimum théorique (soit 1 copie dans le puits) comme proposé par (Wise and Siragusa, 2007).

Les résultats ont été exprimés en nombre de copie d'ADNr 16S / g de contenu frais, et transformés en \log_{10} pour les analyses statistiques. Les analyses statistiques ont été faite par ANOVA en testant la significativité des différences par le test de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Troisième partie.
Etude Expérimentale

Chapitre 1 – Connaissance du microbiote digestif du poulet

Le travail présenté dans ce manuscrit avait pour objectif d'étudier notamment l'effet de phytobiotiques sur le microbiote digestif du poulet de chair. Cela a nécessité d'approfondir nos connaissances de ce microbiote. Ce chapitre s'attache donc à présenter les expériences qui ont été menées dans ce but.

Le microbiote digestif du poulet a principalement été étudié par des approches culturales, et dans une moindre mesure par des approches moléculaires. Il a été majoritairement étudié au niveau des contenus digestifs de l'iléon et des caeca, bien que des études moins fréquentes aient été menées au niveau des contenus digestifs d'autres organes et au niveau du mucus et de la muqueuse digestive. Cependant dans la plupart de ces compartiments l'évolution temporelle du microbiote n'est pas, ou mal connue. Par ailleurs, des études suggèrent un effet des conditions d'élevage des animaux sur leur microbiote. Par exemple, la température d'élevage (Burkholder, et al., 2008) ou l'accès à des parcours extérieurs en modifient la composition (Bjerrum, et al., 2006; Gong, et al., 2008). Cependant l'effet de la densité d'élevage sur le microbiote digestif du poulet n'a été étudié que dans quelques travaux focalisés dans l'intestin grêle (Harrow, et al., 2007; Jorge, et al., 1988; Putskam, et al., 2005). Or la densité d'élevage, parce qu'elle affecte les performances de croissance des animaux, pourrait moduler l'efficacité des phytobiotiques. De ce fait nous voulions étudier l'effet des phytobiotiques des animaux placés à différentes densités d'élevage. Il nous a donc semblé opportun d'étudier préalablement l'effet de la densité d'élevage sur le microbiote digestif du poulet.

Pour répondre à ces objectifs, deux expérimentations ont été conduites. Dans la première tous les animaux étaient placés à la même densité d'élevage et nous avons étudié la dynamique spatiale et la dynamique temporelle de leur microbiote le long du tractus digestif et au sein de chaque organe. Cela constitue le point I de ce chapitre. Dans la seconde expérience, les animaux étaient élevés à une densité de 12 ou 17 animaux /m² et l'effet de la

densité sur leur microbiote a été étudié dans les contenus de différents segments digestifs. Cela constitue le point II de ce chapitre.

I. Dynamique spatiale et temporelle du microbiote digestif du poulet (expérimentation 1)

1.1. Présentation de l'étude

Il existe une forte variabilité interindividuelle du microbiote digestif du poulet (Gabriel, et al., 2007), ce qui rend difficile son étude et l'étude de ses modifications par des facteurs externes. En effet, pour détecter l'influence d'un facteur sur le microbiote digestif d'une population, il faut que son influence ne soit pas masquée par les variations interindividuelles. Il convient donc de développer des méthodes d'échantillonnage du microbiote digestif qui permettent de distinguer la part de la variation expliquée par la variabilité interindividuelle et celle expliquée par le facteur étudié. L'objectif de la présente étude était donc, dans un premier temps, de déterminer la méthode d'échantillonnage la plus appropriée à une analyse du microbiote digestif par TTGE. Dans un second temps cette étude avait pour but d'approfondir les connaissances relatives à la composition, à la structuration spatiale le long du tractus digestif et au sein d'un organe, et à la dynamique temporelle du microbiote digestif du poulet.

1.2. Influence de l'échantillonnage sur les résultats de l'analyse de ce microbiote

Les résultats de cette étude ont donné lieu à une présentation orale lors des huitièmes journées de la recherche avicole (2009, Saint-Malo, France).

**VARIABILITE INTER-INDIVIDUELLE DE LA FLORE DIGESTIVE DU POULET
DE CHAIR ANALYSEE PAR EMPREINTE MOLECULAIRE :
CONSEQUENCES POUR L'ETUDE DE L'EFFET DE SES FACTEURS DE
VARIATION**

**Guardia Sarah¹, Recoquillay François², Juin Hervé³, Lessire Michel¹, Leconte Maryse¹,
Rideaud Patricia³, Moreau-Vauzelle Carole³, Dupont Christel³, Guillot Jean François⁴,
Gabriel Irène¹**

¹*INRA - UR 83, Unité de Recherches Avicoles 37380 NOUZILLY,*

²*PHYTOSYNTHESE - 57, avenue Jean Jaures, Z.I. de Mozac Volvic, BP 50100 - 63203
RIOM, ³INRA – UE 1206 Unité d'Elevage Alternatif et Santé des Monogastriques- 17700
SURGERES, ⁴I.U.T DE TOURS - Laboratoire de microbiologie - 29 rue du Pont-Volant -
37082 TOURS*

RÉSUMÉ

Depuis l'interdiction des antibiotiques facteurs de croissance qui permettaient de contrôler la flore digestive, d'autres moyens doivent être utilisés. Différentes alternatives sont proposées. Pour connaître leurs effets sur la flore, il est nécessaire de mieux la connaître, ainsi que sa variabilité inter-individuelle pour ne pas la confondre avec l'effet des alternatives. Pour s'affranchir de cette variabilité, une approche couramment utilisée consiste à regrouper un nombre suffisamment important d'échantillons individuels considérés comme représentatifs de leur population. Pour savoir si cette approche est satisfaisante, nous avons analysé au cours de ce travail, la variabilité inter-individuelle de la flore digestive du poulet de chair pour des regroupements de prélèvements de 5, 10, 15 ou 20 animaux. Les échantillons ont été prélevés le long du tractus digestif (jabot, iléon, caeca) à différents âges (8-9j, 22-23j et 43-44j), à la fois au niveau des contenus digestifs et au niveau de la muqueuse. Cette flore a été étudiée par une méthode d'empreinte moléculaire sur gel, l'électrophorèse en gradient de température dans le temps. Les similarités entre profils bactériens ont été déterminées à l'aide du coefficient de Pearson. Pour les contenus digestifs comme pour les muqueuses, quelque soit l'âge ou le segment digestif, les profils montrent des différences et les similarités entre les pools peuvent être particulièrement faibles. Ainsi, pour des pools de 20 animaux, les coefficients de Pearson sont compris entre 39% et 97,5%, c'est-à-dire inférieurs au coefficient de similarité positive (98%) à partir duquel 2 échantillons peuvent être considérés comme similaires. La flore ne peut donc pas être représentée par un pool d'échantillons provenant d'un nombre raisonnable d'individus. Plusieurs pools doivent donc être utilisés pour représenter une situation donnée dans le but d'étudier les facteurs de variation de la flore digestive.

ABSTRACT

Since the banning of antibiotic growth promotants that allowed controlling the digestive microflora, other means must be used. Various alternatives are proposed. In order to know their effects on flora, it is necessary to know it, as well as its inter-individual variability, in order not to confuse it with effects of alternatives. In order to be free oneself from this variability, it is commonly use to pool samples from various individuals with the hypothesis that the pooled sample will be representative of the population. In order to know if this approach is satisfying, we studied inter-individual variability of digestive microflora of broiler chickens for pooled samples from 5, 10, 15 or 20 individuals. Samples were taken from digestive contents and mucosa of crop, ileum and caeca of 8-9d, 22-23d and 43-44d old broilers. Digestive microflora was studied by a molecular fingerprint method on gel: Temporal Temperature gradient Gel Electrophoresis. Similarities between fingerprints were determined with Pearson coefficient.

Molecular fingerprint analyses of all digestive contents or mucosa associated microflora showed high inter-pool variability. Similarity between pooled samples from 20 individuals varied between 39% and 97.5%, that is inferior to positive similarity coefficient (98%) from which two samples can be considered as similar. These results show that a pool of a moderate number of individual samples can not be representative of a population. In conclusion, in order to study factors affecting digestive microflora, for each status, several pooled samples must be used.

INTRODUCTION

De nombreuses alternatives aux antibiotiques facteurs de croissance (AFC) telles que des acides organiques, des probiotiques, prébiotiques et extraits végétaux sont couramment utilisées dans l'objectif de modifier la flore digestive des animaux d'élevage afin d'optimiser leurs performances de croissance (Patterson et Burkholder, 2003; Franco et al, 2006; Biggs et Parsons, 2008; Windisch et al., 2008). Cette flore digestive présente une forte variabilité inter-individuelle (Knarreborg et al, 2002; Zhu et al., 2002; Gabriel et al., 2007) ce qui rend difficile les études visant à étudier ses modifications. L'une des approches utilisées pour s'affranchir de la variabilité individuelle consiste à utiliser plusieurs pools provenant d'un nombre restreint d'individus (3 à 6), ce qui entraîne une multiplication du nombre d'analyses et l'utilisation de nombreux individus (Pissavin et al, 2006; Johansen et al, 2007; Gabriel et al, 2008). Une autre approche, moins coûteuse, consiste à regrouper des échantillons individuels afin d'obtenir un échantillon représentatif d'une situation donnée, le nombre d'individus utilisés pouvant varier de 5 à 36 (Massias et al., 2006; Zhou et al 2007; Gabriel et al, 2008; Thompson et al, 2008). Pour déterminer quelle approche peut être utilisée pour analyser la flore aux différents niveaux du tube digestif des oiseaux, nous avons au cours de ce travail, étudié la variabilité inter-individuelle de celle-ci. Pour cela, nous nous sommes intéressés à la flore des trois segments digestifs les plus importants chez les volailles (jabot, iléon pour l'intestin grêle, et caeca), aussi bien celle des contenus digestifs qui est la plus couramment étudiée, que celle des muqueuses en contact direct avec l'animal, et ce, en fonction de l'âge des animaux. Notre objectif était de déterminer si l'approche de l'étude de la flore par regroupement représentatif d'un nombre raisonnable d'échantillons individuels peut être satisfaisante. Pour étudier la flore digestive, nous avons utilisé une méthode indépendante de la culture, c'est à-dire une approche moléculaire, et plus précisément une méthode d'empreinte moléculaire sur gel, l'électrophorèse en gradient de température dans le temps (Temporal Temperature gradient Gel Electrophoresis : TTGE).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux : élevage et prélèvements

Les animaux utilisés sont des poulets de chair mâles (Ross PM3 blanc). A leur arrivée à 1j, 480 poussins sont répartis dans 16 parquets à raison de 12 animaux/m² soit 30 animaux par case. Durant la période d'étude les animaux reçoivent un programme alimentaire en 4 phases : démarrage (1-10j), croissance (10-24j), finition (24-36j) et retrait (36-44j). Les aliments sont composés principalement de

blé, de soja, de maïs et contiennent des acides aminés de synthèse (Lys, Met), des vitamines et oligoéléments. L'anticoccidien utilisé jusqu'à 36j (diclazuril, Clinacox ® 200 ppm) n'a pas d'effet antibactérien. Les aliments sont présentés sous forme de granulés.

Des prélèvements sont effectués à 8-9j, et 22j-23j, dans 8 des 16 parquets choisis aléatoirement (5 poulets/parquet), ainsi qu'à 43-44j dans les 8 parquets restants. Pour homogénéiser le niveau de remplissage du tractus digestif des animaux entre chaque parquet, les animaux sont abattus après avoir subi un jeûne d'au moins 3h suivi d'un temps d'alimentation similaire entre animaux (entre 3 h et 4 h 30 en fonction du rang d'abattage au sein du parquet). De plus, les animaux prélevés sont choisis en fonction de leur poids vif (non à jeun) déterminé la veille des prélèvements, ce poids étant proche de la moyenne de poids de l'ensemble des animaux de leur parquet.

1.2. Prélèvements et échantillonnages

Les animaux sont abattus par inhalation de CO₂. Immédiatement après, le jabot, la moitié distale de l'iléon et les caeca sont prélevés avec du matériel chirurgical stérile. Les contenus digestifs de chaque segment digestif sont vidés par très légère pression manuelle sur les tissus. Les échantillons des 5 animaux provenant d'un même parquet sont regroupés et conservés à -70°C jusqu'à extraction ultérieure de l'ADN bactérien. Les bactéries des muqueuses sont ensuite obtenues d'après la méthode de Gong et al. (2002). Une fois les contenus digestifs prélevés, les organes sont ouverts longitudinalement puis lavés dans du sérum physiologique stérile (NaCl 9g/l) pour éliminer les résidus de contenu digestif (3 fois). Les bactéries sont alors séparées de la muqueuse digestive par rupture des liaisons bactérie - muqueuse par agitation vigoureuse dans du sérum physiologique stérile contenant un détergent (tween 80, 0.1%, v/v) (2 fois). Ces 2 derniers lavages des 5 animaux du même parquet sont regroupés et conservés à -20°C. Le lendemain, après décongélation, ils sont centrifugés une première fois 20 min à 27 000 g à 4°C, puis après élimination du surnageant le culot est à nouveau centrifugés 40 min à 17 000 g à 4°C. Le culot contenant les bactéries des muqueuses est conservé à -70°C jusqu'à l'extraction de l'ADN.

1.3. Analyse de la flore digestive

Formation des pools : De façon à pouvoir étudier la variabilité inter-pool pour des pools de tailles différentes, l'ADN bactérien est extrait à partir de 4 pools d'échantillons prélevés sur 5, 10, 15 ou 20 animaux. Les pools de 10, 15 et 20 animaux sont formés en regroupant les prélèvements de pools de 5 animaux issus de 2 parquets différents.

Extraction de l'ADN bactérien : Elle est effectuée avec le kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (Li et al., 2003) (Qiagen S.A., Courtaboeuf) selon le protocole défini par le fournisseur auquel une étape avec du

lysozyme est ajoutée pour améliorer l'extraction de l'ADN en particulier des bactéries à Gram positif (Johansen et al, 2007). De plus pour les échantillons de faibles concentrations, 2 passages sur colonne QIAamp spin, utilisée lors de l'étape de purification de l'ADN, sont réalisées.

Amplification de l'ADNr 16S : Afin de visualiser l'ensemble des bactéries majoritaires, la région variable V6-V8 de l'ADNr 16S bactérien est amplifiée par PCR en utilisant des amorces ciblant le domaine Bacteria (Bact 968-GC-f et Bact 1401-r) (Nübel et al., 1996), et déjà utilisées pour l'analyse de la diversité de la flore digestive du poulet (van der Wielen et al., 2002; Zhu et al., 2002). Les produits de PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% contenant du bromure d'éthidium pour contrôler leur taille (433 pb) et leur concentration.

Electrophorèse en gradient dénaturant de température (TTGE) : Les produits obtenus par PCR sont séparés par TTGE en utilisant un Dcode Universal Mutation Detection System (Biorad, France) (Gabriel et al., 2007). Dans un premier temps, un gel a été réalisé en déposant les produits de PCR provenant des contenus digestifs de l'iléon des 4 pools issus de 5, 10 et 15 animaux. Ensuite les pools issus de 15 animaux ont été comparés pour les contenus digestifs du jabot, de l'iléon, et des caeca. Enfin, les autres gels ont été réalisés en déposant l'ADN des pools de 20 animaux pour chaque type de flore (contenus digestifs ou muqueuse) et type de segment digestif (jabot, iléon ou caeca) et prélevés à 3 âges différents (8-9j, 22-23j, 43-44j).

Sur chaque gel, sont déposés 12 échantillons et 3 pistes sont utilisées pour un marqueur de migration. Celui-ci contient 8 ADN de clones issus de bactéries présentes dans les fèces humaines (Suau et al, 1999).

1.4. Détermination de la similarité

Les profils de TTGE obtenus sur un même gel, sont comparés en utilisant le logiciel Fingerprint II (Biorad, France). Le marqueur de migration est utilisé pour normaliser les profils. Les pourcentages de similarité entre les pistes sont calculés en tenant compte de la position et de l'intensité des bandes en utilisant la méthode des corrélations de Pearson.

Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel StatView® (Abacus concepts, Berkeley, CA, USA). Le test de Student-Newman-Keuls ($p \leq 0,05$) est utilisé pour comparer la similarité des différents types d'échantillons déposés sur un même gel. Ainsi, on compare entre chaque type d'échantillon les coefficients de similarité calculés pour chaque paire de profils des 4 pools d'un même type (même localisation de prélèvement, même âge, même nombre d'individus prélevés).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Un seuil de similarité positive tenant compte des

variations liées à l'extraction de l'ADN, son amplification et le dépôt sur le gel a été déterminé. Il est de 98%.

La comparaison, sur un premier gel, des pools d'échantillons provenant de contenus d'iléon de 5, 10 ou 15 animaux âgés de 22-23j montre des similarités inférieures au seuil de similarité positive. L'augmentation de la taille du pool de 5 à 15 animaux entraîne une augmentation significative de la similarité inter-pool (Tableau 1). La similarité entre les 4 pools de 15 animaux atteint 97% (Tableau 1), valeur très proche du seuil de similarité positive.

Tableau 1: Similarité (coefficient de Pearson) entre pools d'échantillons provenant de contenus digestifs d'iléons de 5, 10 ou 15 animaux âgés de 22-23j (n=4)

	Taille de pool			ESM ¹	Valeur de P
	5 animaux	10 animaux	15 animaux		
Contenu d'iléon (22-23j)	90,7 ^b	92,2 ^{ab}	97,0 ^a	1,61	*

¹ ESM : Erreur standard de la moyenne

(a-b) les moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement ($P < 0,05$)

* : $P \leq 0,05$

La comparaison, sur un second gel, de similarité inter-pools de 15 animaux entre les contenus digestifs du jabot, de l'iléon et des caeca à 22-23j montre une différence entre segments digestifs (Tableau 2).

Tableau 2: Similarité (coefficient de Pearson) entre pools d'échantillons provenant de contenus digestifs de 15 animaux âgés de 22-23j (n=4)

	Segment digestif			ESM ¹	Valeur de P
	Jabot	Iléon	Caeca		
Pool de 15 animaux (22-23j)	70,0 ^b	96,8 ^a	87,4 ^a	4,65	**

¹ ESM : Erreur standard de la moyenne

(a-b) les moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement ($P < 0,05$)

** : $P < 0,01$

La similarité inter-pool est significativement plus faible dans le jabot (70%) par rapport à l'iléon (97%) et aux caeca (87%) (Tableau 2). Les similarités (Pearson) obtenues pour les pools de 15 sont comparables à celles obtenues par Zhou et al. (2007), de 86% et 94% pour l'iléon et les caeca respectivement. Alors que dans le cas de l'iléon, la similarité est proche du seuil de similarité positive (98%), comme observé précédemment (Tableau 1), dans le cas du jabot et des caeca, la similarité est beaucoup plus éloignée. L'analyse a donc été poursuivie avec des pools de 20 animaux pour tous les types de flore étudiés.

Les similarités inter-pool de 20 animaux varient entre 45% et 96 %, pour les contenus digestifs, et entre 39% et 97,5%, pour les muqueuses (Tableau 3).

Tableau 3: Similarité (coefficient de Pearson) entre pools d'échantillons provenant de 20 animaux en fonction de l'âge (n=4)

		Age			ESM ¹	Valeur de P
		8-9j	22-23j	43-44j		
Cont.	Jabot	84,1	92,3	75,9	4,42	NS
	Iléon	45,3 ^b	89,9 ^a	78,8 ^a	10,16	*
	Caeca	87,9 ^b	93,7 ^a	96,2 ^a	1,36	**
Muq.	Jabot	82,8 ^b	93,8 ^{ab}	97,5 ^a	3,86	*
	Iléon	38,9 ^b	92,6 ^a	71,9 ^a	8,49	**
	Caeca	95,5	96,8	95,7	0,50	NS

¹ ESM : Erreur standard de la moyenne

Les résultats comparés sur une même ligne proviennent d'un même gel TTGE

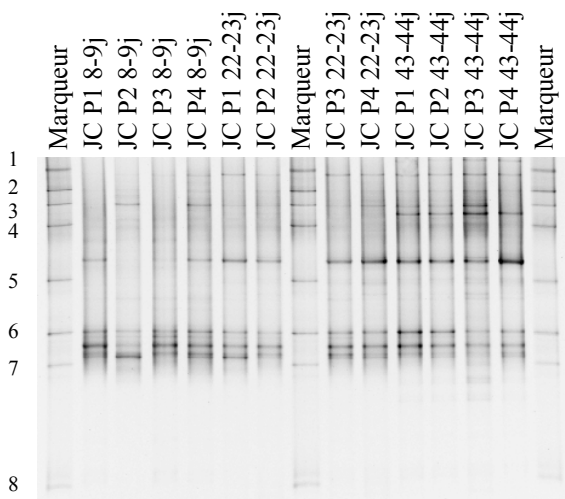
(a-b) les moyennes dans la même ligne suivies de lettres différentes diffèrent significativement (P<0,05)

NS : P>0,05 ; * : P≤0,05, ** : P<0,01

Cont : contenu, Muq : muqueuse

Dans la plupart des cas, la similarité inter-pool de 20 animaux est bien inférieure au seuil de similarité positive de 98%. Ces différences entre profils sont dues à la fois à l'existence de bandes spécifiques à un ou plusieurs pools, et à des variations d'intensité de bandes entre les pools. C'est ce qui est illustré dans le cas du contenu du jabot (Figure 1).

Figure 1 : Profil d'ADN (TTGE) de la flore du contenu du jabot (pools de 20 animaux)



Marqueur : profil du marqueur de migration

JCP1-JCP4: profils des pools 1 à 4 d'échantillons de contenus (C) digestifs de jabot (J) d'animaux de 8-9j, 22-23j ou 43-44j.

Cependant les valeurs mesurées pour la muqueuse du jabot d'animaux de 43j (97,5%), et pour les caeca, au niveau du contenu pour les animaux de 43j (96%), et de leur muqueuse quelque soit l'âge des animaux considérés (95,5%-97%), sont très proches du seuil de similarité positive (Tableau 3).

Aussi bien dans le cas des contenus digestifs, que des muqueuses, on observe dans certains segments digestifs, une augmentation de la similarité inter-pool. Ainsi dans le cas du jabot, on observe pour les échantillons de muqueuse une augmentation significative de la similarité inter-pool à 43j par rapport à 8j. Au niveau de l'iléon, on observe une augmentation à la fois au niveau de son contenu et de sa muqueuse à partir de 22-23j. Au niveau de la muqueuse des caeca, la similarité inter-pool étant déjà très élevée à 8-9j, on observe une augmentation de similarité à partir de 22-23j uniquement au niveau du contenu.

La faible similarité inter-individuelle de la flore digestive chez le jeune animal pourrait être due à une forte influence de la génétique de l'individu comme le montre la plus forte similarité de flore entre enfants jumeaux homozygotes que celle entre jumeaux dizygotes ou enfants non apparentés (Stewart et al, 2005). Par la suite, des facteurs extérieurs à l'animal, tels que l'alimentation ou l'environnement d'élevage (Gabriel et al, 2006), pourraient avoir un rôle prépondérant dans la composition de la flore.

Dans le cas des contenus digestifs, les valeurs que nous observons sont supérieures à celles rapportées dans la littérature. Ainsi, van der Wielen et al (2002) rapportent un coefficient de Pearson proche de 50% quelque soit le segment digestif, du jabot au caeca, et l'âge des animaux de 4 à 39j. De leur côté, Hume et al (2006) observent des coefficients de Pearson de 67 et 86% pour l'iléon et les caeca respectivement. Ces faibles valeurs pourraient s'expliquer en partie par le faible nombre d'animaux utilisés dans ces études pour chaque traitement (3 et 6 animaux respectivement).

Dans notre travail, nous avons en plus de la flore des contenus digestifs des trois principaux sites de présence de la flore chez le poulet, étudié la flore digestive des muqueuses. Celle-ci, bien que moins étudiée que celle des contenus digestifs, a fait l'objet de plusieurs travaux dès le début des études sur la flore digestive des oiseaux (Fuller et Turvey, 1971). Cependant, chez ces derniers animaux, seules quelques études utilisant des approches moléculaires ont été réalisées (Gong et al., 2002; Collado et Sanz, 2007; Gong et al., 2007; Thompson et al., 2008). Seule l'étude réalisée par Thompson et al. (2008) sur la muqueuse iléale d'animaux nous donne une indication sur la variabilité inter-individuelle. Ces auteurs trouvent un coefficient de similarité de Dice de 52,5% pour des animaux de 42j. Cette plus faible valeur s'explique probablement par une comparaison de flore individuelle (6 animaux), et non pas de pools d'individus.

L'étude de la variabilité inter-pool de 20 animaux de la flore des contenus digestifs et des muqueuses du jabot, de l'iléon et des caeca montre que celle-ci demeure importante, particulièrement chez les jeunes

animaux. Dans les conditions de cette étude, réalisée pour limiter au maximum la variabilité inter-individuelle de la flore digestive, nous ne pouvons donc pas conclure qu'il est possible de s'affranchir de cette variabilité en regroupant des échantillons provenant d'un nombre raisonnable d'animaux (5 à 20). La meilleure approche pour s'affranchir de cette variabilité semble donc de regrouper des échantillons provenant d'un petit nombre d'individus tout en conservant une visualisation de cette variabilité en utilisant plusieurs pools. L'âge des animaux étudiés doit être pris en compte pour le choix du nombre de pools à comparer. Une modification de la flore entre traitements peut alors être mise en évidence lorsque les empreintes moléculaires montrent des différences globales observables par exemple après analyse par classification ascendante hiérarchique représentée par un dendrogramme (Pissavin et al, 2006 ; Johansen et al, 2007) ou par analyse en composante principale (Gérard et al, 2008). Une différence peut aussi être détectée si ces empreintes montrent l'apparition ou la disparition, et/ou la modification de l'intensité d'une ou plusieurs bandes entre les différents pools des différents traitements étudiés (Knarreborg et al., 2002 ; Gabriel et al, 2008). Ces différences peuvent alors être quantifiées par des méthodes telles que la fluorescence *in situ* (FISH) ou la PCR en temps réel.

CONCLUSION

La variabilité inter-individuelle de la flore digestive du poulet est importante, tout particulièrement chez le jeune animal âgé d'une semaine. Le regroupement d'échantillons provenant d'un nombre d'individus compris entre 5 et 20 ne permet pas d'obtenir une flore représentative d'une situation donnée. En effet, si on compare des échantillons de flore provenant de regroupements de 20 individus, on observe une variabilité inter-pool non négligeable. Pour pouvoir étudier les modifications de la flore liées à des facteurs extérieurs comme des alternatives aux AFC, il faut donc tenir compte de cette variabilité. Plusieurs pools doivent donc être utilisés pour représenter une situation donnée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Biggs, P., Parsons, C.M., 2008. Poul. Sci.(87), 2581-2589.
 Collado, M.C., Sanz, Y. 2007. J. Food Prot., (70), 2799-2804.
 Franco, R.M., Oliveira, L.A.T.d., Carvalho, J.C.A.d.P., 2006. Higi.Alim. (20), 22-33.
 Fuller, R, Turvey, A., 1971. J Appl Bacteriol, (34), 617-622.
 Gabriel, I., Leconte, M., Guillon, J., Rideaud, P., Moreau-Vauzelle, C., Dupont, C. 2007.16th

European Symposium on Poultry Nutrition, Strasbourg, France.

Gabriel, I., Pissavin, C., Williams, J., Mallet, S., Beven, V., Burel, C., Leconte, M., Rideaud, P., Moreau-Vauzelle, C., Dupont, C., Fravallo, P., Lessire, M., 2008. 6th INRA-RRI Symposium on Gut Microbiome, Clermont-Ferrand, France, pp. 81-82
 Gerard, P., Brezillon, C., Quere, F., Salmon, A., Rabot, S., 2008. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology (14), 115-122.
 Gong J., Forster, R.J., Yu, H., Chambers, J.R., Sabour, P.M., Wheatcroft, R., Chen, S. 2002. FEMS Microbiol. Lett., (208), 1-7.
 Gong, J., Si, W., Forster, R.J., Huang, R., Yu, H., Yin, Y., Yang, C., Han, Y. 2007. FEMS Microbiol. Ecol., (59), 147-157.
 Hume, M.E., Clemente-Hernandez, S., Oviedo-Rondon, E.O., 2006. Poult. Sci. (85), 2106-2111.
 Johansen, C.H., Bjerrum, L., Pedersen, K., 2007. Acta Vet. Scand. (49), 30 Journal Open access.
 Knarreborg, A., Simon, M.A., Engberg, R.M., Jensen, B.B., Tannock, G.W., 2002. Appl Environ Microbiol (68), 5918-5924.
 Li, M., Gong, J., Cottrill, M., Yu, H., Langes C.d., Burton, J., Topp, E. 2003. J. Microbiol. Methods, (54), 13-20.
 Massias, B., Arturo-Schaan, M., Elie, A.M., Bebin, K., Hocde, V., Denayrolles, M., Urdaci, M.C., 2006. Reprod. Nutr. Develop. (46), S105.
 Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W., Backhaus, H. 1996. J. Bacteriol., (178), 5636-5643.
 Patterson, J.A., Burkholder, K.M., 2003. Poult.Sci. (82), 627-631.
 Pissavin, C., Gabriel, I., Burel, C., Mallet, S., Maurice, R., Lessire, M., Fravallo, P. 2006. Reprod. Nutr. Develop. (46), S26.
 Stewart, J.A., Chadwick, V.S., Murray, A. 2005. J. Med. Microbiol., (54), 1239-1242.
 Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.J., Gibson, G.R., Collins, M.D., Dore, J., 1999. Appl Environ Microbiol (65), 4799-4807.
 Thompson, K., Burkholder, K., Patterson, J., Applegate, T.J. 2008. Poult. Sci., (87), 1624-1632.
 van der Wielen, P.W.J.J., Keuzenkamp, D.A., Lipman, L.J.A., van Knapen, F., Biesterveld, S. 2002. Microb. Ecol., (44), 286-293.
 Windisch, W.M., Schedle, K., Plitzner, C., Kroismayr, A. 2008. J. Anim. Sci., (86), E140-8.
 Zhou, H., Gong, J., Brisbin, J.T., Yu, H., Sanei, B., Sabour, P., Sharif, S. 2007. Poult. Sci., (86), 2541-2549.
 Zhu, X.Y., Zhong, T., Pandya, Y., Joerger, R.D. 2002. Appl. Environ. Microbiol., (68), 124-137.

1.3. Variation spatiale et temporelle du microbiote des contenus et du mucus digestif du poulet, du jabot aux caeca

Article en préparation pour une publication dans Archiv für Geflügelkunde

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15

**SPATIAL AND TEMPORAL VARIATION OF CHICKEN MICROBIOTA OF
DIGESTIVE CONTENT AND MUCUS FROM CROP TO CAECA ASSESSED BY
TTGE**

S. Guardia^{*1}, M. Leconte^{*}, P. Rideaud[†], C. Moreau-Vauzelle[†], C. Dupont[†], J. -F. Guillo^{‡I}.
Gabriel^{*}

^{*}INRA - UR 83, Unité de Recherches Avicoles 37380 NOUZILLY, FRANCE

[†]INRA – UE 1206 Unité d'Élevage Alternatif et Santé des Monogastriques- 17700
SURGERES, FRANCE

[‡]I.U.T DE TOURS - Laboratoire de microbiologie - 29 rue du Pont-Volant - 37082 TOURS,
FRANCE

16 **ABSTRACT**

17 The differences in spatial and temporal dynamics between digestive microbiota of the mucus
18 and the digestive content are poorly known in chicken. The mucus microbiota being in direct
19 association with the host, it may play an important role in its digestive function and health. In
20 the present study the temporal dynamics of the digestive microbiota was thus studied along
21 the digestive tract in mucus and digestive contents. The inter-pool similarity, the richness and
22 the structure of the digestive microbiota were studied for both locations, by temporal
23 temperature gradient gel electrophoresis, in crop, ileum and caeca of 1, 3 and 6 weeks old
24 broilers. Results showed that the similarity increase with age in most of the sample location,
25 probably due to a greater influence of genetics factor on young birds. The richness of
26 microbiota was higher in mucus than in digestive content as well as in caeca compared to crop
27 and ileum. In each organ, important differences were observed comparing the structure of the
28 microbiota of the digestive contents and mucus. Important changes occur in the microbiota in
29 crop mucus, in ileum digestive content and in caeca in both locations as the chickens grow
30 older. Those results underline that mucus and digestive contents are two different biotopes in
31 which a temporal related dynamics occurs, which is specific to each digestive organ.

32

33

34 INTRODUCTION

35 Digestive microbiota plays an important role in chicken health and growth (Gabriel et al.
36 2006). The composition of microbiota of digestive contents changes between organs as
37 assessed by cultural and molecular methods (Smith 1965b; van der Wielen et al. 2002; Lu et
38 al. 2003). The three main sites of microbial colonization are caeca, crop and ileum. In each
39 organ, different area can be colonized by microbiota, *i.e.* food particles and fluids presents in
40 the digesta but also mucus produced by the host animal. The microbiota of the outer layer of
41 the mucus is in closer contact to the animal host than microbiota of content and may have a
42 major role in the host growth and health; however, in chicken it is not much studied.

43 The microbiota could varies during chicken life as reported in digestive content (Smith 1965a;
44 van der Wielen et al. 2002; Lu et al. 2003), but information about those temporal variations
45 are scarce in some organs and in mucus.

46 Due to the lack of knowledge on temporal variation of chicken digestive microbiota,
47 particularly in mucus, variations of the microbiota were investigated during all the rearing
48 period along the digestive tract in digestive content and mucus. Those variations were
49 investigated in crop, ileum and caeca of chickens, one, three or six weeks old, by temporal
50 temperature gradient gel electrophoresis (TTGE).

51

52 MATERIAL AND METHODS

53 Bird management and sample collection

54 The experiment was conducted according to the French specific guidelines related to
55 experimental animals (European Commission 2010). A total of 520 one day-old white Ross
56 PM3 male broilers, vaccinated against infectious bronchitis, were obtained from a commercial
57 hatchery (Sicamen, Volnay, France). They were raised in a temperature controlled room at
58 avian experimental center (Nouzilly, France). Broilers were randomly distributed in 16 floor
59 pens of 2.5 m² of useful area (12 birds per m², with 2 supplementary birds per pen for
60 eventual early mortality, which were eliminated after one week of rearing) and reared on
61 wood shavings without further addition of litter. Temperature was decreased gradually from
62 32°C at d1 to 22°C at d28. The lighting program consisted in 23h of light from d1 to d5, in
63 20h of light from d6 to d11 and of 18h in light from d12 to d42. Birds were fed *ad libitum* a
64 four phases diet mainly composed of wheat, soybean meal and maize. The phases where
65 starter (d1 to d10, ME 2938 kcal/kg, CP 21.5%), grower (d10 to d22, ME 2986 kcal/kg, CP
66 20.2%), finisher (d22 to d32, ME 3033 kcal/kg, CP 19.0%) and withdrawal (d32 to d39, ME

67 3105 kcal/kg, CP 18.0%). An anticoccidial drug was used except in the withdrawal diet. It
68 was a synthetic diclazuril (Clinacox ®, 200 ppm), with a limited effect on bacteria of the
69 digestive tract (FDA 1996), and no antibiotic growth promoter was used. The diet was
70 presented as 2.5 mm pellet. Birds had free access to water.

71 The mortality was recorded daily. At d1, birds were weighted by floor pen, and they were
72 weighted individually at the beginning of each rearing period and at d7 and d21 for group A
73 and d42 for group B, with no fasting period.

74

75 When one week (d8 and d9), and three weeks old (d22 and d23) in eight floor pens randomly
76 distributed among the 16 floor pens, five birds with an intermediate weight, respective to their
77 floor pen, were selected for microbiota analysis. After one week, the floor pen space was
78 reduced to maintain stocking density. When six weeks old (d43 and d44), five birds chosen on
79 the same criteria were selected on the eight other floor pens. These birds were euthanized by
80 CO₂ inhalation after a 3h to 8h fasting period followed by a 3h feeding period. These fasting
81 and feeding periods were performed in order to homogenize the digestive tract filling between
82 birds. Immediately crop, distal half of ileum and caeca were collected and kept on ice.
83 Digestive contents of crop were collected with a sterile spoon after longitudinal opening.
84 Digestive contents of ileum and caeca were collected by gentle pressure along the organ. The
85 digestive contents of these 3 organs were pooled by 5 birds, homogenised, and stored at -80°C
86 until further processing. Mucus-associated bacteria were collected according to Gong et al.
87 (2002) with minor modifications. Briefly, after collection of digestive contents, ileum and
88 caeca were opened longitudinally, and the three organs were gently washed in three 25 to 40
89 ml saline sterile baths (NaCl 9g/l) to remove unattached food particles and bacteria. The
90 efficiency of wash was checked visually. Mucus associated bacteria were released from the
91 wall using a detergent (two saline baths of 13 to 20 ml containing 0.1% tween 80) and a
92 strong mechanical agitation in order to break mucins. These wash were pooled for 5 birds and
93 bacteria were pelleted by a high speed centrifugation (28000 g, 20 min, 4°C). For each organ,
94 the mucus-associated samples were stored at -80°C until further processing. After sampling, 4
95 pools of samples of 20 birds were done for each sampling age (1 week, 3 week and 6 weeks).

96

97 **DNA Extraction**

98 Concerning mucus samples of crop (whatever the age of sampling) and caeca (one week), it
99 was not possible to discard all the supernatant without losing the pellet in the 200 ml tubes

100 maybe due to viscous substances in these samples. Thus, after unfreezing, the pellet mixed
101 with remaining supernatant was thus again centrifugated at the maximum speed of a
102 laboratory centrifuge in 2 ml tube (17000 g, 40 min, 4°C), and the supernatant discarded.

103

104 DNA was extracted from 200 mg of the pooled samples of digestive contents, and concerning
105 mucus samples, the whole pools were used when less than 200 mg was recovered after the
106 centrifugations. DNA extractions were performed by using the QIAamp DNA Stool Mini Kit
107 (Qiagen Inc., Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's recommendations with
108 some modifications. An additional lysis step with lysosyme was performed to improve DNA
109 extraction, especially of gram positive bacteria (Johansen et al. 2007). Briefly, after the step
110 of incubation of samples with ASL buffer during 5 minutes at 95°C, and before the use of
111 InhibitEX tablets, 140µl of a 10 mg/mL of lysozyme (L-7651, Sigma-Aldrich, Saint Quentin
112 Fallavier, France) in Tris-EDTA pH 8 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) was added to each
113 extraction tube. Samples with lysozyme were incubated at 37°C during 30 min. At the end of
114 the procedure, DNA was stabilised by adding 2 µl of Ribonuclease-A (R-4642, Sigma-
115 Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and 40 µl of 40 mg/ml bovine serum albumin (B-
116 4287, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) (protocol of I. Badiola, CReSA, Spain;
117 European project Poultryflorgut 2005-2008). Samples were maintained at - 20°C until further
118 processing.

119

120 **Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE) analyses**

121 The fingerprint technique (TTGE) used in this study was done according to (Gérard et al.
122 2004) with some modifications. The primers used in this study were those described by
123 (Nübel et al. 1996) and were designed to amplify the variable V6-V8 region of the 16S rRNA
124 gene of Eubacteria (synthesized by Eurofins Genomics France, Courtaboeuf, France). They
125 were previously used to investigate chicken microbiota richness (van der Wielen et al. 2002;
126 Zhu et al. 2002). The forward primer, contained a GC clamp (5' CGC CCG GGG CGC GCC
127 CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G 3') and had the following sequence (5' AAC
128 GCG AAG AAC CTT AC 3'). The reverse primer had the following sequence (5' CGG TGT
129 GTA CAA GAC CC 3'). Polymerase chain reaction (PCR) was performed by adding 1µl of
130 template DNA to 49µl of a PCR mixture containing 19µl of nuclease-free water, 1µl of
131 forward primer (20µM), 1µl of reverse primer (20µM), 3µl of MgCl₂ (25 mM) and 25µl of
132 master mix (HotStarTaq Master Mix Kit, Qiagen, Courtaboeuf, France). The amplification

133 reaction was conducted by using a Amplitron ® II (Barnstead|Thermolyne Corporation,
134 Dubuque, USA). Conditions of amplification were 1 cycle of 95°C for 15 min, 30 cycles of
135 97°C for 1 min, 58°C for 1 min and 72°C for 1.5 min, and one cycle of 72°C for 15 min. PCR
136 products concentration and size (433 bp) were checked visually by 1% agarose gel
137 electrophoresis containing ethidium bromide. The TTGE was performed using a Bio-Rad
138 DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Marnes-la-coquette, France). Gels for
139 TTGE were made using 8% acrylamide:bisacrylamide (37,5:1), urea 7M, TAE Buffer 1,25X.
140 Electrophoresis was performed for 16-17h at 60 V. The temperature of the gel system was
141 programmed to increase by 0.2°C per hour from a starting temperature of 66°C until the final
142 temperature of 70°C was reached. For better resolution, voltage was fixed at 20 V for 20
143 minutes at the beginning of the electrophoresis. Gels were stained using SYBR Green. They
144 were visualized and photographed using the GEL DOC XR system (Bio-Rad Marnes-la-
145 coquette, France). For each site of sampling a gel was done containing the four pools of each
146 age, in order to analyze the temporal dynamics of microbiota on each sampling site. TTGE
147 gel analysis was conducted using the TIFF files of gel pictures. The TIFF files of gel images
148 were normalized with Fingerprint II software (Bio-Rad, Marnes-la-coquette, France) using the
149 8 migration markers (Suau et al. 1999; Johansen et al. 2006). After normalization, intensity
150 curves were analyzed with StatFingerprint software, version 1.3 running on R version 2.9
151 (Michelland et al. 2009). Area under profiles was normalized taking the minimum y-value of
152 the curve and subtracting this value from all values within the curve so that the new area
153 under curve is equal to one.

154

155 **Statistical analyses**

156 Similarities coefficients for banding patterns between pairs of pooled samples, structure of
157 microbiota, and richness of the samples were analysed. Analysis was conducted using the
158 TIFF files of gel pictures. The TTGE profiles were aligned with Fingerprinting II software
159 (Bio-Rad, Marnes-la coquette, France) using the migration markers. Further analyses were
160 done with StatFingerprint software, Version 1.3 running on R version 2.9 (Michelland, et al.,
161 2009). Richness was measured as a band number. The inter-pool similarity of each age and
162 location together with the differences between TTGE profiles of the birds euthanized at
163 different ages or sampled at different locations were measured. For this, differences between
164 pairs of pooled samples within each group were assessed by Dice's coefficient of similarity.
165 To assess if the banding patterns were different between groups a proximity matrix of

166 similarity was constructed by using Dice's coefficients. Statistical analysis of similarity
167 (ANOSIM) between band patterns was done using 10,000 Monte Carlo permutations. The
168 ANOSIM-R value indicated the extent to which the groups differed. Groups were considered
169 significantly different for $p < 0.05$ and $R > 0.25$ ($R > 0.75$, well-separated groups; $0.50 < R <$
170 0.75 , separated but overlapping groups; $0.25 < R < 0.50$, separated but strongly overlapping
171 groups). These proximity values were also graphically explored by non-metric
172 multidimensional scaling (nMDS) using 10,000 random starts. The extent to which the plot
173 matched the proximity between banding patterns was assessed by the Kruskal's stress. These
174 analyses were done with StatFingerprint.

175

176 **RESULTS**

177 **Inter-pool variability according to the age of chicken**

178 The TTGE profiles of luminal and mucosal microbiota of crop, ileum and ceca from 20-bird
179 pools samples collected at d8, d22 and d43 are shown in Figure 1. The similarity of the
180 profiles among the four replicates within each age group was represented by Pearson
181 correlation coefficient. The average percentages correlations within each age group are
182 presented in Table 1.

183 In the analysis of luminal samples, the correlation coefficient varied between 43% and 96%
184 depending on age and organ. Differences between profiles were related to specific bands in
185 one or several pools and to variation in bands intensity between pools (Figure 1). No age
186 related differences were observed in crop. For ileal and cecal samples, similarity was
187 significantly more important at d22 and d43 than at d8.

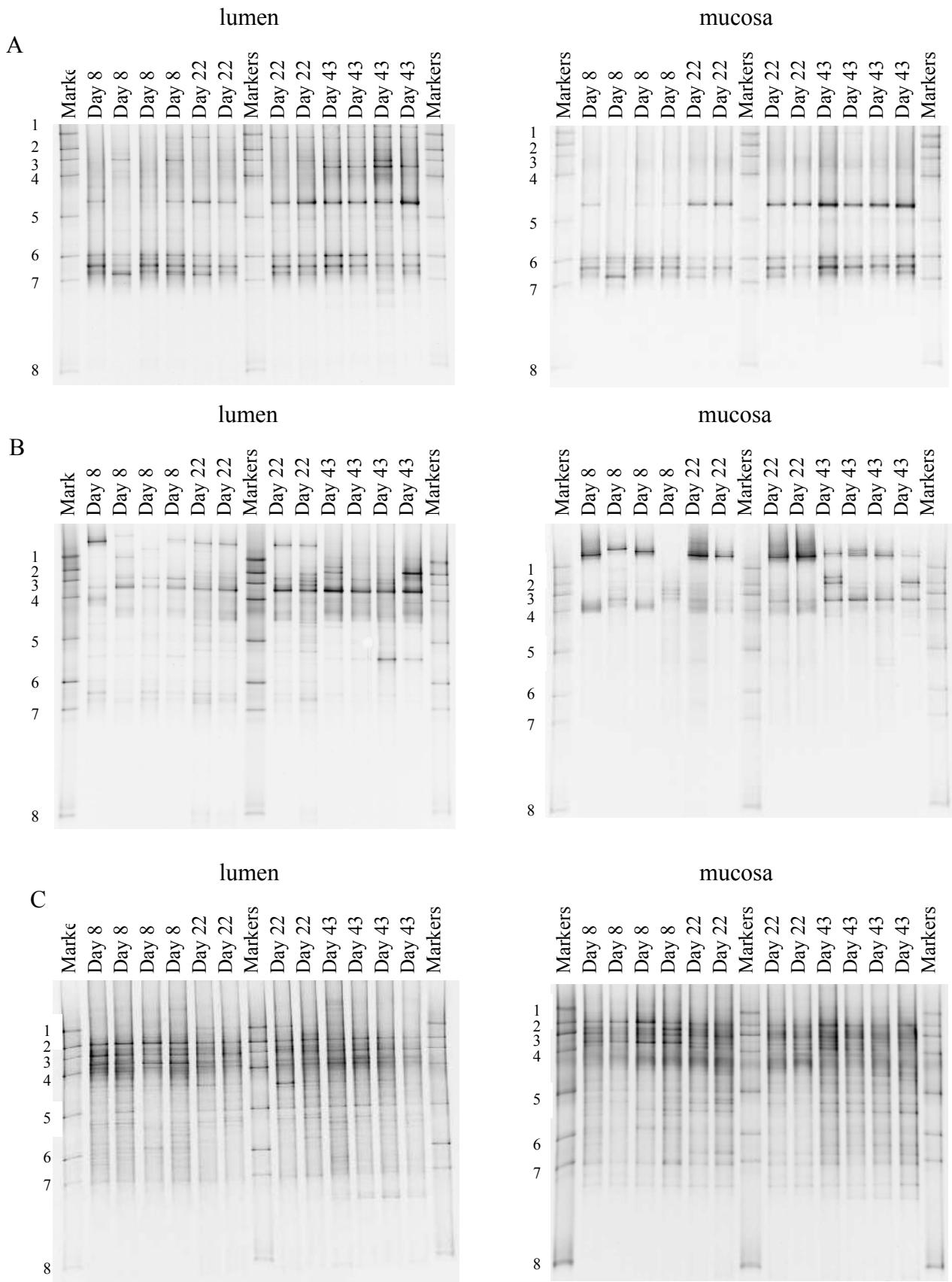
188 For mucosa-associated samples, the correlation coefficient varied between 39% and 97%
189 depending on age and organ (Table 1). In crop, similarity was significantly higher at d43 than
190 at d8. In ileum, similarity was significantly higher at d22 and d43 than at d8. However, there
191 were no significant differences between age groups in ceca.

192

193 **Richness and dynamics of bacterial microbiota according to space and time**

194 Richness of bacterial microbiota collected at d8, d22 and d43 was represented as a number of
195 bands (Table 2). An interaction was observed between age factor and Organ factor. Richness
196 was significantly higher in ceca than in crop or ileum whatever the age. Richness was
197 significantly higher in ceca of 43d old chickens than in ceca of 8d old chickens. Whatever the
198 organ or the age of birds, richness was higher in lumen than in mucosa.

199 The structure of digestive microbiota differed between the organs (ANOSIM $P < 0.0001$,
200 $R = 0.62$; Table 3, Figure 2), the maximal differences being between crop and caeca (ANOSIM
201 $P < 0.0001$, $R = 0.82$; Table 3). In each organ, digestive microbiota differed greatly according to
202 site of sampling (ANOSIM $P < 0.0001$, $R = 0.60$ in crop and ileum and $R = 0.63$ in caeca; Table
203 3). For a given site of sampling in an organ, an age related dynamic was also observed. In
204 mucosa of crop the microbiota changed significantly after d8 (ANOSIM $P < 0.05$, $R = 0.68$;
205 Table 3), the same was observed for lumen and mucosa of ceca (ANOSIM lumen, d8 Vs d22
206 $P < 0.05$, $R = 0.72$, d8 Vs d43 $P < 0.05$, $R = 0.62$; ANOSIM mucosa $P < 0.05$, $R = 0.65$; Table 3).
207 In lumen of ileum, the microbiota changed between d8 and d22 (ANOSIM $P < 0.05$, $R = 0.56$;
208 Table 6) and then, between d22 and d43 (ANOSIM $P < 0.05$, $R = 0.81$; Table 3).
209



210 **Figure 1** : temporal temperature gel electrophoresis profiles of 20-bird pool samples collected on lumen of crop
 211 Profiles of lumen and mucosa of A. crop, B. ileum and C. ceca. Marker : profiles of migration markers (1 to 8)

212 **Table 1:** Temporal changes of inter-pool variability assessed by Pearson correlation coefficient among 4
 213 replicate temporal temperature gel electrophoresis profiles of 20-bird pool samples.
 214

Site	Organ	Age			SEM ¹	P-Value
		8-9d	22-23d	42-43d		
Digestive content	Crop	84.1	92.3	75.9	4.43	NS ²
	Ileum	45.2 ^b	89.9 ^a	78.8 ^a	10.13	0.02
	Ceca	87.9 ^b	93.7 ^a	96.2 ^a	1.36	<0.01
Mucosa-associated	Crop	82.9 ^b	93.8 ^{ab}	97.4 ^a	3.85	<0.05
	Ileum	38.9 ^b	92.5 ^a	71.9 ^a	8.49	<0.01
	Ceca	95.5	96.8	95.7	0.50	NS

215

216 ^{a-b}Means in line with differing letters are different in Student-Newman-Keuls (P<0.05)

217 ¹SEM: Standard error of the mean

218 ²NS, Non significant at P<0.05

219 The similarity coefficients in the same line are means of all the within-age pairwise comparison of the same gel.

220 **Table 2:** Bacterial richness (mean number of bands per samples) of chicken broiler microbiota analysed by temporal
 221 temperature gel electrophoresis
 222

Source of variation		Item	P-value
		Site (L)	<0.0001
		Age (A)	<0.05
		Organ (O)	<0.0001
		L x A	NS ²
		L x O	NS
		A x O	<0.05
		L x A x O	NS
Band number mean			Number
Organ n=8	Crop	d8	14.5 ^c
		d22	16.75 ^c
		d43	15.25 ^c
	Ileum	d8	15.25 ^c
		d22	17.75 ^c
		d43	13.5 ^c
	Ceca	d8	26.5 ^b
		d22	29.5 ^{ab}
		d43	34.5 ^a
SEM ¹		2.00	
Site n=36	Lumen	23.7 ^y	
	Mucosa	17.5 ^z	
	SEM ¹	1.41	

223
 224 ^{a-c, y-z}Means in column with differing letters are different in Student-Newman-Keuls for P<0.05

225 ¹SEM, Standard error of the mean

226 ²NS, Non significant at P<0.05

227

228

229 **Table 3:** Effect of organ, site of sampling and age on the structure of the microbiota of chicken, using ANOSIM on
 230 a Dice distance matrix

Factor	Level of the factor	TTGE profile group ¹	P-value	R-value
Organ				
	Global	All profiles	<0.0001	0.62
	Crop vs Ileum	All profiles	<0.0001	0.53
	Ileum vs Caeca	All profiles	<0.0001	0.50
	Crop vs Caeca	All profiles	<0.0001	0.82
Site				
	Lumen vs Mucosa	All profiles	<0.01	NS ³
	Lumen vs Mucosa	crop	<0.0001	0.60
	Lumen vs Mucosa	ileum	<0.0001	0.60
	Lumen vs Mucosa	caeca	<0.0001	0.63
Age				
	Global	All profiles	NS ²	NS ³
	Global	Crop/lumen	NS ²	NS ³
	d8 vs d22	Crop/lumen	NS ²	NS ³
	d22 vs d43	Crop/lumen	NS ²	NS ³
	d8 vs d43	Crop/lumen	0.06	0.40
	Global	Crop/mucosa	<0.01	0.47
	d8 vs d22	Crop/mucosa	<0.05	0.68
	d22 vs d43	Crop/mucosa	NS ²	NS ³
	d8 vs d43	Crop/mucosa	<0.05	0.68
	Global	Ileum/lumen	<0.001	0.69
	d8 vs d22	Ileum/lumen	<0.05	0.56
	d22 vs d43	Ileum/lumen	<0.05	0.81
	d8 vs d43	Ileum/lumen	<0.05	0.67
	Global	Ileum/mucosa	NS ²	NS ³
	d8 vs d22	Ileum/mucosa	NS ²	NS ³
	d22 vs d43	Ileum/mucosa	NS ²	NS ³
	d8 vs d43	Ileum/mucosa	NS ²	NS ³
	Global	Caeca/lumen	<0.001	0.55
	d8 vs d22	Caeca/lumen	<0.05	0.72
	d22 vs d43	Caeca/lumen	NS ²	0.50
	d8 vs d43	Caeca/lumen	<0.05	0.62
	Global	Caeca/mucosa	<0.001	0.54
	d8 vs d22	Caeca/mucosa	<0.05	0.65
	d22 vs d43	Caeca/mucosa	NS ²	0.43
	d8 vs d43	Caeca/mucosa	<0.05	0.65

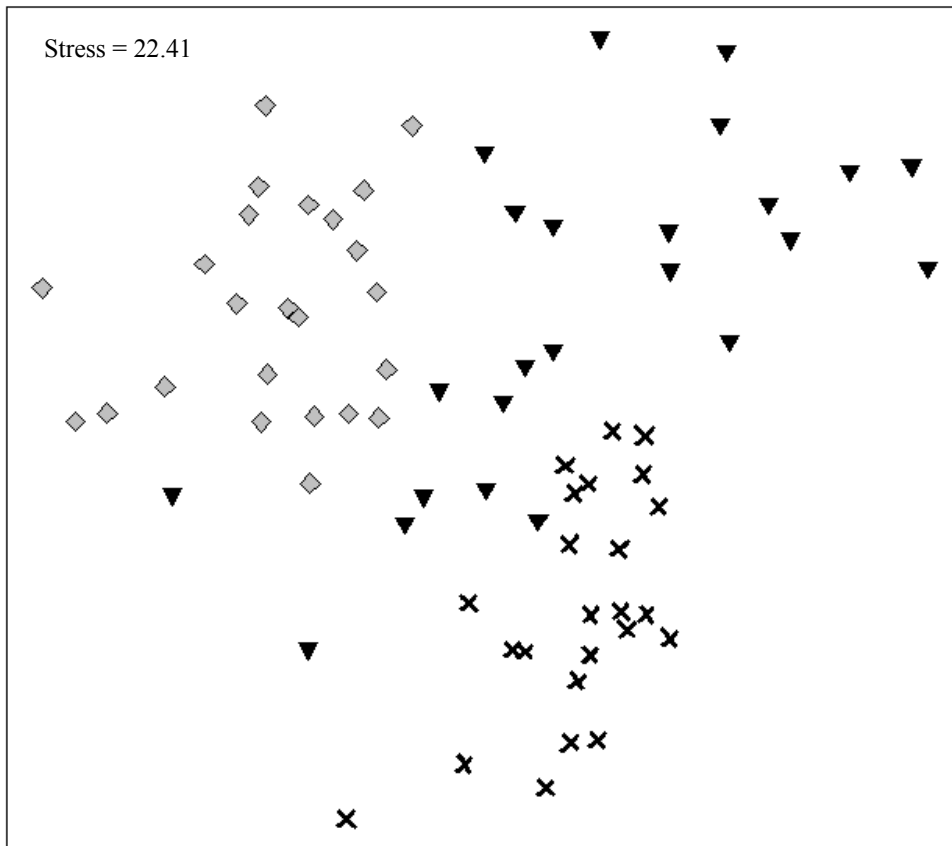
231 ¹The number of observation for a given organ, site of sampling and age was 4

232 ²NS, Non significant at P<0.05

233 ³NS, R<0.25

234

235



236

237 **Figure 2** : Two-dimensional nMDS of the TTGE profiles from the crop (×), ileum (▼) and cecum (◆).

238

239

240

241 **DISCUSSION**

242 **Microbial community changes along the chicken life**

243 Similarity and richness of digestive microbiota increased along chicken life, depending on the
244 organ, as previously observed in pig (Thompson et al. 2008). The high variability in microbiota
245 of one week old broilers could be related to a high influence of genetic on microbiota of young
246 animals as suggested by the higher similarity of microbiota of homozygotic twins children
247 compared to those of heterozygotic twins or unrelated human children (Stewart et al. 2005). The
248 randomness of the process of acquiring microbes from the environment during the early life of
249 animals could also explain those results as suggested by Curtis and Sloan 2004. The inter-
250 individual variability of the resorption level of the yolk sac observed at one week could also play
251 a role in this variability (Jamroz et al. 2004). When the resorbtion has started, a part of the yolk
252 sac content enters the small intestine and change the composition of the digesta (Noy et al.
253 1996). As the digesta are used as substrate by bacteria, the resorption level may affect the
254 composition of the digestive microbiota. In contrast, after two weeks the resorption of yolk sac is
255 completed on the majority of chickens (Jamroz et al. 2004) and the composition of digesta
256 becomes strongly related to feed composition. As chickens grow older, the environmental
257 bacteria could play a higher role than genetics as suggested by the higher similarity in five week
258 old pigs reared in the same environment than in related pigs reared in different environment
259 (Thompson et al. 2008). As all the chickens were co-housed and have access to the same feed
260 and water, it can have contributed to increase inter-pool similarity of microbiota of older
261 chickens.

262 Limited complexity on microbiota of young chickens was previously shown by several
263 researchers. Indeed, an increase of richness was shown by comparison of number of bands, by
264 Hume et al., (2003) in ceca between d2 (8 bands) and d32 (26 bands), and by van der Wielen et
265 al., (2002) in ileum and ceca between d1 and d11. This last study suggests that the low number
266 of bands in young chickens may be due the detection limit of the study, unable to detect bacterial
267 species when bacterial counts are very low. The number of bacteria is very low at hatch and
268 increases during the first days of chicken life (Apajalahti et al., 2004), thus bacteria undetected in
269 very young chickens would be detected in older ones. However, our results showed an increase
270 of the number of bands after d8 whereas the maximal increase of bacterial count is before d3
271 (Apajalahti et al., 2004), suggesting that this observation was unrelated to the detection limit of

272 the method. Moreover, Lu et al., (2003) showed similar increase in microbial complexity of ceca
273 by a different method: a comparison of 16s rRNA libraries between d3 and d49. Thus, the
274 richness increase has probably a biological significance.

275

276 **Microbial community changes along the digestive tract**

277 An increase of richness along the digestive tract was observed depending on chicken age. This
278 higher richness in the distal part of the digestive tract was previously showed by cultural-
279 independent methods (Gong et al., 2002b; van der Wielen et al., 2002; Gong et al., 2007).

280 Crop, ileum and ceca have different function resulting in change in environmental condition. A
281 wide range of bacteria from food, water, litter, dust and environment can enter the crop when
282 chicken eat or drink, and interact with bacteria previously present in the crop and in its mucus. In
283 the crop, bacteria encounter nutrient originating from chicken feed (rich in starch but containing
284 also proteins, lipids and other carbohydrates), from host (e.g. saliva, dead cells, mucus) and from
285 bacteria (e.g. dead cells, metabolites). In this upper part of the digestive tract, partial oxygen
286 pressure is high (He et al. 1999). The pH ranges between 4.5 and 6.5 (Farner 1942; Herpol
287 1966). Before reaching ileum, bacteria have to survive the low pH of proventriculus and gizzard
288 (1.8 to 4.5) (Farner 1942; Herpol 1966). In duodenum and jejunum, the bile and the digestive
289 enzymes can also deplete some bacterial species. In ileum nutrient provided by food are present
290 as undigested macromolecules (e.g. cellulose, lignin...) and low molecular weight component
291 (e.g. peptides, glucose, galactose, fatty acids...). Bacteria can also use endogen substrates (e.g.
292 bile, mucus, death cells...) or bacterial productions. In ileum pH ranges between 6.2 to 7.2
293 (Farner 1942; Herpol 1966) and oxygen pressure is lower than at the entrance of the digestive
294 tract. Caeca are to blind-ended sac at the junction between ileum and colon. Only fluids can enter
295 from cloaca and colon by retrograde contractions (Clench and Mathias 1995). In this
296 compartment, bacterial substrates are mostly undigested feed, uric acid, mucus and bacterial
297 metabolites. The pH ranges from 5.6 to 6.9 (Farner 1942; Herpol 1966) and oxygen pressure is
298 very low. Since the digestive segments provide different environment for bacterial growth, it is
299 expected that distinct microbiota would develop as indicated by the differences in microbiota
300 structure revealed by TTGE profiles and other studies (Bjerrum, et al., 2006; Gong, et al., 2002).
301 It is worthy to notice that microbial structure and richness change not only along the digestive
302 tract, but also inside each organ. As lumen and mucus are characterized by particular

303 environmental conditions, those differences were expected. Due to the blood vessels in the
304 tissue, the oxygen pressure is higher in mucus than in digestive content (Marteyn et al. 2010).
305 The pH in the mucus layer is less acidic than pH of digestive contents (Allen and Flemström
306 2005).

307 An increase in microbial complexity was observed between mucosa and lumen. The lower
308 richness in mucosa may be due to bacterial capacity to attach to epithelial cells. Indeed, it is
309 commonly accepted since the seventies that several species are able to attach epithelial cells or
310 mucus but not all (Fuller and Brooker, 1974; Velez et al., 2007). Mucosa-associated bacteria
311 having to be able to attach epithelial cells or mucus, we can hypothesize that the mucosa-
312 associated microbiota can't be as complex as the luminal one.

313

314 Inter-individual variability seems higher in young animals than in older ones. Therefore, when
315 designing experimental protocol, animal age must be considered for sampling. The present study
316 underlines that microbiota is specific to each organ and chicken age and that microbiota of the
317 digestive contents can't be assimilated at microbiota of the mucus. Other studies are needed to
318 characterize those specificities in terms of bacterial loads and compositions.

319 **REFERENCES**

320

321 Allen, A. and Flemström, G. (2005) Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection
322 against acid and pepsin. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, 1-19.

323 Apajalahti, J., Kettunen, A., Graham, H., (2004). Characteristics of the gastrointestinal microbial
324 communities, with special reference to the chicken. *World's Poultry Science Journal* 60, 223-
325 232.

326 Bjerrum, L., Engberg, R.M., Leser, T.D., Jensen, B.B., Finster, K., Pedersen, K., 2006. Microbial
327 Community Composition of the Ileum and Cecum of Broiler Chickens as Revealed by
328 Molecular and Culture-Based Techniques. *Poult. Sci.* 85, 1151-1164.

329 Clench, M.H. and Mathias, J.R. (1995) The avian caecum: a review. *Wilson Bull* 107, 93-121.

330 Curtis, T.P. and Sloan, W.T. (2004) Prokaryotic diversity and its limits: microbial community
331 structure in nature and implications for microbial ecology. *Curr Opin Microbiol* 7, 221-226.

332 European Commission (2010) Directive 2010/63/UE du parlement européen et du conseil du 22
333 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.
334 pp.L276/233-279. Official Journal of European Union.

335 Farner, D.S. (1942) The hydrogen ion concentration in avian digestive tracts. *Poult Sci* 21, 445-
336 450.

337 Fuller, R., Brooker, B.E., (1974). Lactobacilli which attach to the crop epithelium of the fowl.
338 *The american journal of microbiology* 27, 1305-1312.

339 Gabriel, I., Lessire, M., Mallet, S. and Guillot, J.F. (2006) Microflora of the digestive tract:
340 critical factors and consequences for poultry. *Worlds Poult Sci J* 62, 499-511.

341 Gérard, P., Béguet, F., Lepercq, P., Rigottier-Gois, L., Rochet, V., Andrieux, C., Juste, C.,
342 (2004). Gnotobiotic rats harboring human intestinal microbiota as a model for studying
343 cholesterol-to-coprostanol conversion. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47, 337-343.

344 Gong, J., Forster, R.J., Yu, H., Chambers, J.R., Sabour, P.M., Wheatcroft, R. and Chen, S.
345 (2002a) Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and
346 comparison with bacteria in the cecal lumen. *FEMS Microbiol Lett* 208, 1-7.

347 Gong, J., Forster, R.J., Yu, H., Chambers, J.R., Wheatcroft, R., Sabour, P.M., Chen, S., (2002b).
348 Molecular analysis of bacterial populations in the ileum of broiler chickens and comparison
349 with bacteria in the cecum. *FEMS Microbiol. Ecol.* 41, 171-179.

- 350 Gong, J., Si, W., Forster, R.J., Huang, R., Yu, H., Yin, Y., Yang, C. and Han, Y. (2007) 16S
351 rRNA gene based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the
352 chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. *FEMS Microbiol Ecol* 59, 147-157.
- 353 He, G.L., Shankar, R.A., Chzhan, M., Samouilov, A., Kuppusamy, P. and Zweier, J.L. (1999)
354 Noninvasive measurement of anatomic structure and intraluminal oxygenation in the
355 gastrointestinal tract of living mice with spatial and spectral EPR imaging. *Proc Natl Acad Sci*
356 *U S A* 96, 4586-4591.
- 357 Herpol, C. (1966) Influence de l'âge sur le pH dans le tube digestif de *Gallus domesticus*. *Ann*
358 *Biol Anim Biochim Biophys* 6, 495.
- 359 Hume, M.E., Kubena, L.F., Edrington, T.S., Donskey, C.J., Moore, R.W., Ricke, S.C., Nisbet,
360 D.J., (2003). Poultry Digestive Microbiota Biorichness as Indicated by Denaturing Gradient
361 Gel Electrophoresis. *Poult. Sci.* 82, 1100-1107.
- 362 Jamroz, D., Wertelecki, T., Wiliczekiewicz, A., Orda, J., Skorupinska, J., (2004). Dynamics of
363 yolk sac resorption and post-hatching development of the gastrointestinal tract in chickens,
364 ducks and geese. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 88, 23-250.
- 365 Johansen, C.H., Bjerrum, L. and Pedersen, K. (2007) Impact of salinomycin on the intestinal
366 microflora of broiler chickens. *Acta Vet Scand* 49, 30 (Journal Open access).
- 367 Lu, J., Idris, U., Harmon, B., Hofacre, C., Maurer, J.J. and Lee, M.D. (2003) Diversity and
368 Succession of the Intestinal Bacterial Community of the Maturing Broiler Chicken. *Appl*
369 *Environ Microbiol* 69, 6816-6824.
- 370 Marteyn, B., West, N.P., Browning, D.F., Cole, J.A., Shaw, J.G., Palm, F., Mounier, J., Prevost,
371 M.C., Sansonetti, P. and Tang, C.M. (2010) Modulation of *Shigella* virulence in response to
372 available oxygen in vivo. *Nature* 465, 355-U113.
- 373 Michelland, R.J., Dejean, S., Combes, S., Fortun-Lamothe, L. and Cauquil, L. (2009)
374 StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of
375 microbial fingerprint profiles. *Molecular Ecology Resources* 9, 1359-1363.
- 376 Noy, Y., Uni, Z., Sklan, D., (1996). Routes of yolk utilisation in the newly-hatched chick. *Br.*
377 *Poult. Sci.* 37, 987-995.
- 378 Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W. and
379 Backhaus, H. (1996) Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus*
380 *polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol* 178, 5636-5643.

381 Smith, H.W. (1965a) The development of the flora of the alimentary tract in young animals. J
382 Pathol Bacteriol 90, 495-513.

383 Smith, H.W. (1965b) Observation of the flora of the alimentary tract of animals and factors
384 affecting its composition. J Pathol Bacteriol 89, 95-122.

385 Stewart, J.A., Chadwick, V.S., Murray, A., (2005). Investigations into the influence of host
386 genetics on the predominant eubacteria in the faecal microbiota of children. J. Med.
387 Microbiol. 54, 1239-1242.

388 Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.J., Gibson, G.R., Collins, M.D., Doré, J., (1999).
389 Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel
390 molecular species within the human gut. Appl. Environ. Microbiol. 65, 4799-4807.

391 Thompson, K., Burkholder, K., Patterson, J., Applegate, T.J., (2008). Microbial Ecology Shifts
392 in the Ileum of Broilers During Feed Withdrawal and Dietary Manipulations. Poult. Sci. 87,
393 1624-1632.

394 van der Wielen, P.W.J.J., Keuzenkamp, D.A., Lipman, L.J.A., van Knapen, F., Biesterveld, S.,
395 (2002). Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially
396 raised broiler chickens during growth. Microb. Ecol. 44, 286-293.

397 Vélez, M.P., De Keersmaecker, S.C.J., Vanderleyden, J., (2007). Adherence factors of
398 *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. FEMS Microbiol. Lett. 276, 140-148.

399 Zhu, X.Y., Zhong, T.Y., Pandya, Y. and Joerger, R.D. (2002) 16S rRNA-based analysis of
400 microbiota from the cecum of broiler chickens. Appl Environ Microbiol 68, 124-137.

401

II Impact des conditions d'élevage des poulets sur le microbiote digestif : cas de la densité d'élevage (expérimentation 3)

2.1. Présentation de l'étude

Dans le but d'étudier l'effet des phytobiotiques sur les performances de croissances et le microbiote digestif de poulets placés à différentes densités d'élevage, il est apparu nécessaire d'étudier préalablement l'effet propre de la densité d'élevage sur ces paramètres.

Une augmentation de la densité d'élevage est rapportée dégrader les performances de croissance des volailles (Estevez, 2007), en revanche les répercussions sur leur microbiote digestif ne sont pas connues. Les quelques travaux publiés sur le sujet, focalisés sur l'impact de la densité d'élevage sur le microbiote de l'intestin grêle n'ont montré aucun effet (Harrow, et al., 2007; Jorge, et al., 1988; Putskam, et al., 2005). Or, d'autres modifications de conditions d'élevage, telles que l'accès à un parcours extérieur, ont une influence sur le microbiote digestif du poulet, notamment dans les caeca (Gong, et al., 2008). Ces résultats suggèrent que la densité d'élevage puisse avoir un effet similaire sur le microbiote digestif. L'objectif de cette expérimentation était donc d'étudier en parallèle l'effet de la densité d'élevage sur les performances de croissance et le microbiote digestif du poulet le long du tractus digestif.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans *Poultry Science* présentée ci-dessous. Cet article est suivi d'analyses complémentaires effectuées sur le microbiote digestif.

2.2. Effets de la densité d'élevage sur les performances de croissance et le microbiote digestif du poulet de chair

1 **Effects of Stocking Density on Growth Performance and Digestive Microbiota of Broiler**
2 **Chickens**

3

4 Poultry Science, 2011, **90**(9): 1878-1889

5 S. Guardia^{*}, B. Konsak^{*}, S. Combes^{†‡§}, F. Levenez[#], L. Cauquil^{†‡§}, J. -F. Guillot^{||}, C. Moreau-
6 Vauzelle^F, M. Lessire^{*}, H. Juin^F, I. Gabriel^{*1}

7

8 ^{*}INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France

9 [†]INRA, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326
10 Castanet-Tolosan, France

11 [‡]Université de Toulouse, INPT ENSAT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion
12 Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

13 [§]ENVT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31076
14 Toulouse, France

15 [#]INRA, UMR1319 Micalis, F-78352 Jouy En Josas, France

16 ^{||}I.U.T. DE TOURS, Laboratoire de microbiologie, 29 rue du Pont-Volant, F-37082 Tours,
17 France

18 ^FINRA, UE1206 Elevage alternatif et santé des monogastriques, Le Magneraud, F-17700 Saint-
19 Pierre-d'Amilly, France

20 ¹Corresponding author: irene.gabriel@tours.inra.fr

21 Telephone number: 33-(0)2-47-42-76-47, Fax number: 33-(0)2-47-42-77-78

22 Scientific section: Environment, Well-Being, and Behaviour

23

24 ABSTRACT:

25 Increased stocking densities are frequently reported to depress chicken growth performance but
26 the mechanisms behind this are not fully understood. This study was conducted to investigate the
27 effects of stocking density on growth performance and digestive microbiota, known to be
28 sensitive to environmental factors. Chickens were reared at 2 stocking densities, 12 or 17
29 birds/m². Growth performance was recorded between d1 and d39 and litter was scored for its
30 quality at d25, d31 and d37. Digestive microbiota was analyzed along the digestive tract (crop,
31 ileum, ceca) of 3 and 6 wk old chickens using 2 molecular approaches: a qualitative method,
32 fingerprinting by temporal temperature gradient gel electrophoresis, and a quantitative method,
33 real time PCR. An increase in stocking density was found to negatively affect the feed
34 conversion ratio (+ 3.1%), and depress the daily weight gain of broilers (- 5.5%) during the d32
35 to d39 period ($p \leq 0.05$). Litter quality was reduced in high stocking density as soon as d25. At 3
36 wk of age, stocking density strongly affected the fingerprint profiles of the bacterial community,
37 with the highest modifications observed in crop and ceca (R ANOSIM = 0.77 and 0.69
38 respectively, $p \leq 0.05$). At 6 wk of age significant differences in the fingerprint profiles between
39 the stocking densities appeared in crop and ceca (R ANOSIM = 0.52 and 0.27 respectively,
40 $p \leq 0.05$). The abundance of bacterial groups targeted by real-time PCR was affected by stocking
41 density but only to a limited extent. As digestive microbiota may have consequences on the
42 digestive tract physiology, its modification by an increase of stocking density may be involved in
43 reduced growth performance of the bird.

44 **Key words:** Broiler, Stocking density, Growth performance, Digestive Microbiota

45

46

47 INTRODUCTION

48 To improve farming profitability, producers have increased the stocking density.
49 However due to concerns with animal welfare, stocking density maximum allowances are now
50 enforced in numerous countries. In Europe, the maximum allowed stocking density is 33 kg/m²
51 (European Commission, 2007). However, a higher stocking density (up to 42 kg/m²) may be
52 authorized if the producer addresses additional criteria such as NH₃ and CO₂ concentration
53 within the shed, temperature, humidity, and mortality rate. In addition to stocking density, the use
54 of feed additives such as antibiotic growth promoters has raised concerns with consumers. Due
55 to both consumer concerns and environmental concerns relating to antibiotic resistance,
56 antibiotic growth promoters were either reduced or phased out. Therefore as of 2006, European
57 poultry produces no longer use antibiotic growth promoters, and as a result the digestive
58 microbiota of the birds is not controlled and sensitive to environmental factors (Burkholder, et
59 al., 2008; Gong, et al., 2008) and it may affect animal growth and digestive health (Gabriel, et
60 al., 2006).

61 The impact of stocking density on broiler growth performance has been studied
62 extensively and in particular its impact on broiler welfare has largely been investigated over the
63 last 10 years (reviewed by Bessei, 2006 and Estevez, 2007). In these studies, stocking density
64 had a negative impact on broilers performance and on broiler welfare. However, the
65 consequences of stocking density on digestive microbiota are not fully understood. Previous
66 studies have demonstrated that an increase of stocking density can increase the prevalence or
67 abundance of digestive pathogens (Shane, 2000; Dahiya, et al., 2006). However, to our
68 knowledge, studies investigating the impact of stocking density on chicken commensal
69 microbiota is limited and only focused on specific bacterial groups and concern only the small
70 intestine of chicken (Jorge, et al. 1988; Putskam, et al., 2005 and Harrow, et al., 2007).
71 Therefore, in the present study, the impact of stocking density on broiler chicken growth
72 performance and commensal digestive microbiota was investigated. As important populations of
73 non cultivable bacteria are present in the digestive contents of poultry (Gabriel, et al., 2006; Wise
74 et Siragusa, 2007; Gong et al., 2008), 2 molecular methods independent of culture were used to
75 examine the microbiota in the crop, small intestine and ceca.

76
77

78 MATERIALS AND METHODS:

79 ***Animals, Housing and Diet***

80 A total of 672 male, White Ross PM3 broilers, vaccinated against infectious bronchitis were
81 obtained from a commercial hatchery (Boye, St Hilaire de Loulay, France), and raised on wood
82 shavings (6 kg/m²) in a temperature and ventilation controlled Louisianan-type barn containing
83 pens. Pens were 2.75 m² of useful area and separated by wood panels (40 cm high), designed to
84 avoid inter floor pen litter projections and extended by wire up to 1.2 m. The programmed
85 ambient temperature was 32°C from d1 to d3, 30° from d4 to d6, 28°C from d7 to d13, 27°C
86 from d14 to d20, 24°C from d21 to d27, 22°C from d28 to d39 and 20°C from d40 until the end
87 of experiment. Birds were exposed to the following lighting schedule: d1-d5, 23hr; d6 to d11,
88 20hr and d12 to d42, 18hr. The lighting intensity ranged between 30 to 50 lux from d1 to d3 and
89 gradually decreased and by the end of the experiment reached 5 to 10 lux. Chickens were feed *ad*
90 *libitum* with a 4 phased diet mainly composed of wheat, soybean meal and maize (Table 1). The
91 measured CP content level for the starter, grower, finisher and withdrawal diets were 22.7%,
92 21.6%, 20.7% and 19.8% respectively. During the starter, grower and finisher periods a
93 coccidiostat (diclazuryl) with limited effects on intestinal microbiota (FDA, 1996) was added
94 (200 ppm) and no antibiotic growth promoters nor enzymes were included. The diets were
95 presented as 2.5 mm pellets. Chickens had free access to water on a 4 cup bell drinker system.
96 The experiment was performed in an experimental poultry facility at the experimental unit
97 (INRA, Le Magneraud, France), toward the end of winter 2008, and conducted according to the
98 French specific guidelines related to experimental animals (European Commission, 2010).

99

100 ***Experimental Design***

101 One-day-old chickens of similar mean body weight (44.5 ± 0.01 g) were randomly
102 distributed between 16 pens (2.75 m² of useful area). Six replicate pens per treatment were used
103 for growth performance measurements and 2 replicate pens per treatment were used for
104 microbiota analyses. Birds were placed at 2 stocking densities (low and high) as per European
105 Council Directive 2007/43/EC (European Commission, 2007). The low stocking density
106 consisted of 12 birds/m² equivalent to 33 birds per pen (i.e. 31 kg/m² predicted at d39; Aviagen,
107 2009) whereas the high stocking density, consisted of 17 birds/m² equivalent to 47 birds per pen
108 (i.e. 43 kg/m² predicted at d39; Aviagen, 2009). In order to balance early mortality, 2 additional

109 birds were added to each floor pen. At d10, the lightest and heaviest chickens were removed to
110 reach 33 or 47 birds per pen for low and high stocking densities respectively. The feeding space
111 allowance was 3.8 cm/bird in low stocking density and 2.7 cm/bird in high stocking density. The
112 watering density was 8 and 12 birds per cup in low and high stocking densities respectively.
113 Broilers were wing banded at d5.

114

115 ***Growth Performance and Litter Quality Measurement***

116 The mortality was recorded daily. At d1, birds from the same pen were weighed together,
117 and thereafter weighed individually at d10, d24, d32 and d39 with no fasting period. Feed intake
118 was recorded by pen and daily weight gain (**DWG**) was calculated for each period. For this,
119 females and dead birds were taken out of the calculation but they were included in the feed
120 conversion ratio (**FCR**) calculation. Litter quality was assessed in each pen at d25, d31 and d37,
121 and scored visually on a scale of 1-5 (1 = friable, no capping or compaction whatsoever, 2 = light
122 capping, under a friable crumb surface, 3 = surface capped and compacted, 4 = surface wet and
123 sticky and 5 = litter depth wet and dough-like). The litter score percentage (to the nearest 5% for
124 each score category) was determined by 2 independent people and thereafter calculated as
125 follows: $[(1 \times \%) + (2 \times \%) + (3 \times \%) + (4 \times \%) + (5 \times \%)]/100$

126

127 ***Sampling for Microbiota Analysis***

128 For microbiota analysis, 20 birds from each density level at both 3 wk (d22-d23) and 6
129 wk (d42-d43) of age were selected. Selection based on the body weight of the birds and birds
130 with weights closest to the average from each were selected on d21 and d42, identified by color
131 marking and kept in their pen until killing. Birds (n = 5) were subsequently killed on d22, d23,
132 d42 and d43. In order to homogenize the filling level of the chickens' digestive tract, prior to
133 sampling, birds were exposed to a 3hr feeding period followed by a fasting period. Due to
134 experimental constraints, the fasting period ranged from a minimum of 3hr to a maximum of 9hr,
135 and birds with different fasting periods were randomly distributed within the 2 experimental
136 groups. Selected birds were euthanized by CO₂ asphyxiation. The crop, distal half of ileum and
137 ceca were immediately collected and kept on ice. The crop was opened longitudinally and the
138 digestive content was collected with a sterile spoon. Digestive contents of the ileum and ceca
139 were collected by gentle pressure along the organ. Samples consisting of 5 birds were pooled and

140 stored at -80°C until further processing. After sampling at 3 wk, the floor pen area was decreased
141 in order to maintain the stocking density constant.

142

143 *Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE) Analysis*

144 DNA was extracted from 200 mg of the pooled samples with the QIAamp DNA Stool
145 Mini Kit (Qiagen Inc., Courtaboeuf, France) as per the manufacturer's recommendations with
146 some modifications. An additional lysis step with lysozyme was performed to improve the DNA
147 extraction of the gram positive bacteria present within the samples (Johansen, et al., 2007).
148 Extracted DNA was stabilized by adding 2 µl of Ribonuclease-A and 40 µl of 40 mg/ml bovine
149 serum albumin (Gabriel, 2008) and stored at -20°C until further processing. The fingerprint
150 technique (TTGE) used in this study was described by Seksik, et al. (2003) with minor
151 modifications. The primers used for the TTGE analysis were those described by Zoetendal, et al.,
152 (1998) and amplify the variable V6-V8 region of the 16SrRNA gene of Eubacteria (Eurofins
153 Genomics France, Courtaboeuf, France). The forward primer, U9968-GC-F, contained a GC
154 clamp (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGG GGGG-3') and had the
155 following sequence (5'-ACGCGAAGAACCTTAC-3'). The reverse primer, L1401R, had the
156 following sequence (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3'). DNA template (1 µl) was added to
157 49 µl of PCR mixture (19 µl of nuclease-free water, 1 µl of forward primer (20 µmol/L), 1 µl of
158 reverse primer (20 µmol/L), 3 µl of MgCl₂ (25 mM) and 25 µl of master mix (HotStarTaq Master
159 Mix Kit, Qiagen, Courtaboeuf, France)). The amplification reaction was conducted using
160 Amplitron II (Barnstead Thermolyne Corporation, Dubuque, USA) as described by Seksik, et al.
161 (2003). PCR products (433 bp) were visualized and analyzed by electrophoresis on 1% agarose
162 gels containing ethidium bromide. PCR products were separated by TTGE using the DCode
163 Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Marnes-la-coquette, France) as described by
164 Seksik, et al., (2003). A TTGE ladder consisting of a PCR amplicon mix (8 cloned rDNA from
165 different bacterial species), obtained from J. Dore and J. P. Furet, (MICALIS, INRA, Jouy en
166 Josas, France) was used to normalize the profiles. Gels were stained using SYBR green,
167 visualized and photographed using the GEL DOC XR system (Bio-Rad Marnes-la-coquette,
168 France).

169

170

171 ***Real-time PCR Analysis***

172 DNA for real-time PCR was extracted from 200 mg of the pooled samples as per Furet et
173 al. (2009). This extraction method is a combination of the protocol from the G'NOME kit (BIO
174 101, La Jolla, CA) (BIO 101) and the methods described by Suau et al. (1999). All bacteria, together
175 with the 5 major groups (*Escherichia coli*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium leptum* and
176 *Clostridium coccooides* groups) were quantified by targeting the 16S rDNA. Primer and probe
177 sequences used in this study are listed in Table 2. Reactions were run in triplicate in 384 well
178 plates in a final volume of 10 µl. The EpMotion 5070 liquid handling robot (Eppendorf, Le Pecq,
179 France) was utilized to distribute the master mix and DNA to the 384 well plates. The all bacteria
180 reaction consisted of 5 µl of TaqMan Universal PCR 2 × Master Mix (Applied Biosystems,
181 Courtaboeuf, France), 0.2 µl of both 10 µM primers (Eurogentec, Angers, France) and MGB
182 probe (Applied Biosystems), 1.9 µl of nuclease free water and 2.5 µl of template DNA at the
183 appropriate dilution. Amplification was carried out with a Light Cycler 480 (Roche, Meylan,
184 France) as follows: 10 min at 95°C, followed by 45 cycles of denaturation (10 s at 95°C),
185 annealing (30 s at 60°C) and extension (30 s at 72°C). Reactions for the 5 bacterial groups,
186 consisted of 5 µl of Light Cycler 480 SYBR Green I Master Mix (Roche, Meylan, France),
187 0.5 µl of 10 µM primers (Eurogentec), 1.5 µl of nuclease free water and 2.5 µl of template DNA
188 at the appropriate dilution. The cycling conditions were as follows: 10 min at 95°C, then 35
189 cycles of denaturation (10 s at 95°C), annealing (20 s at 60°C) and extension (30 s at 72°C).
190 Following amplification, melting curve analysis was included in order to assess the specificity of
191 the amplified product. The standard curve for all bacteria and *E. coli* was done with *E. coli*
192 genomic DNA (K12-1 strain, CIRM-BP 371) that was purchased from the International Center
193 of Microbial Resources (CIRM, INRA, France). The standard curve for *Lactobacillus* done with
194 genomic DNA from *L. plantarum* type strain CIRM-BIA 466 (purchased from CIRM, INRA).
195 DNA from pure cultures of *Bacteroides fragilis* (strain ATCC 23745 provided by I.U.T of Tours,
196 France), and *Clostridium coccooides* (strain DSM 935, purchased from the German Resource
197 Centre for Biological Material, Braunschweig, Germany) was harvested from the bacterial pellet
198 and obtained by centrifugation of 1 ml of culture and extracted as per Furet et al. (2009). The
199 standard curve for *Clostridium leptum* was generated from a PCR product. The PCR reaction
200 contained PCR buffer (75 mM Tris HCl (pH 9.0), 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM
201 (NH₄)₂SO₄; 200 µM dNTP mix, 0.2 µM of each primer, 2.5 units of UptiTherm DNA

202 polymerase (Uptima-Interchim, Montlucon, France) and 2 μ l of template DNA (DNA extracted
203 from cecal contents as per Furet et al (2009)) in a total volume of 50 μ l. With the following
204 cycling conditions: 95°C for 10 min; 35 cycles of: denaturation (95°C for 30 s); annealing (60°C
205 for 30 s) and extension (72°C for 30 s) followed by a final extension for 10 min at 72°C. The
206 amplified product (8 μ l) was verified by gel electrophoresis (1.5%). The PCR product was
207 purified via the Rapid PCR Purification System (Marligen BioSciences, Ljamsville, MD),
208 concentration measured at 260 nm (Nanodrop ND-1000, Labtech France) and subsequently
209 sequenced. The copy numbers for *E. coli*, *L. plantarum*, *B. fragilis* and *C. leptum* were
210 calculated, whereas for *C. coccoides* the copy number was determined by using the all Bacteria
211 real-time PCR assay. The standard curves were generated from 10-fold serial dilutions in water
212 of known concentrations of DNA and used to quantify the copy number of the respective PCR
213 reaction with cycle threshold determined by the second derivative maximum method (Tichopad
214 et al. 2003). Results are presented as number of 16S rDNA copies. Incidence was recorded as the
215 number of samples in which a targeted group was detectable. In order to compare the various
216 sample types in which incidence was not 100% the undetected samples were considered to be at
217 the theoretical limit of detection (1 gene copy in the plate well) (Wise and Siragusa, 2007).
218 Numbers of gene copies were expressed per gram of fresh sample and \log_{10} transformed for
219 statistical analysis.

220

221 ***Calculations and Statistical Analyses***

222 Statistical analysis on growth performance, TTGE analysis (for richness and inter-pool
223 similarity analyses) and real-time PCR results were performed using a T-test ($p \leq 0.05$) in
224 Statview software Version 5 (Abacus Concepts, Berkeley, CA). Non significant differences but
225 with a P-value between 0.05 and 0.10 were specified as trends. When values are given in the text
226 they are expressed as mean \pm SE.

227 TTGE gel analysis was conducted using the TIFF files of gel pictures. The TTGE profiles
228 were aligned with Fingerprinting II software (Bio-Rad, Marnes-la coquette, France) using the
229 migration markers. For further analysis, to assess presence or absence of bands, the intensity
230 value of the fingerprint profiles were transformed into binary values with StatFingerprint
231 software, Version 1.3 running on R version 2.9 (Michelland, et al., 2009). Richness was
232 measured as the number of bands by profile. The inter-pool similarity of each stocking densities

233 group together with the differences between TTGE profiles of the birds reared at low and high
234 stocking densities were measured. For this, differences between pairs of pooled samples within
235 each stocking density group were assessed by Dice's coefficient of similarity. To assess if the
236 banding patterns were different between stocking densities a proximity matrix of similarity was
237 constructed by using Dice's coefficients. Statistical analysis of similarity (ANOSIM) between
238 band patterns was done using 10,000 Monte Carlo permutations. The ANOSIM-R value
239 indicated the extent to which the groups differed. Groups were considered significantly different
240 for $p < 0.05$ and $R > 0.25$ ($R > 0.75$, well-separated groups; $0.50 < R < 0.75$, separated but
241 overlapping groups; $0.25 < R < 0.50$, separated but strongly overlapping groups). These
242 proximity values were also graphically explored by non-metric multidimensional scaling
243 (nMDS) using 10,000 random starts. The extent to which the plot matched the proximity
244 between banding patterns was assessed by the Kruskal's stress. These analyses were done with
245 StatFingerprint.
246

247 **Table 1.** Composition and nutrient content of control diets (g/kg)

248

Item	Diets			
	Starter (d1-10)	Grower (d10-22)	Finisher (d22-32)	Withdrawal (d32-42)
Ingredients				
Wheat	370.0	400.0	450.0	500.0
Soybean meal	326.1	284.4	263.3	214.0
Maize	162.0	151.4	194.6	181.5
Pea	60.0	80.0		
Maize gluten meal			8.0	24.0
Soybean oil	46.2	50.0	50.0	50.0
Dicalcium phosphate	16.6	16.0	14.7	12.2
Calcium carbonate	10.3	9.7	10.4	11.0
Sodium chloride	3.0	3.0	3.0	3.0
Mineral-Vitamin mixture ¹	4.0	4.0	4.0	4.0
Lysine-HCL			0.6	
DL-Methionine	1.6	1.3	1.2	0.3
Anticoccidial (diclazuryl) ²	0.2	0.2	0.2	
Calculated nutrient analysis				
ME ³ (kcal/kg)	2,938	2,986	3,033	3,105
Crude protein	215	202	190	180
Crude fiber	34.4	33.4	30.1	27.9
Fat	65.4	68.5	69.8	69.4
Lysine	11.6	10.7	9.8	8.2
Methionine + cysteine	8.4	7.7	7.5	6.5
Tryptophan	2.6	2.4	2.3	2.1
Threonine	8.0	7.5	6.9	6.5
Calcium	10.0	9.5	9.3	8.7
Available phosphorus	4.2	4.1	3.9	3.5

249

250 ¹ Supplied per kilogram of diet: Co, 0.4 mg; Cu, 16 mg; Fe, 40 mg; I, 1.6 mg; Mn, 64 mg; Se, 0.2
 251 mg; Zn, 72 mg; retinyl acetate, 12000 IU; cholecalciferol, 3440 IU; DL-alpha tocopheryl acetate, 80
 252 mg; thiamine mononitrate , 4 mg; riboflavin, 6.4 mg; calcium pantothenate, 20 mg;

253 cyanocobalamin, 0.02 mg; menadione, 4 mg; pyridoxine hydrochloride, 5.6 mg; folic acid, 2.4 mg;

254 biotin, 0.24 mg; niacin, 80 mg; choline chloride , 440 mg; antioxidant (butylhydroxyanisole,
 255 propyl gallat, ethoxyquin) 40 mg

256 ² Clinacox. Jansen Pharmaceutica, Beerse, Belgium

257 ³ME, metabolizable energy

258

259 RESULTS:

260 ***Growth Performance***

261 During the whole experiment, the mortality was not significantly different between
262 stocking densities ($3.85 \pm 1.10\%$; $p = 0.37$). The actual stocking density at d39 was 29 kg/m² for
263 low stocking density and 40 kg/m² for high stocking density and close to the expected values
264 from Aviagen (2009). High stocking density increased daily feed intake from d1 to d10 (+ 4.4%),
265 and thereafter no difference was observed. During the total rearing period, the stocking density
266 had no impact on the feed intake. The FCR was not affected by stocking density from d1 to d24.
267 During the d24 to d32 period, although non significant, FCR was found to be negatively affected
268 by the increase of stocking density (+ 2.2%, $p = 0.07$). Whereas during the d32 to d39 period and
269 the total rearing period, FCR was significantly negatively affected by the increased stocking
270 density (+ 3.1% and + 1.5%, respectively). The DWG increased in high compared to low
271 stocking density during the d1 to d10 period (+ 3.8%); it was found to be not affected during the
272 d10 to d24 period or the d24 to d32 period. On the contrary, from d32 to d39, the high stocking
273 density had a negative effect on DWG compared to the low stocking density (-5.5%). The DWG
274 over the total rearing period was not affected by the high stocking density (Table 3). The final
275 body weight was not affected by the stocking density ($2384 \pm 25.9\text{g}$ and $2351 \pm 19.2\text{g}$ in low and
276 high stocking densities respectively, $p = 0.30$). The effect of stocking density on bird growth on
277 the selected birds used for the microbiota analysis was comparable to the whole flock.

278

279 ***Litter Quality***

280 The increase in stocking density had a highly significant negative impact on the global
281 quality of litter assessed at d25, d31 and d37 as showed by the higher litter score ($p < 0.01$, Table
282 4). However, the d37 litter quality was still sufficient at both stocking densities (litter quality
283 score < 4.14) and therefore additional litter was not needed as no abnormal locomotive behavior
284 was observed.

285

286 ***TTGE Analyses***

287 The richness of the dominant microbiota, estimated as the number of bands in each TTGE
288 profile, was unaffected in 3 wk old broilers. The mean number of bands per profile was

289 19.5 ± 1.35 (p = 0.15), 15.8 ± 4.46 (p = 0.30) and 28.3 ± 2.31 (p = 0.37) in crop, ileum and ceca
290 respectively. In 6 wk old broilers, crop richness decreased as stocking density increased
291 (19.5 ± 1.26 vs. 25.0 ± 1.91 bands in high and low stocking densities respectively). The mean
292 number of bands per profile was unaffected in the ileum (13.3 ± 1.00 bands, p = 0.23) and ceca
293 (28.3 ± 1.83 bands, p = 0.38).

294 Stocking density had no significant effect on inter-pool similarity whatever the age or
295 sample location. The Dice coefficient of similarity in 3 wk old broilers was 40.6 ± 2.81%
296 (p = 0.25), 48.6 ± 4.16% (p = 0.21) and 47.8 ± 2.42% (p = 0.17) for crop, ileum and ceca
297 respectively. In 6 wk old broilers, the Dice coefficient of similarity for the ileum tended to be
298 higher in high than in low stocking density (46.5 ± 6.43% and 31.1 ± 4.88% respectively,
299 p = 0.09). No differences were observed in the other sampling regions. The Dice coefficient of
300 similarity for crop and ceca was 39.3 ± 3.10% (p = 0.47) and 52.7 ± 2.87% (p = 0.15)
301 respectively (data not shown).

302 The modified banding patterns of the microbiota were assessed by ANOSIM, with a Dice
303 matrix and showed that stocking density had an impact on the dominant digestive microbiota of
304 the chicken. The TTGE profiles of digestive contents in 3 wk old birds were differed according
305 to stocking density, regardless of the location of sampling. The differences were higher in crop
306 and ceca than in ileum as shown by the higher R-value. At 6 wk of age, the TTGE profiles of the
307 chickens' digestive contents differed according to stocking density in crop and ceca but no
308 difference was observed in the ileum (Figure 1, Table 5).

309

310 ***Real-time PCR Analyses***

311 The results of microbiota quantification in the digestive contents of 3 wk old broilers are
312 presented in Table 6. In the crop, the stocking density had no effect on the total bacterial load or
313 on the abundance of the 5 targeted groups. The total bacterial load was 5.5×10^{11} copies of 16S
314 rDNA/g of fresh sample and the dominant targeted group was *Lactobacillus* (1.6×10^{11} copies of
315 16S rDNA/g of fresh sample). In the ileum, neither the total bacterial load which accounted for
316 5.3×10^{10} copies of 16S rDNA/g of fresh sample nor the major bacterial groups were affected by
317 stocking density. The dominant targeted group was the *Lactobacillus* group (5.8×10^{10} copies of
318 16S rDNA/g of fresh sample). In the ceca, the total bacterial load was affected by stocking
319 density. It reached 7.4×10^{12} copies of 16S rDNA/g of fresh sample at low stocking density and

320 4.6×10^{12} copies at high stocking density, thus a decrease of 38%. The dominant group was the
321 *C. coccoides* group, but a high proportion of the *Lactobacillus* and *C. leptum* groups were also
322 detected. The *E. coli* copy of 16S rDNA/g of fresh sample was lower at high stocking density
323 than at low stocking density (1.9×10^{10} vs 4.5×10^{10} , thus a decrease of 76%). Similarly the
324 same tendency was observed for the *Bacteroides* group (1.5×10^{10} vs. 2.4×10^{10} copies of 16S
325 rDNA/g of fresh sample, $p = 0.07$), thus representing a decrease of 37%.

326 The results of bacterial quantification of 6 wk old broilers are presented in Table 7. In the
327 crop, the stocking density had no impact on quantification of total bacteria, 7.8×10^{11} copies of
328 16S rDNA/g of fresh sample. The dominant *Lactobacillus* group reached 2.5×10^{11} copies of
329 16S rDNA/g of fresh sample. In the ileum, stocking density had no effect on the quantification of
330 total bacteria. The total bacterial load reached 1.8×10^{11} copies of 16S rDNA/g of fresh sample.
331 The dominant targeted group was the *Lactobacillus* group (1.6×10^{11} copies of 16SrDNA/g of
332 fresh sample). The *Bacteroides* group was only detected in 2 samples at low stocking density. In
333 the ceca, the stocking density had no impact on the abundance of the targeted groups. The total
334 bacterial load was 4.0×10^{12} copies of 16S rDNA/g of fresh sample and the dominant targeted
335 group was the *C.coccoides* group (4.5×10^{11} copies of 16S rDNA/g of fresh sample) with the
336 *Lactobacillus* and the *C.coccoides* groups reaching high proportions.

337

338 **Table 2.** Primers and probe used in real-time PCR quantification of chicken digestive microbiota

Target organisms	Sequence (5'-3')	Reference
<i>All Bacteria</i>	F : CGGTGAATACGTTCCCGG R : TACGGCTACCTTGTTACGACTT P : 6FAM-CTTGTACACACCGCCCGTC	Suzuki et al. (2000) modified by Furet et al. (2009)
<i>Lactobacillus</i> group (including <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Aerococcus</i> , and <i>Weissella</i>)	F: AGCAGTAGGGAATCTTCCA R: CACCGCTACACATGGAG	F: Walter et al. (2001) R: Heilig et al. (2002)
<i>E.coli</i> species	F: CATGCCGCGTGTATGAAGAA R: CGGGTAACGTCAATGAGCAA	Huijsdens et al. (2002)
<i>Bacteroides Prevotella</i> group	F: GAAGGTCCCCCACATTG R: CAATCGGAGTTCTTCGTG	Bartosch et al. (2004)
<i>Clostridium</i> cluster IV (<i>Clostridium leptum</i> subgroup including <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>)	F: GCACAAGCAGTGGAGT R: CTCCTCCGTTTTGTCAA	Matsuki et al. (2004)
<i>Clostridium</i> cluster XIVa and b (<i>Clostridium</i> <i>coccoides-Eubacterium rectale</i> subgroup)	F: AAATGACGGTACCTGACTAA R: CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA	Matsuki et al. (2002)

340 **Table 3.** Effects of stocking density on growth performance of broiler chickens

	Density	Age				
		d1-d10	d10-24	d24-32	d32-39	d1-d39
Daily feed intake (g/animal/d) ¹	Low ³	22.7 ^b	78.7	142	168	95
	High ⁴	23.7 ^a	79.9	143	165	96
	SEM	0.32	0.86	1.8	2.3	0.8
	P-value	0.04	0.34	0.66	0.35	0.79
Feed Conversion Ratio (g/g) ¹	Low ³	1.098	1.382	1.604	1.923 ^b	1.567 ^b
	High ⁴	1.104	1.391	1.640	1.982 ^a	1.591 ^a
	SEM	0.0118	0.0039	0.0127	0.0166	0.0059
	P-value	0.71	0.12	0.07	0.03	0.02
Daily Weight Gain (g/animal/d) ²	Low ³	20.8 ^b	57.1	89.3	91.2 ^a	61.6
	High ⁴	21.6 ^a	57.6	87.9	86.2 ^b	60.7
	SEM	0.22	0.56	0.96	1.18	0.59
	P-value	0.01	0.50	0.32	< 0.01	0.30

341 ^{a-b} For a given parameter, means in the same column with no common superscript differ
 342 significantly (P < 0.05)

343 ¹ For daily feed intake and feed conversion ratio, n = 6/treatment

344 ² For daily weight gain, at d10, n = 208 at low density and n = 291 at high density

345 ³Low density: 12 birds/m²

346 ⁴High density: 17 birds/m²

347

348 **Table 4.** Effect of stocking density on litter quality

Density	Litter score ¹		
	d 25	d 31	d 37
Low ²	1.6 ^a	2.5 ^a	3.1 ^a
High ³	3.2 ^b	3.4 ^b	3.8 ^b
SEM	0.12	0.14	0.07
P-value	< 0.0001	< 0.001	0.0001

349 ^{a-b}Means in the same column with no common superscript differ significantly (P < 0.05)

350 ¹Score: scale ranged from 1 (friable, no capping or compaction whatsoever) to 5 (litter depth

351 wet and dough-like)

352 ²Low density: 12 birds/m²

353 ³High density: 17 birds/m²

354

355

356 **Table 5.** Effect of stocking density on the band pattern of the chicken digestive microbiota

357 assessed by ANOSIM with a Dice distance matrix

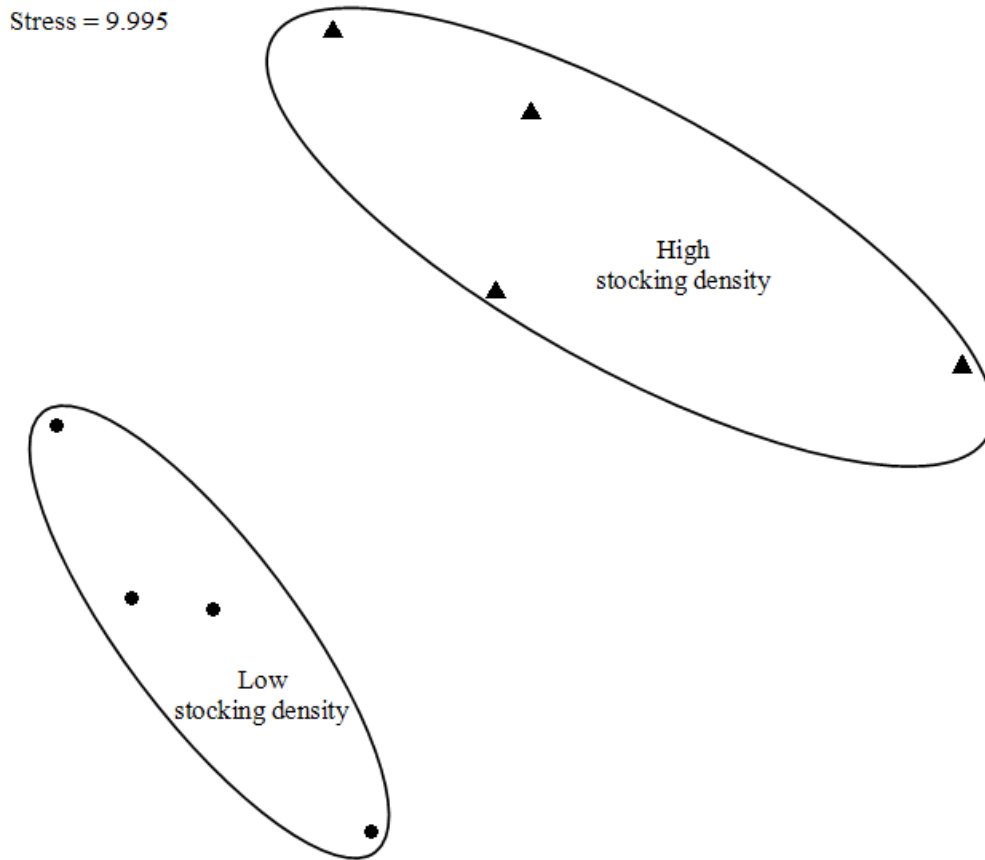
Age	Crop		Terminal Ileum		Ceca	
	P-value	R-value	P-value	R-value	P-value	R-value
3 wk	0.03	0.77	0.03	0.38	0.03	0.69
6 wk	0.03	0.52	0.14	0.23	0.05	0.27

358 For each site of sampling and stocking density n = 4 pools of 5 birds

359

360

361



362

363 **Figure 1.** Two dimensional nMDS plot of the TTGE profiles of low (●) and high (▲)
364 stocking densities of ceca of 3 wk old birds done on the proximity index of Dice (Kruskal's
365 stress obtained for 10,000 iterations)

366

367

PS-10-01311.R1 ; Figure 1

368

369 **Table 6.** Effect of the stocking density on real time PCR quantification of all bacteria and major groups of digestive content of 3 wk old broilers

Organ	Stocking density	All bacteria		<i>E. coli</i> species		<i>Lactobacillus</i> group		<i>Bacteroides</i> group		<i>C. leptum</i> group		<i>C. coccoides</i> group	
		Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence
Crop	Low ³	11.84	4	8.79	4	11.35	4	6.72	3	8.10	4	9.34	4
	High ⁴	11.64	4	9.10	4	11.06	4	7.84	4	8.83	4	9.79	4
	SEM	0.105		0.247		0.138		0.799		0.427		0.376	
	P-value	0.22		0.41		0.18		0.35		0.27		0.43	
Ileum	Low ³	10.80	4	8.89	4	10.91	4	6.14	3	7.60	4	9.42	4
	High ⁴	10.65	4	8.93	4	10.61	4	6.15	3	8.08	4	9.77	4 (3) ²
	SEM	0.354		0.257		0.232		0.807		0.347		0.319	
	P-value	0.78		0.92		0.40		0.99		0.36		0.50	
Ceca	Low ³	12.87 a	4	10.27 a	4	11.02	4	10.37	4	10.93	4	11.88	4
	High ⁴	12.67 b	4	9.65 b	4	11.05	4	10.17	4	10.88	4	11.77	4
	SEM	0.050		0.148		0.135		0.065		0.055		0.077	
	P-value	0.03		0.03		0.88		0.07		0.52		0.37	

370 ^{a-b}For a given site of sampling, means in the same column with no common superscript differ significantly (P < 0.05)

371 For each site of sampling and age n = 4 pools of 5 birds

372 ¹Expressed as Log₁₀ copies number of 16S rDNA/g of fresh digestive content; in the case where incidence was < 4, the mean was calculated
 373 considering that the amount of DNA in the undetected samples was at the theoretical detection limit (i.e. 1 gene copy in the PCR reaction)

374 ²In parenthesis: the number of actual samples used for the calculation due to missing data

375 ³Low density: 12 birds/m²

376 ⁴High density: 17 birds/m²

377

378 **Table 7.** Effect of the stocking density on real time PCR quantification of all bacteria and major groups of digestive content of 6 wk old broilers

Organ	Stocking density	All bacteria		<i>E.coli</i>		<i>Lactobacillus</i> group		<i>Bacteroides</i> group		<i>C.leptum</i> group		<i>C.coccoides</i> group	
		Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence
Crop	Low ³	11.94	4	9.06	4	11.43	4	6.08	3	8.17	4	9.41	4
	High ⁴	11.85	4	8.70	4	11.37	4	5.98	3	7.88	4	9.09	4
	SEM	0.100		0.247		0.108		0.742		0.250		0.212	
	P-value	0.56		0.34		0.71		0.92		0.44		0.33	
Ileum	Low ³	11.24	4	9.34	4	11.15	4	5.18	2	7.03	4	9.09	4 (3) ²
	High ⁴	11.29	4	9.82	4	11.24	4	nd	0	6.44	4	8.49	4 (3) ²
	SEM	0.283		0.269		0.207		na		0.355		0.235	
	P-value	0.90		0.26		0.76		na		0.29		0.15	
Ceca	Low ³	12.55	4	9.89	4	11.01	4	9.77	4 (3) ²	10.70	4	11.58	4
	High ⁴	12.65	4	9.82	4	11.21	4	9.88	4	10.86	4	11.74	4
	SEM	0.123		0.128		0.197		0.162		0.166		0.139	
	P-value	0.56		0.72		0.51		0.66		0.51		0.45	

379 nd: not detected

380 na: not applicable

381 For each site of sampling and age n = 4 pools of 5 birds

382 ¹Expressed as Log₁₀ copies number of 16S rDNA/g of fresh digestive content; in the case where incidence was < 100%, the mean was calculated
 383 considering that the amount of DNA in the undetected samples was at the theoretical detection limit (i.e. 1 gene copy in the PCR reaction)

384 ²In parenthesis: the number of actual samples used for the calculation due to missing data

385 ³Low density: 12 birds/m²; ⁴High density: 17 birds/m²

386 DISCUSSION:

387 Increased stocking density has been reported to depress chickens growth performance
388 (reviewed by Bessei, 2006 and Estevez, 2007). In the present study, we measured for the first
389 time that commensal digestive microbiota was also affected by stocking density.

390

391 **The impact of stocking density on young broilers (1 to 3 wks old)**

392 In this study, higher stocking density increased feed intake during the d1 to d10 period
393 and had no effect during the d10 to d24 period. Our results are similar to those of Pesti and
394 Howarth (1983), but different to the results of Dozier, et al., (2006); Ravindran, et al., (2006)
395 and Onbasilar, et al., (2008), in that no effect of stocking density was reported (Dozier, et al.,
396 2006; Ravindran, et al., 2006) and a decrease in feed intake observed (Dozier, et al., 2006;
397 Onbasilar, et al., 2008). Literature on young birds is scarce as the majority of studies deal with
398 the whole rearing period or the last period of rearing. In the present study, the increase in feed
399 intake observed during the early period of rearing might be explained by the fact that
400 untrained chicks may find it easier to find their way to food and water sources in denser
401 flocks than in low stocking density flocks. In the present study, FCR did not change during
402 the d1 to d24 period. Similar findings were also observed by Moreira et al. (2004) and
403 Ravindran, et al. (2006). However, other studies undertaken by Dozier, et al., 2006;
404 Onbasilar, et al., 2008 reported an improvement of FCR of young birds as stocking density
405 increased. In the current study, during the d1 to d10 period, feed intake increased and the
406 unmodified FCR observed in the present work led to a higher DWG. During the d10 to d24
407 period, stocking density had no effect on DWG and is due to the absence of an effect on feed
408 intake and FCR. A higher DWG was also reported by Pesti and Howarth (1983) during the
409 first wk of rearing although other studies reported no effect (Ravindran, et al., 2006), a
410 negative effect (Ricard, 1988: Dozier, et al., 2006), or a positive effect in the first 3 wk
411 (Moreira, et al., 2004). These discrepancies between studies concerning the effect of stocking
412 density on growth performance of the chicken during the first 3 wk of life may be explained
413 by the different experimental conditions such as bird strain (Skomorucha, et al., 2009),
414 presence or absence of antibiotics (Ravindran, et al., 2006) or litter type (Al Homidan and
415 Robertson, 2003).

416

417 At 3 wk of age, an impact of stocking density was observed on digestive microbiota
418 from crop to ceca and shown by the strong modification of TTGE profiles and some impact

419 on quantification of the real-time PCR targeted groups with a decrease in all bacteria (-37%)
420 and *E. coli* (-76%) and a decrease in the tendency for *Bacteroides* (-37%) in the ceca. To our
421 knowledge, this is the first time that an effect of stocking density on commensal bacterial
422 microbiota of the digestive tract of young chickens has been observed. The values obtained in
423 our study are relatively higher than those observed in the literature. It can be explained by
424 several factors such as the use of a molecular approach independent to culture based methods,
425 different DNA extraction method and the expression of results in copies of 16S rDNA and not
426 bacterial number. One must take into account that the copy number of rDNA per bacteria
427 varies between 1 and 15 and is species dependent with a value of 7 for *E.coli*, mean value of
428 5.5 for *Lactobacillus*, 6 for *Bacteroides*, and 9 for *Clostridium* (Lee et al, 2009; Rastogi et al,
429 2009). A previous study undertaken by Harrow et al. (2007) investigated the relationship
430 between the stocking densities and the commensal digestive bacteria of young chickens, but
431 observed no effect. However the authors only focused on *Lactobacillus salivarius* in the
432 ileum. In the present study, the use of a non focused method applied to different organs of the
433 digestive tract allowed the detection of a stocking density effect. The results from the present
434 study, are in agreement with previous observations which showed the effects of stocking
435 density on pathogenic bacteria such as *Clostridium perfringens* in the digestive tract
436 (reviewed by Dahiya, et al., 2006). This effect may be due to the increase of litter moisture
437 with higher stocking density (Hermans and Morgan, 2007), as confirmed in the current study
438 by the damaged litter quality score, observed from d25. A similar observation and an
439 increased humidity between the second and the forth wk of the rearing period have previously
440 been showed (McLean, et al., 2002; Jayalakshmi, et al., 2009). This is most likely due to a
441 higher quantity of excreta in the litter produced by the higher number of birds (40% higher in
442 the present work).

443 The effect of stocking density observed, on digestive microbiota of 3 wk old birds may
444 be due to changes in litter bacterial composition (Jorge, et al., 1988; Jayalakshmi, et al.,
445 2009). Fries, et al., (2005) reported 10^4 bacteria/g of litter present in the litter before the birds
446 arrived which increased thereafter to 10^9 to 10^{10} bacteria/g when birds were present. As litter
447 is eaten by chickens, particularly by the younger birds (up to 6.3% of the daily feed intake)
448 (Malone, et al., 1983), litter can have an impact on digestive microbiota composition (Torok,
449 et al., 2009).

450 Despite the important changes in microbiota in 3 wk old chickens, high stocking
451 density had no impact on growth performance of the birds during the period directly

452 preceding the microbiota sampling. Although digestive microbiota may have an impact on
453 host digestive tract and growth performance (reviewed by Gabriel, et al., 2006), our results
454 are in accordance with the research undertaken by Geier et al. (2009) and show that changes
455 in digestive microbiota are not always related to direct changes in digestive health and
456 functionality and thus in animal performance.

457

458 ***Impact of stocking density on older broilers (3 to 6 wk old)***

459 In the present study, an increase in stocking density was found to have no effect on
460 daily feed intake of the older birds or during the total rearing period and is in agreement with
461 results obtained from Ravindran et al. (2006). Despite this agreement, the results from the
462 present study are somewhat different to what has been reported in different studies and what
463 has been reviewed by Bessei, (2006) and Estevez, (2007), and report a decrease in feed intake
464 for high stocking density. In the present study, although non significant, the higher stocking
465 density was found to have a negative effect on FCR during d24 to d32 period, but found to be
466 significant for the d32 to d39 period and for the overall period. Bessei, (2006) and Estevez,
467 (2007) also reported a negative effect of increased stocking density on FCR, however this
468 effect was not observed in all reported studies. These discrepancies between studies can be
469 explained by several environmental factors that differ between studies.

470 In the present study, stocking density did not affect feed intake but had negative
471 effects on FCR which subsequently resulted in a negative effect on DGW during the last
472 rearing phase (d32-39) in agreement with the reviews of Bessei, (2006) and Estevez, (2007).
473 However no effect was observed during the total rearing period.

474 In the current work, the increase of stocking density induced changes in digestive
475 microbiota in the crop and ceca of 6 wk broilers as observed by TTGE band pattern analysis,
476 and tended to increase the similarity of ileal microbiota between chickens. Among the limited
477 studies dealing with an effect of stocking density on digestive microbiota in old broilers, none
478 showed an effect, probably due to the fact that these studies focused on a few bacterial
479 groups, or on a specific bacteria, and were performed only in the small intestine (Jorge, et al.,
480 1988; Putskam, et al., 2005; Harrow, et al., 2007), which appears to be the only region not
481 modified in our study.

482 The present study showed that the impact of stocking density on digestive microbiota
483 varied according to chicken age, with a lower effect observed at 6 wk compared to 3 wk. In
484 spite of an increased impact of stocking density on litter microbiota when chickens grow older

485 (Jorge, et al., 1988; Hernandez, et al., 2002), and the potential effect of litter microbiota on
486 digestive microbiota, the effect of litter microbiota could decrease with age as wood shaving
487 litter ingestion decreases down to 1.3% from the forth wk of age (Malone, et al.,1983).
488 Moreover, digestive microbiota of older birds may be less sensitive to change than the
489 youngers' one. These results are in accordance with those of Torok, et al. (2009) showing that
490 the effects of litter on digestive microbiota are reduced as broilers aged.

491 Reduced growth performance and the modifications of digestive microbiota by
492 stocking density in old broiler chickens may be explained by either a perturbation of
493 ventilation in the living area of the birds, and or perturbation of behavior due to the crowding.
494 Increased heat has also been proposed as an explanatory factor for the decreased growth
495 performance in high stocking density (reviewed by Bessei, 2006). However, as heat stress is
496 known to decrease feed intake (Gonzalez-Esquerria and Leeson, 2006) it is unlikely that it
497 occurred in present study for high stocking density because feed intake was unchanged.

498 The effect of stocking density on growth performance and digestive microbiota may
499 be due to the limited removal of dust in the living area of chickens at high stocking density
500 (Banhazi, et al. 2008). The increase of stocking density could lead to a rise of dust and
501 airborne bacteria (Sauter et al. 1981) and could affect chicken health and growth performance.
502 That could occur through direct ingestion of feed contaminated with airborne particles or
503 through changes in the immune responses (Lai, et al., 2009; Neish, 2009). Similarly, the
504 increase of atmospheric ammonia in higher stocking density (Al Homidan and Robertson,
505 2003) could affect digestive health and induce subclinical health disorders (reviewed by
506 Kristensen and Wathes, 2000).

507 The effect of stocking density on growth performance and microbiota may also be due
508 to a higher level of stress as observed in several studies (Onbasilar, et al., 2008; Buijs, et al.,
509 2010). This stress may be involved in the decline of growth performance (reviewed by Siegel,
510 1995) and in the observed changes in microbiota (reviewed by Collins, 2009) possibly
511 through the modification of digestive physiology (reviewed by Wood, 2007).

512
513 In conclusion, in our study, stocking density induced a decrease in growth
514 performance and changed the digestive microbiota of the birds. The use of a broad spectrum
515 approach to study microbiota identified modifications in microbiota within the 3 main organs
516 of bacterial colonization. The impact of stocking density on digestive microbiota should thus
517 be taken into account in studies aiming to control the effect of this environmental parameter.

518 However, further work is needed to determine whether stocking density influence microbiota
519 in a reproducible manner, if digestive microbiota can influence gut health and bird
520 performance, and to understand the involved mechanisms. Indeed, the digestive microbiota
521 may have deleterious consequences on chicken health such as dysbiosis or favoring growth of
522 pathogenic bacteria. These modifications in microbiota may contribute to the reduction of
523 growth due to the effect of digestive microbiota on animal physiology (reviewed by Gabriel,
524 et al., 2006). Thus controlling the digestive microbiota may contribute to limiting the negative
525 impacts of stocking density in broiler chickens.

526

527 ACKNOWLEDGMENTS:

528 The authors would like to thank: F. Recoquillay (Phytosynthèse, Riom, France) for technical
529 support for experimental design, the technical staff of the experimental unit, particularly
530 P.Rousseau (INRA, UE1206, Le Magneraud, France) for rearing the birds and for the
531 assistance provided during sample collection; M. Leconte (INRA, Nouzilly, France) for
532 laboratory analyses; P. Limouzin (I.U.T. De Tours, Laboratoire de microbiologie, Tours,
533 France) for assistance with bacterial cultivation; J. Dore and JP Furet for providing the TTGE
534 ladders (MICALIS, INRA, Jouy en Josas, France); M.J. Duclos and A. Brionne (INRA,
535 Nouzilly, France) for helpful advice relating to real-time PCRanalysis and R. Michelland
536 (INRA, Toulouse, France) for helpful advice in gel pattern analysis. This work was supported
537 by French regional grants (Region Centre, France) and by Phytosynthèse (Riom, France).

538

539 REFERENCES:

- 540 Al Homidan, A., and J. F. Robertson. 2003. Effect of litter type and stocking density on
541 ammonia, dust concentrations and broiler performance. *Br. Poult. Sci.* 44:S7-S8.
- 542 Aviagen 2009. Ross PM3 broiler performance objectives.
543 [http://67.20.64.230/ss/assets/Tech_Center/Ross_Broiler/Ross_PM3_Broiler_Performa](http://67.20.64.230/ss/assets/Tech_Center/Ross_Broiler/Ross_PM3_Broiler_Performance_Objectives.pdf)
544 [nce_Objectives.pdf](http://67.20.64.230/ss/assets/Tech_Center/Ross_Broiler/Ross_PM3_Broiler_Performance_Objectives.pdf). Accessed 05/10/2010.
- 545 Banhazi, T. M., J. Seedorf, M. Laffrique, and D. L. Rutley. 2008. Identification of the risk
546 factors for high airborne particle concentrations in broiler buildings using statistical
547 modelling. *Biosyst. Eng.* 101:100-110.
- 548 Bartosch, S., A. Fite, G. T. Macfarlane, and M. E. T. McMurdo. 2004. Characterization of
549 bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly

550 patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal
551 microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3575-3581.

552 Bessei, W. 2006. Welfare of broilers: a review. *Worlds Poult. Sci. J.*62:455-465.

553 Buijs, S., L. J. Keeling, C. Vangestel, J. Baert, J. Vangeyte, and F. A. M. Tuytens. 2010.
554 Resting or hiding? Why broiler chickens stay near walls and how density affects this.
555 *Appl. Anim. Behav. Sci.* 124:97-103.

556 Burkholder, K. M., K. L. Thompson, M. E. Einstein, T. J. Applegate, and J. A. Patterson.
557 2008. Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology,
558 and susceptibility to *Salmonella enteritidis* colonization in broilers. *Poult. Sci.*
559 87:1734-1741.

560 Collins, S. B., P. 2009 The relationship between intestinal microbiota and the central nervous
561 system in normal gastrointestinal function and disease. *Gastroenterology.* 136:2003-
562 2014.

563 Dahiya, J. P., D. C. Wilkie, A. G. Van Kessel, and M. D. Drew. 2006. Potential strategies for
564 controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. *Anim. Feed Sci.*
565 *Technol.* 129:60-88.

566 Dozier, W., J. Thaxton, J. L. Purswell, H. A. Olanrewaju, S. Branton, and W. Roush. 2006.
567 Stocking density effects on male broilers grown to 1.8 kilograms of body weight.
568 *Poult. Sci.* 85:344-351.

569 Estevez, I. 2007. Density Allowances for Broilers: Where to Set the Limits? *Poult. Sci.*
570 86:1265-1272.

571 European Commission. 2007. Council directive 2007/43/EC of 28 June 2007 laying down
572 minimum rules for the protection of chickens kept for meat production. *Official*
573 *Journal of the European Union*, 12 July 2007:L 182/119-128.

574 European Commission. 2010. Directive 2010/63/UE du parlement européen et du conseil du
575 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.
576 Pages L276/233-279, *Official Journal of European Union*.

577 FDA. 1996. Environmental assesment for Clinacox™ Type A Medicated Article for Chicken
578 and Turkey (Diclazuril), NADA number 140-951.

579 Fries, R., M. Akcan, N. Bandick, and A. Kobe. 2005. Microflora of two different types of
580 poultry litter. *Br. Poult. Sci.* 46:668-672.

581 Furet, J. P., O. Firmesse, M. Gourmelon, C. Bridonneau, J. Tap, S. Mondot, J. Dore, and G.
582 Corthier. 2009. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota
583 using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68:351-362.

584 Gabriel, I., Christensen, H., Badiola, I., Francesh, M., Pissavin, C., 2008. Effects of
585 alternative to AGP on the digestive flora using fingerprint methods (RFLP, CE-SSCP
586 and TTGE) European Project, Specific Targeted Research Project. *PoultryFlorGut*
587 2005-2008. Control of the intestinal flora ecology in poultry for ensuring the products
588 safety for human consumers. Deliverable D4.9., Rapport public, 113 p.

589 Gabriel, I., M. Lessire, S. Mallet, and J. F. Guillot. 2006. Microflora of the digestive tract:
590 critical factors and consequences for poultry. *Worlds Poult. Sci. J.* 62:499-511.

591 Geier, M. S., V. A. Torok, G. E. Allison, K. Ophel-Keller, and R. J. Hughes. 2009.
592 Indigestible carbohydrates alter the intestinal microbiota but do not influence the
593 performance of broiler chickens. *J. Appl. Microbiol.* 106:1540-1548.

594 Gong, J., H. Yu, T. Liu, J. J. Gill, J. R. Chambers, R. Wheatcroft, and P. M. Sabour. 2008.
595 Effects of zinc bacitracin, bird age and access to range on bacterial microbiota in the
596 ileum and caeca of broiler chickens. *J. Appl. Microbiol.* 104:1372-1382.

597 Gonzalez-Esquerria, R., and S. Leeson. 2006. Physiological and metabolic responses of
598 broilers to heat stress - implications for protein and amino acid nutrition. *Worlds*
599 *Poult. Sci. J.* 62:282-295.

600 Harrow, S. A., V. Ravindran, R. C. Butler, J. W. Marshall, and G. W. Tannock. 2007. Real-
601 time quantitative PCR measurement of ileal *Lactobacillus salivarius* populations from
602 broiler chickens to determine the influence of farming practices. *Appl. Environ.*
603 *Microbiol.* 73:7123-7127.

604 Heilig, H. G. H. J., E. G. Zoetendal, E. E. Vaughan, P. Marteau, A. D. L. Akkermans, and W.
605 M. de Vos. 2002. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid
606 bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S
607 ribosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:114-123.

608 Hermans, P. G., and K. L. Morgan. 2007. Prevalence and associated risk factors of necrotic
609 enteritis on broiler farms in the United Kingdom; a cross-sectional survey. *Avian*
610 *Pathol.* 36:43 - 51.

611 Hernandez, R., J. O. Cazetta, and V. M. B. de Moraes. 2002. Nitrogenous and glycidic
612 fractions and ammonia released by broiler litter in different stocking densities and
613 periods of breeding. *Braz. J. Anim. Sci.* 31:1795-1802.

- 614 Jayalakshmi, T., R. Kumararaj, T. Sivakumar, T. T. Vanan, and D. Thiagarajan. 2009.
615 Influence of stocking densities on litter moisture, microbial load, air ammonia
616 concentration and broiler performance. *Tamilnadu Journal of Veterinary and Animal
617 Sciences* 5:80-86.
- 618 Johansen, C. H., L. Bjerrum, and K. Pedersen. 2007. Impact of salinomycin on the intestinal
619 microflora of broiler chickens. *Acta Vet. Scand.* 49:30.
- 620 Jorge, M. A., N. C. Baiao, R. L. D. Oliveira, and J. S. D. Resende. 1988. Stocking density
621 effect on escherichia-coli populations in the litter and internal organs of broilers. *Arq.
622 Bras. Med. Vet. Zootec.* 40:53-64.
- 623 Kristensen, H. H., and C. M. Wathes. 2000. Ammonia and poultry welfare : a review. *Worlds
624 Poult. Sci. J.* 56. 235-245.
- 625 Lai, H. T. L., M. G. B. Nieuwland, B. Kemp, A. J. A. Aarnink, and H. K. Parmentier. 2009.
626 Effects of dust and airborne dust components on antibody responses, body weight
627 gain, and heart morphology of broilers. *Poult. Sci.* 88:1838-1849.
- 628 Lee, Z. M.-P., C. M. Bussema, and T. M. Schmidt. 2009. rrnDB: documenting the number of
629 rRNA and tRNA genes in bacteria and archaea. *Nucleic Acids Res.* 37:D489-D493.
- 630 Malone, G. W., G. W. Chaloupka, and W. W. Saylor. 1983. Influence of litter type and size
631 on broiler performance .1. Factors affecting litter consumption. *Poult. Sci.* 62:1741-
632 1746.
- 633 Matsuki, T., K. Watanabe, J. Fujimoto, Y. Miyamoto, T. Takada, K. Matsumoto, H. Oyaizu,
634 and R. Tanaka. 2002. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific
635 primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces.
636 *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5445-5451.
- 637 Matsuki, T., K. Watanabe, J. Fujimoto, T. Takada, and R. Tanaka. 2004. Use of 16S rRNA
638 gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant
639 bacteria in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:7220-7228.
- 640 McLean, J. A., C. J. Savory, and N. H. C. Sparks. 2002. Welfare of male and female broiler
641 chickens in relation to stocking density, as indicated by performance, health and
642 behaviour. *Anim. Welf.* 11:55-73.
- 643 Michelland, R. J., S. Dejean, S. Combes, L. Fortun-Lamothe, and L. Cauquil. 2009.
644 StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of
645 microbial fingerprint profiles. *Mol. Ecol. Resour.* 9:1359-1363.

646 Moreira, J., A. A. Mendes, R. d. O. Roca, E. A. Garcia, I. d. A. Naas, R. G. Garcia, and I. C.
647 L. d. A. Paz. 2004. Effect of stocking density on the performance, carcass yield and
648 meat quality of broilers of different commercial strains. *Rev. Bras. Zootec.* 33:1506-
649 1519.

650 Neish, A. S. 2009. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 136:65-
651 80.

652 Onbasilar, E. E., O. Poyraz, E. Erdem, and H. Ozturk. 2008. Influence of lighting periods and
653 stocking densities on performance, carcass characteristics and some stress parameters
654 in broilers. *Archiv fur Geflügelkunde* 72:193-201.

655 Pesti, G. M., and B. Howarth. 1983. Effects of population density on the growth, organ
656 weights, and plasma corticosterone of young broiler chicks. *Poult. Sci.* 62:1080-1083.

657 Putskam, M., Y. Vizzier-Thaxton, W. Dozier, J. Thaxton, W. Roush, S. Branton, G. Morgan,
658 D. Miles, and B. Lott. 2005. Evaluation of stocking density on intestinal microflora of
659 broilers. *Poult. Sci.* 84:108-108.

660 Rastogi, R., Wu, M., DasGupta, I., Fox, G. E., 2009. Visualization of ribosomal RNA operon
661 copy number distribution. *BMC Microbiol.* 9:208.

662 Ravindran, V., D. V. Thomas, and P. C. H. Morel. 2006. Performance and welfare of broilers
663 as affected by stocking density and zinc bacitracin supplementation. *Anim. Sci. J.*
664 77:110-116.

665 Ricard, F. H. 1988. Influence de la densité d'élevage sur la croissance et les caractéristiques
666 de carcasse de poulets élevés au sol. *Ann. Zoot.* 37:87-98.

667 Sauter, E. A., C. F. Petersen, E. E. Steele, J. F. Parkinson, J. E. Dixon, and R. C. Stroh. 1981.
668 The airborne microflora of poultry houses. *Poult. Sci.* 60:569-574.

669 Seksik, P., L. Rigottier-Gois, G. Gramet, M. Sutren, P. Pochart, P. Marteau, R. Jian, and J.
670 Doré. 2003. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with
671 Crohn's disease of the colon. *Gut* 52:237-242.

672 Shane, S. M. 2000. Campylobacter infection of commercial poultry. *Revue Scientifique Et*
673 *Technique De L'Office International Des Epizooties* 19:376-395.

674 Siegel, H. S. 1995. Stress, Strains and Resistance. *Br. Poult. Sci.* 36:3-22.

675 Skomorucha, I., R. Muchacka, E. Sosnowka-Czajka, and E. Herbut. 2009. Response of broiler
676 chickens from three genetic groups to different stocking densities. *Annals of Animal*
677 *Science* 9:175-184.

678 Smith, C. J. and A. M. Osborn. 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-
679 PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol.* 67:6-20.

680 Suau, A., R. Bonnet, M. Sutren, J. J. Godon, G. R. Gibson, M. D. Collins, and J. Doré. 1999.
681 Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals
682 many novel molecular species within the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.*
683 65:4799-4807.

684 Suzuki, M. T., L. T. Taylor, and E. F. DeLong. 2000. Quantitative analysis of small-subunit
685 rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assay. *Appl. Environ.*
686 *Microbiol.* 66:4605-4614.

687 Tichopad, A., M. Dilger, G. Schwarz, M.W. Pfaffl. 2003. Standardized determination of real-
688 time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res* 31: e122.

689 Torok, V. A., R. J. Hughes, K. Ophel-Keller, M. Ali, and R. MacAlpine. 2009. Influence of
690 different litter materials on cecal microbiota colonization in broiler chickens. *Poult.*
691 *Sci.* 88:2474-2481.

692 Walter, J., C. Hertel, G. W. Tannock, C. M. Lis, K. Munro, and W. P. Hammes. 2001.
693 Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* and *Weissella* species in human
694 feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis
695 *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2578-2585.

696 Wise, M. G., and G. R. Siragusa. 2007. Quantitative analysis of the intestinal bacterial
697 community in one-to three-week-old commercially reared broiler chickens fed
698 conventional or antibiotic-free vegetable-based diets. *J. Appl. Microbiol.* 102:1138-
699 1149.

700 Wood, J. D. 2007. Neuropathophysiology of functional gastrointestinal disorders. *World J.*
701 *Gastroenterol.* 13:1313-1332.

702 Zoetendal, E. G., A. D. L. Akkermans, and W. M. De Vos. 1998. Temperature gradient gel
703 electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and
704 host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3854-3859.

705

2.3. Analyses complémentaires

L'analyse du microbiote effectuée par TTGE dans le cadre de cette expérience a permis d'étudier sa structuration spatiale et la dynamique temporelle en fonction de la densité d'élevage. Ces résultats n'ont pas été présentés dans la publication de façon à pouvoir présenter plus en détail les résultats de l'analyse quantitative par PCR en temps réel.

Les analyses de la structure des profils TTGE présentées dans ce paragraphe ont été faites à partir de comparaison inter-gel des profils TTGE obtenus suite au protocole expérimental décrit dans l'article présenté ci-dessus selon la méthode décrite dans ce même article.

Quelle que soit la densité d'élevage, les profils TTGE diffèrent entre chaque segment digestif étudiés, montrant une structuration spatiale du microbiote digestif du poulet (tableau 19). De plus, lorsque les animaux sont placés à une densité d'élevage de 12 animaux/m² les valeurs de R indiquent des différences entre segments digestifs moins marquées (groupes de profils TTGE séparés mais avec des recouvrements) que à 17 animaux/m², sauf dans le cas des différences entre jabot et caeca qui sont très importantes quelle que soit la densité d'élevage. Une évolution du microbiote digestif est observée entre trois et six semaines d'élevage dans chacun des segments étudiés à 12 comme à 17 animaux/m² (tableau 20).

Ces analyses complémentaires ont permis de montrer qu'une structuration spatiale et une évolution temporelle du microbiote digestif, mis en évidence lors de la première expérimentation décrite dans ce chapitre et dans plusieurs autres travaux (Bjerrum, et al., 2006; Gong, et al., 2008; Gong, et al., 2002; Torok, et al., 2007), se met en place indépendamment de la densité d'élevage du poulet.

Tableau 19 : Effet de la localisation dans le tractus digestif (jabot, iléon, caeca) sur la structure du microbiote digestif du poulet en fonction de la densité d'élevage

Organes comparés	Densité d'élevage			
	12 animaux/m ²		17 animaux/m ²	
	Valeur de P	Valeur de R	Valeur de P	Valeur de R
Tous	<0,0001	0,63	<0,0001	0,74
Jabot vs Iléon	<0,0001	0,56	<0,0001	0,75
Iléon vs Caeca	<0,0001	0,51	<0,0001	0,75
Jabot vs Caeca	<0,0001	0,80	<0,0001	0,75

Pour chaque organe n = 24 pools de 5 poulets

Tableau 20 : Effet de l'âge (3 semaines versus 6 semaines) sur la structure du microbiote digestif du poulet en fonction de la densité d'élevage des animaux

Organes	Densité d'élevage			
	12 animaux/m ²		17 animaux/m ²	
	Valeur de P	Valeur de R	Valeur de P	Valeur de R
Jabot	<0,03	0,51	<0,03	0,98
Iléon	<0,03	0,97	<0,03	0,67
Caeca	<0,03	0,94	<0,03	0,59

Pour chaque âge et organe, n = 4 pools de 5 poulets

Résumé

Dans ce premier chapitre nous avons présenté les études mises en place pour approfondir nos connaissances sur le microbiote digestif du poulet de chair. Il ressort de ces études que ce microbiote évolue au cours de la vie de l'animal que ce soit en termes de structure ou de variabilité inter-individuelle. Les différences observées entre jeunes animaux étant beaucoup plus importantes qu'entre animaux plus âgés. Par conséquent cette variation temporelle doit être prise en compte dans le choix du nombre d'animaux à échantillonner lors de l'analyse des facteurs de modification du microbiote digestif. D'importantes différences ont également été observées selon la localisation des prélèvements analysés que ce soit le long du tractus digestif ou au sein de chaque organe. Ainsi, le poulet ne possède pas un mais des microbiotes digestifs, chacun étant définis en fonction de sa localisation et de l'âge des animaux. Le choix de la localisation des prélèvements d'échantillons digestifs est donc également crucial pour étudier l'effet de différents facteurs, comme l'alimentation, sur les bactéries du tractus digestif du poulet.

Nous nous sommes également intéressés aux effets de la densité d'élevage sur les microbiotes des contenus digestifs. Une augmentation de la densité d'élevage est souvent associée à une dégradation des performances de croissance des animaux, particulièrement en fin d'élevage. Dans le cadre de l'étude présentée dans ce manuscrit, la forte densité d'élevage a été associée à une détérioration des performances de croissances à partir de 3 semaines et à une forte modification des microbiotes digestifs à 3 semaines et plus faibles à 6 semaines. Ces modifications des microbiotes digestifs pourraient contribuer à expliquer la réduction des performances de croissances en forte densité d'élevage. Si ces résultats sont confirmés par d'autres études, ils suggèrent que le contrôle des micrbiotes digestif puisse être un moyen pour limiter l'impact négatif de la densité d'élevage sur la croissance.

Chapitre 2 - Effet des phytobiotiques sur les performances zootechniques du poulet de chair

Ce chapitre présente l'effet des deux modèles de phytobiotiques sur les performances de croissance des animaux et leur microbiote digestif. L'objectif était dans un premier temps d'étudier le lien entre les conditions d'élevage de ces animaux, leur potentiel de croissance et l'effet des modèles de phytobiotiques sur leurs performances de croissance. Dans un second temps nous voulions comprendre les mécanismes d'action de ces alternatives aux AFC. Les deux modèles de phytobiotiques contenant de nombreuses molécules à effet antibactérien, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à leur effet sur le microbiote digestif

Le premier modèle de phytobiotiques correspondait à l'utilisation d'un aliment additionné d'un mélange d'extraits végétaux aux propriétés majoritairement antibactériennes (EXVa) distribué aux animaux à partir de 3 semaines d'âge. Le second modèle correspondait à un programme alimentaire commercial basé sur l'utilisation d'un mélange de phytobiotiques aux propriétés majoritairement antioxydantes et immuno-modulatrices administré les 10 premiers jours de vie, puis d'un mélange aux propriétés antibactériennes. Ces modèles expérimentaux ont été étudiés dans deux conditions post-éclosion, l'une optimisée pour favoriser les performances de croissances ultérieures des animaux, et l'autre pour être proche des conditions industrielles. Pour chacune de ces conditions d'élevage, les animaux ont été placés à deux densités d'élevage différentes. Les effets des phytobiotiques sur le microbiote digestif ont été étudiés dans les conditions de mise en place dans lesquelles ils se sont avérés promouvoir le plus efficacement la croissance des animaux, c'est-à-dire les conditions proches de celles rencontrées en élevage industriel.

La première section de ce chapitre présente les résultats obtenus chez les animaux placés dans les conditions post-éclosion optimales, avec tout d'abord les résultats obtenus pour l'ensemble des animaux, puis ceux obtenus en fonction de leur potentiel de croissance. La seconde section présente les résultats obtenus en conditions industrielles. Cette section est divisée en trois parties, la première et la seconde traitant respectivement des effets du premier modèles et du second modèle de phytobiotiques sur les performances de croissance et le microbiote digestif des animaux. La troisième partie traite de l'effet des deux modèles de phytobiotiques sur les performances de croissance des animaux en fonction de leur potentiel de croissance.

I. Effet sur la croissance dans des conditions post éclosion optimisées pour favoriser les performances ultérieures des animaux

1.1. Présentation de l'étude

L'utilisation de phytobiotiques comme facteurs de croissance à destination des volailles est en plein développement. Cependant leur efficacité est très variable d'une étude à l'autre. Ce manque de reproductibilité pourrait en partie être lié aux différences importantes en termes de conditions d'élevage et de génétique des animaux utilisés. En effet, plusieurs travaux menés sur des additifs facteurs de croissance suggèrent des liens entre conditions d'élevage, génétique (vitesse de croissance des lignées, efficacité digestive...) et efficacité des additifs.

Dans ce travail nous avons voulu étudier, selon la densité d'élevage, l'effet de combinaisons d'extraits végétaux sur les performances de poulets de chair placés dans des conditions post éclosion optimisées pour favoriser leurs performances ultérieures. Pour cela, le temps entre éclosion et première alimentation a été réduit en faisant éclore les animaux dans un couvoir expérimental situer sur le même site que les bâtiments d'élevage, après seulement 21j d'incubation (au lieu de 22j dans des pratiques industrielles. Lors de cette expérimentation, un aliment témoin ne contenant aucun phytobiotique a été comparé à un aliment contenant une combinaison de phytobiotiques à effet principal antibactérien et à un programme alimentaire commercial basé sur l'utilisation de deux mélanges de phytobiotiques aux propriétés majoritairement antioxydantes et immuno-modulatrices pour le premier et antibactériennes pour le second. Les animaux ont été placés à deux densités d'élevage, 12 et 17 animaux/m².

L'effet des phytobiotiques sur les performances de croissance a été étudié pour l'ensemble des animaux, ce qui fait l'objet du paragraphe 1.2 de ce chapitre, et en fonction de leur potentiel de croissance évalué par leur poids à 9j, ce qui fait l'objet du paragraphe 1.3.

Une partie de ces résultats a fait l'objet d'une présentation sous forme de poster lors des 9èmes journées de la recherche avicole, 29 et 30 mars 2011, Tours.

1.2. Effets sur l'ensemble des animaux

1 **Effet de deux mélanges de phytobiotiques sur la croissance de poulets de chair placés**
2 **dans des conditions post éclosion optimisées pour favoriser leurs performances**
3 **ultérieures**
4
5

6 **Résumé**

7 Les travaux menés sur les antibiotiques facteurs de croissance et certaines de leurs
8 alternatives suggèrent que les conditions d'élevage puissent modifier l'impact de ces produits
9 sur la croissance des animaux. L'objectif de ce travail était d'étudier, chez des poulets de
10 chair placés dans des conditions post éclosion optimisées pour favoriser les performances
11 ultérieures, l'effet de deux aliments expérimentaux (Exp1 et Exp2) selon la densité d'élevage
12 des animaux, forte (17 animaux/m²) ou faible (12 animaux/m²). Exp1 contenait un mélange de
13 phytobiotiques a effet antibactérien (EXVa) à partir de 24j, et Exp2 consistait en un
14 programme alimentaire commercial contenant un mélange de phytobiotique a effets
15 antioxydants et immunomodulateurs (EXVb) de 0 à 8j, puis EXVa à partir de 9j. Un aliment
16 témoin ne contenant pas de phytobiotiques a également été distribué aux animaux. Mille huit
17 cent soixante-douze poulets de souche Ross PM3 ont été élevés au sol en parquets de 3m²
18 avec 8 répétitions par traitement pour chaque densité. Les performances de croissance, dont
19 les poids individuels et la consommation, ont été suivies jusqu'à 41j. Les performances des
20 animaux ayant reçu l'aliment témoin étaient supérieures aux objectifs d'élevage de poulets à
21 croissance rapide (Ross PM3), quelle que soit la densité d'élevage. Les performances en
22 densité forte étaient plus faibles que celles en densité faible. Les aliments expérimentaux
23 utilisés n'ont pas eu d'effet sur le poids ou la consommation, en revanche ils ont légèrement
24 détérioré l'indice de consommation. De plus, en densité faible, Exp1 tendait a légèrement
25 augmenté la variance des poids à 36 j des animaux, tandis qu'en densité forte cette variance a
26 été réduite par les deux aliments expérimentaux à 36j, et par Exp1 à 41j. Ces résultats ont
27 donc montré, dans le cadre de cette étude, qu'en condition optimale post-éclosion, la
28 combinaison EXVa, peut réduire la variabilité de poids des animaux en forte densité, mais
29 qu'elle peut, comme son association avec EXVb, entraîner une dégradation d'indice de
30 consommation. Ces résultats montrent donc que l'utilisation de ces phytobiotiques doit être
31 raisonnée en fonction des conditions d'élevage des animaux.

32

33 **Introduction**

34 Les phytobiotiques (PHY) sont des additifs alimentaires utilisés pour améliorer les
35 performances zootechniques des volailles. Plusieurs études ont permis la mise en évidence, *in*
36 *vitro*, de certaines activités biologiques de ces molécules susceptibles d'avoir une influence
37 bénéfique sur la croissance des animaux : action antibactérienne (Ceylan and Fung, 2004),
38 antioxydante (Wei and Shibamoto, 2007) ou immuno-modulatrice (Spelman et al., 2006).
39 Cependant les études *in vivo* comme chez le poulet, montrent des effets variables,
40 particulièrement en terme d'indice de consommation (IC, +3% à -12%) et de gain de poids (-
41 3% à +8%) (Windisch et al., 2008).

42 Cette variabilité pourrait être liée aux conditions d'études de ces additifs qui diffèrent
43 beaucoup en termes de combinaisons de molécules utilisées et de doses, ainsi que de
44 conditions d'élevage et de composition de l'aliment des animaux. De plus, le temps entre
45 éclosion et première alimentation a un impact sur le développement du tractus digestif et sur
46 les performances ultérieures des oiseaux (Noy et al., 2001; Batal and Parsons, 2002; Suzuki et
47 al., 2008). Or, en conditions d'élevage, il peut s'écouler jusqu'à 48h entre l'éclosion et la mise
48 en place en élevage qui correspond au premier accès à l'aliment.

49 L'objectif de ce travail a donc été d'étudier l'effet d'une combinaison de
50 phytobiotiques à action antimicrobienne, utilisée seule ou précédée d'une combinaison à
51 actions principales antioxydante et immunomodulatrice, sur la croissance de poulets de chair,
52 en fonction de leur conditions d'élevage. L'impact des conditions d'élevage sur l'efficacité
53 des phytobiotiques a été étudié en faisant varier la densité d'élevage (12 et 17 animaux/m²).
54 Pour limiter le temps entre éclosion et première alimentation sur les performances, les
55 animaux ont été incubés 21 j (au lieu de 22 j dans les éclosiers industriels) et éclos à
56 proximité du site d'élevage.

57 **Matériel et méthodes**

58 **Aliments**

59 Trois aliments ont été donnés aux animaux : un aliment témoin (T) et deux
60 expérimentaux (Exp1 et Exp2). T était composé principalement de blé, de tourteau de soja et
61 de maïs. Les aliments ont été déclinés en 4 phases, démarrage (0-8 j ; EM 2938 kcal/kg,
62 protéines 215 g/kg), croissance (9-22j ; EM 2986 kcal/kg, protéines 202 g/kg), finition (23-35j
63 ; EM 3033 kcal/kg, protéines 190g/kg) et retrait (36-41j ; EM 3105 kcal/kg, protéines 180
64 g/kg). Exp1 contenait une combinaison d'EXV naturels à activité principale antimicrobienne

65 (EXVa), en périodes finition et retrait, à la concentration de 1kg/T. Exp2 contenait une
66 combinaison d'EXV naturels à activité anti-oxydante et immuno-modulatrice (EXVb) à la
67 concentration de 0,3 kg/T en période de démarrage, puis le mélange EXVa à 0,8 kg/T en
68 période de croissance et enfin le mélange EXVa à 1 kg/t en périodes de finition et retrait.

69 La combinaison EXVa (ENTX® Phytosynthèse, Riom, France) était composée
70 d'huiles essentielles (HE) d'eucalyptus, de cannelle et d'ail, ainsi que d'extrait d'ail ; les
71 principes actifs majoritaires de ces extraits sont du 1,8 cinéole, du (E)-cinnamaldéhyde, de
72 l'allicine, et des sulfures de diallyle. La combinaison EXVb (Immunostart®, Phytosynthèse,
73 Riom, France) était composée d'extrait d'uncaria, d'éléuthérocoque, de curcuma, de pépins de
74 raisins et de naringine ; leurs principes actifs majoritaires sont des uncarines, des
75 éléuthérosides, des curcuminoïdes, des catéchines, des proanthocyanidines et de la naringine.

76 **Animaux et protocole expérimental**

77 Les animaux utilisés étaient des poulets de chair mâles (Ross PM3). Les œufs
78 fécondés, issus de reproducteurs ayant tous le même âge, ont été obtenus auprès de
79 l'accoureur Grelier (Volnay, France) et incubés au couvoir expérimental de l'UE PEAT
80 (centre INRA de Tours). Pour réduire le temps entre éclosion et première alimentation, les
81 poussins ont été incubés 21 j au lieu de 22j dans les pratiques standards commerciales) et mis
82 en place dans un bâtiment situé à proximité du couvoir.

83 Les animaux ont été élevés au sol dans un bâtiment expérimental pendant 41 jours
84 dans 48 parquets de 2,8 m². La litière était composée de copeaux de bois (6 kg/m²), non
85 renouvelés en cours d'expérimentation. Les animaux ont été mis en place à deux densités
86 d'élevage différentes, une densité faible de 12 poulets/m² et une densité forte de 17
87 animaux/m², et ont reçu trois aliments expérimentaux. Huit répétitions (parquets) ont été
88 effectuées par traitement. Les animaux ont été pesés individuellement sans mise à jeun à 9,
89 23, 36 et 41 jours. Le suivi de consommation a été réalisé pour chaque parquet à ces mêmes
90 âges. Le gain de poids (GP) a été calculé individuellement et l'indice de consommation (IC) a
91 été calculé par parquet. La température du bâtiment était de 32°C à l'arrivée des poussins puis
92 elle a été graduellement baissée pour atteindre 22°C le 28ème jour d'élevage. Le programme
93 lumineux consistait en 23h de lumière du 1er au 5ème jour d'élevage, 20h de lumière du 6ème
94 au 11ème jour d'élevage et 18h de lumière à partir du 12ème jour d'élevage.

95 A 27j, et 35j des animaux supplémentaires ont été euthanasiés dans les parquets pour
96 effectuer des prélèvements de tissus et de contenus digestifs (432 et 288 animaux
97 respectivement). Ces prélèvements étaient destinés à étudier, dans le cas d'une amélioration
98 des performances de croissance par les phytobiotiques, leurs modes d'action.

99 **Analyses statistiques**

100 Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel StatView® (Abacus
101 concepts, Berkeley, CA, USA). L'égalité des variances du poids des animaux a été analysée
102 par le test de Fischer-Snedecor. L'effet des traitements sur les performances de croissance a
103 été étudié par analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs (densité d'élevage et aliment),
104 cette analyse paramétrique étant suffisamment robuste pour être effectuée lorsque
105 l'hétérogénéité des variances n'est pas trop élevée. Les différences significatives entre
106 groupes ont été déterminées en utilisant le test de Student-Newman-Keuls ($P \leq 0,05$). Les
107 tendances sont présentées pour $P \leq 0,10$.

108 **Résultats**

109 Les PHY ont eu un effet sur la variance du poids dépendant de l'âge des animaux et de
110 leur densité d'élevage (Tableau 1). A 36j, en densité d'élevage faible, la variance du poids des
111 animaux ayant reçu l'aliment Exp1 tendait à être plus élevée que celle des animaux ayant reçu
112 l'aliment T (+39% ; $p=0,06$) En densité d'élevage normale, les variances du poids des
113 animaux ayant reçu les aliments Exp1 ou Exp2 étaient plus faibles que celle des animaux
114 ayant reçu l'aliment T (-37% et -25% respectivement). A 41j, en faible densité d'élevage, la
115 variance de poids des animaux n'a pas présenté de différence significative entre les 3
116 aliments. En forte densité, la variance était inférieure pour l'aliment Exp1 par rapport à
117 l'aliment T (-32%). De plus, la variance de poids des animaux ayant reçu l'aliment Exp1
118 tendait à être inférieure à celle de ceux ayant reçu l'aliment Exp2 ($p=0,08$).

119 Aucune interaction entre les effets densité et aliment n'ont été observé sur les valeurs
120 de poids ou de GP (Tableau 2). Concernant l'IC, une interaction entre les facteurs aliments et
121 densité n'est observé que durant la période 23 à 36j (Tableau 3).

122 L'aliment n'a eu aucun effet sur le poids ou le GP des animaux quel que soit leur âge
123 (Tableau 2). Durant la période 0j à 9j, l'IC était dégradé (+1,1%) chez les animaux ayant reçu
124 Exp1 par rapport à ceux ayant reçu T (Tableau 3). Durant la période 9 à 23 jours, l'IC est
125 dégradé chez les animaux du groupe Exp1 (+1,0%) et du groupe Exp2 (+1,5%) par rapport au
126 groupe témoin. Durant la période 23 à 36 jours, une dégradation de l'IC est observé chez les

127 animaux élevés en faible densité et ayant reçu Exp2 (+3,6%). Cela entraîne une dégradation
128 de l'IC pour l'ensemble de la période d'élevage de +1,3% et +1,4% pour les groupes Exp1 et
129 Exp2 respectivement.

130 La densité d'élevage a eu un effet important sur les performances de croissance. Ainsi,
131 la forte densité a dégradé le poids des animaux dès 23j par rapport à la densité faible et cet
132 effet était plus marqué à 36j et 41j (-1,0%, -1,7% et -3,0% respectivement, Tableau 2). Cela se
133 retrouve dans la diminution du GP entre 23j et 36j (-2,3%) et de façon encore plus marquée
134 entre 36j et 41j (-8,6%). La faible densité a eu un impact négatif sur l'IC de 0 à 9j (+1,0%,
135 Tableau 3). De 9 à 23 jours la densité d'élevage n'as pas eu d'effet sur l'IC des animaux.
136 Comme évoqué précédemment, entre 23 et 36j une interaction entre aliment et densité a été
137 observée. De 36 à 41j l'IC n'as pas été affecté par la densité. Sur l'ensemble de la période
138 d'élevage, l'IC des animaux élevés en forte densité était dégradé par rapport à celui des
139 animaux élevés en faible densité (+1,8%).

140 Les phytobiotiques n'ayant pas amélioré les performances de croissance des animaux,
141 les prélèvements effectués à j28 et j35 n'ont pas été analysés.

142

143

144 Tableau 1 : Effet de l'aliment en densités faible et forte sur la variance de poids des animaux

	Poids à 36j				Poids à 41j			
	12 animaux/m ²		17 animaux/m ²		12 animaux/m ²		17 animaux/m ²	
Traitement alimentaire	Variance	Effectif	Variance	Effectif	Variance	Effectif	Variance	Effectif
Témoin (T)	54034	132	70467 ^b	236	75432	131	89785 ^b	230
Exp1	75394	129	44236 ^a	233	99263	123	61236 ^a	231
Exp2	60590	130	52577 ^a	237	75039	124	77207 ^{ab}	232
Comparaison	Ratio de Variance	Valeur de P	Ratio de Variance	Valeur de P	Ratio de Variance	Valeur de P	Ratio de Variance	Valeur de P
T vs Exp1	0,717	0,06	1,592	<0.001	0,760	NS	1,466	<0.01
T vs Exp2	0,892	NS	1,340	0.03	1,005	NS	1,163	NS
Exp1 vs Exp2	1,244	NS	0,842	NS	1,323	NS	0,793	0,08

145

146

147

148 Tableau 2 : Effet de l'inclusion d'extraits végétaux et de la densité d'élevage sur les poids et
 149 le gain de poids des animaux mis en place dans des conditions optimales

		Poids			Gain de poids	
		23j	36j	41j	23- 36j	36- 41j
Valeur de P	Aliment (A)	NS	NS	NS	NS	NS
	Densité (D)	0,05	0,01	<0,01	0,01	<0,01
	A x D	NS	NS	NS	NS	NS
Aliment	Témoin	1096	2319	2772	1218	456
	Exp1	1100	2343	2794	1238	452
	Exp2	1094	2329	2798	1236	441
	ESM ¹	4,9	12,8	15,0	9,1	5,0
Densité	Faible	1103 ^a	2356 ^a	2832 ^a	1249 ^a	476 ^a
	Forte	1092 ^b	2317 ^b	2748 ^b	1220 ^b	435 ^b
	ESM ¹	4,0	10,3	12,1	7,4	4,0

150 En densité basse, 272 animaux ont été mis en place par traitement et leur effectif à 41j était de 126 suite à des
 151 prélèvements pour une autre expérimentation

152 En densité normale, 384 animaux ont été mis en place par traitement et leur effectif à 41j était de 231 suite à des
 153 prélèvements pour une autre expérimentation

154 ¹ESM = Ecart Standard de la moyenne

155

156

157 Tableau 3 : Effet de l'inclusion d'extraits végétaux selon la densité d'élevage sur les indices
 158 de consommation des animaux mis en place dans des conditions optimales

159

			IC 0-9j	IC 9-23j	IC 23-36j	IC 36-41j	IC 1-41j	
Valeur de P	Aliment (A)		0,01	<0,01	NS	NS	0,02	
	Densité (D)		<0,01	NS	0,04	NS	<0,01	
	A x D		NS	NS	0,04	NS	NS	
Densité	Basse	Témoin	1,188	1,449	1,797 ^a	2,194	1,655	
		Exp1	1,202	1,469	1,844 ^{ab}	2,290	1,689	
		Exp2	1,191	1,472	1,861 ^b	2,295	1,698	
	Elevée	Témoin	1,158	1,445	1,863 ^b	2,300	1,707	
		Exp1	1,169	1,455	1,883 ^b	2,318	1,718	
		Exp2	1,153	1,466	1,841 ^{ab}	2,371	1,711	
	ESM ¹		0,0045	0,0062	0,0160	0,0524	0,0112	
	Aliment	Témoin		1,173 ^a	1,447 ^a		2,247	1,681 ^a
		Exp1		1,186 ^b	1,462 ^b		2,304	1,703 ^b
Exp2		1,172 ^a	1,469 ^b		2,333	1,705 ^b		
ESM ¹		0,0053	0,0044		0,0371	0,0079		
Densité	Basse		1,194 ^b	1,463		2,260	1,681 ^a	
	Elevée		1,160 ^a	1,455		2,330	1,712 ^b	
	ESM ¹		0,0028	0,0039		0,0300	0,0065	

160 N=8 parquets par traitement

161 ¹ESM = Ecart type de la moyenne

162

163 **Discussion**

164 **Effet de la densité d'élevage sur les performances de croissance**

165 L'augmentation de la densité d'élevage a eu un effet positif sur l'IC des jeunes
166 animaux pendant la période 0 à 9j. Un phénomène similaire a été rapporté par Dozier et al.,
167 (2006). Cette amélioration de l'IC des jeunes animaux est probablement liée à des pertes de
168 chaleur moins importantes quand les animaux sont élevés en groupes denses. Un effet négatif
169 significatif de la densité d'élevage a été observé sur le gain de poids dès 23j et sur l'IC à partir
170 de 36j. D'autres études ont pu mettre en évidence un effet négatif de la densité en fin
171 d'élevage comme rapporté dans les revues de Bessei (2006) ou Estevez (2007). Cet impact
172 négatif sur les performances de croissances pourrait être lié à différents facteurs impliquant
173 une dégradation de l'environnement direct des animaux ou une modification de leur
174 comportement comme décrit par Guardia et al (2011).

175

176 **Effets du mélange EXVa administré seul à partir de 3 semaines sur les performances de** 177 **croissance**

178 Le mélange EXVa administré seul n'as eu aucun effet sur les GP et les poids des
179 animaux mais as eu un effet négatif sur l'IC plus marqué en faible densité. Sur la période 0j à
180 9j, l'IC était dégradé par Exp1. Cependant à cet âge la composition de l'aliment Exp1 était
181 identique à celle de l'aliment témoin. Les différences observées sur cette période proviennent
182 donc vraisemblablement de différences de répartition des animaux dans les parquets.
183 L'absence d'effet de EXVa sur le poids et le GP des animaux, et l'effet négatif sur l'IC va à
184 l'encontre de certains travaux menés avec des phytobiotiques issus des plantes composant ce
185 mélange En effet, une amélioration de l'IC et du GP de poulet a pu être observée avec des
186 extraits de cannelle et d'ail par plusieurs équipes (Al-Kassie, 2009; Ashayerizadeh et al.,
187 2009; Mahmood et al., 2009). Cependant d'autres études n'ont pas montré d'effet (Kırkpınar
188 et al., 2010; Najafi et Torki, 2010).

189 Les objectifs d'élevage pour la souche Ross PM3 utilisée (Aviagen, 2007) sont de
190 2745g à 41j, soit inférieurs ou égaux à ceux observés pour les animaux témoins élevés en
191 densité faible et élevée respectivement. Un temps important entre éclosion et première
192 alimentation peut avoir un impact néfaste et durable sur les performances de croissance des
193 animaux (Suzuki et al., 2008), ce qui pourrait expliquer que les performances de croissance
194 du groupe témoin soient supérieures aux objectifs d'élevage de la souche. Ces résultats
195 suggèrent que les phytobiotiques utilisés puissent avoir des effets défavorables sur des

196 animaux placés dans des conditions d'élevage optimales pour leur croissance. Le fait que la
197 dégradation de l'IC soit moins importante en densité d'élevage élevée suggère que lorsque les
198 conditions d'élevage sont moins favorables, des résultats différents puissent être observés.

199 De plus, un impact sur la variance des poids, différent selon la densité d'élevage
200 considérée, a été observé. En densité d'élevage faible, à 36 et 41j, la variance était plus
201 importante chez les animaux ayant reçu le mélange EXVa seul que chez les animaux témoins,
202 tandis que en densité élevée elle était réduite avec ce même aliment. Ces résultats sont
203 cohérents avec l'idée que les extraits végétaux peuvent avoir un effet bénéfique dans des
204 conditions d'élevage dégradées et un effet nul ou légèrement défavorable dans des conditions
205 optimales. Cette réduction de la variance pourrait s'expliquer par un effet différent des
206 phytobiotiques selon la vitesse de croissance des animaux. Ils seraient plus efficaces chez les
207 animaux ayant la croissance la plus lente.

208

209 **Effets du programme alimentaire Exp2 sur les performances de croissance**

210 De la même manière que pour le mélange EXVa administré seul, l'association du
211 mélange de phytobiotiques EXVb puis du mélange EXVa n'as eu aucun effet sur les GP et les
212 poids des animaux. Sur la période 23j à 36j l'IC est dégradé en densité faible par Exp2 alors
213 que ce n'était pas le cas avec le traitement EXVa seul à partir de 3 semaines, cette différence
214 n'apparait pas en densité élevée. Cela pourrait être dû aux propriétés immuno-modulatrices de
215 certains constituant de Exp2, notamment les extraits d'uncaria et d'eleuthérocoque (Deyama
216 et al., 2001; Heitzman et al., 2005; Valerio Jr and Gonzales, 2005; Spelman et al., 2006), qui
217 ont pu conduire à une stimulation de l'immunité de ces animaux. Or placés dans ces
218 conditions d'élevage favorable à leur croissance, cette stimulation précoce de l'immunité des
219 animaux a pu se faire au détriment de leur croissance ultérieure sans leur apporter de bénéfice
220 réel. En effet, la mise en place d'une réaction immunitaire a un cout énergétique important
221 (Humphrey and Klasing, 2004).

222 Concernant la variance des poids, l'aliment Exp1 l'accroit en faible densité alors
223 qu'Exp2 est sans effet. En forte densité, Exp1 a un effet bénéfique sur la variance des poids
224 supérieur à Exp2. Ces résultats suggèrent que selon la densité d'élevage, les deux aliments
225 expérimentaux n'agissent pas sur les mêmes populations d'animaux.

226

227

228

229

230 **Conclusions**

231 1. L'augmentation de la densité d'élevage a un impact négatif sur les performances de
232 croissances des animaux, plus marqué chez les animaux les plus âgés.

233 2. Dans des conditions de mise en place favorables à la croissance des animaux, aucun
234 effet des aliments testés n'a pu être observé sur le poids et le GP des animaux, quelle que soit
235 leur densité d'élevage.

236 3. En faible densité d'élevage un impact négatif des phytobiotiques utilisés a pu être
237 observé sur l'IC des animaux. Un accroissement de la variance des poids des animaux a
238 également été observé avec l'aliment Exp1.

239 4. En forte densité d'élevage ces additifs ont réduit la variance des poids des animaux,
240 mais l'effet négatif sur l'IC était maintenu.

241 5. Lorsque la croissance des animaux est optimale, les phytobiotiques utilisés ont eu
242 un effet légèrement négatif sur la croissance des animaux. Dans des conditions de croissances
243 moins bonnes, liées à une augmentation de la densité d'élevage, les phytobiotiques utilisés ont
244 permis de réduire la variance entre les poids des animaux, mais une légère détérioration de
245 l'IC était observée. Ainsi, les phytobiotiques utilisés dans cette étude ne permettent pas
246 d'améliorer les performances de croissances d'animaux dont la croissance est déjà supérieure
247 aux objectifs d'élevage de leur souche. Nos résultats suggèrent néanmoins qu'ils puissent être
248 bénéfiques pour le contrôle de la croissance d'animaux élevés en conditions défavorables, en
249 réduisant la variance des poids.

250

251 **Références**

252 Al-Kassie, G.A.M., 2009. Influence of two plant extracts derived from thyme and cinnamon
253 on broiler performance. *Pakistan Veterinary Journal* 29, 169-173.

254 Araujo, C.A.C., Leon, L.L., 2001. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Mem. Inst.*
255 *Oswaldo Cruz* 96, 723-728.

256 Ashayerizadeh, O., Dastar, B., Shargh, M.S., Ashayerizadeh, A., Rahmatnejad, E., Hossaini,
257 S.M.R., 2009. Use of garlic (*Allium sativum*), black cumin seeds (*Nigella sativa* L.)
258 and wild mint (*Mentha longifolia*) in broiler chickens diets. *J. Anim. Vet. Adv.* 8,
259 1860-1863.

260 Aviagen, 2007. Ross PM3 broiler performance objectives.

261 Batal, A.B., Parsons, C.M., 2002. Effect of fasting versus feeding oasis after hatching on
262 nutrient utilization in chicks. *Poult. Sci.* 81, 853-859.

- 263 Bessei, W. 2006. Welfare of broilers: A review. *World's Poult. Sci. J.* 62, 4555-465.
- 264 Ceylan, E., Fung, D.Y.C., 2004. Antimicrobial activity of spices. *J. Rapid. Meth. Autom.*
265 *Microbiol.* 12, 1-55.
- 266 Deyama, T., Nishibe, S., Nakazawa, Y., 2001. Constituents and pharmacological effects of
267 *Eucommia* and Siberian ginseng. *Acta Pharmacol. Sin.* 22, 1057-1070.
- 268 Dozier, W., Thaxton, J., Purswell, J.L., Olanrewaju, H.A., Branton, S., Roush, W., 2006.
269 Stocking density effects on male broilers grown to 1.8 kilograms of body weight.
270 *Poult. Sci.* 85, 344-351.
- 271 Estevez, I. 2007. Density allowances for broilers: Where to set the limits ? *Poult. Sci.*
272 86:1265-1272.
- 273 Guardia, S., Konsak, B., Combes, S., Levenez, F., Cauquil, L., Guillot, J. F., Moreau-
274 Vauzelle, C., Lessire, M., Juin, H., Gabriel, I., 2011. Effects of stocking density on the
275 growth performance and digestive microbiota of broiler chickens. *Poultry Science*, 90,
276 1878-1889.
- 277 Heitzman, M.E., Neto, C.C., Winiarz, E., Vaisberg, A.J., Hammond, G.B., 2005.
278 Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae).
279 *Phytochemistry* 66, 5-29.
- 280 Humphrey, B.D., Klasing, K.C., 2004. Modulation of nutrient metabolism and homeostasis by
281 the immune system. *Worlds Poult. Sci. J.* 60, 90-100.
- 282 Kirkpınar, F., Unlu H. B.; Ozdemir G., 2010. Title: Effects of oregano and garlic essential oils
283 on performance, carcass, organ and blood characteristics and intestinal microflora of
284 broilers. *Livestock Science*, 137, 1-3, 619
- 285 Mahmood, S., Mushtaq-Ul-Hassan, M., Alam, M., Ahmad, F., 2009. Comparative Efficacy of
286 *Nigella sativa* and *Allium sativum* as Growth Promoters in Broilers. *Int. J. Agric. Biol.*
287 11, 775-778.
- 288 Najafi P.; Toriki M. Performance, 2010. Blood Metabolites and Immunocompetence of
289 Broiler Chicks Fed Diets Included Essential Oils of Medicinal Herbs. *Journal of*
290 *animal and veterinary advances*, 9, 7, 1164-1168.
- 291 Noy, Y., Geyra, A., Sklan, D., 2001. The effect of early feeding on growth and small
292 intestinal development in the posthatch poult. *Poult. Sci.* 80, 912-919.
- 293 Spelman, K., Burns, J.J., Nichols, D., Winters, N., Ottersberg, S., Tenborg, M., 2006.
294 Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal
295 immunomodulators. *Altern. Med. Rev.* 11, 128-150.

- 296 Suzuki, T., Noguchi, J., Kitamura, M., Fujisaki, H., 2008. Effects of a newly developed early
297 post-hatch feed for poultry hatchlings on the performance of poultry. *Journal of*
298 *Poultry Science* 45, 39-45.
- 299 Valerio Jr, L.G., Gonzales, G.F., 2005. Toxicological aspects of the south american herbs cat's
300 claw (*Uncaria tomentosa*) and Maca (*Lepidium meyenii*). *Toxicol. Rev.* 24, 11-35.
- 301 Wei, A., Shibamoto, T., 2007. Antioxidant activities and volatile constituents of various
302 essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 55, 1737-1742.

1.3. Résultats complémentaires : effets en fonction du potentiel de croissance des animaux

Des études comparant l'effet d'AFC en fonction de la lignée des animaux (Nordskog et Johnson, 1953 ; Pietrzak et al., 2006) suggèrent qu'il existe un impact de la génétique sur la réponse des poulets à ces facteurs de croissance. Or même au sein d'une lignée il existe une variabilité génétique inter-individuelle. Pour appréhender le mécanisme d'action de ces alternatives aux AFC, il apparaissait donc intéressant de connaître la variabilité individuelle de la réponse des animaux en fonction de leur génétique. Nous avons donc étudié la réponse de poulets de chair aux deux modèles de phytobiotiques en fonction de leur potentiel de croissance.

Le potentiel de croissance des animaux a été évalué à partir d'un critère mesurable précocement permettant de prédire le poids en fin d'élevage. Comme expliqué dans la partie 2 de ce manuscrit, nous avons choisi d'estimer le potentiel de croissance des animaux à partir du poids à 9j. L'analyse des résultats en fonction du poids 9j a été réalisée grâce à une analyse de covariance (ANCOVA) à deux facteurs (densité d'élevage et aliment) avec comme covariable le poids à 9j des animaux. Comme cette analyse a permis la mise en évidence d'une interaction entre le poids à 9j, l'aliment et la densité, les résultats ont été analysés en fonction de catégories de poids à 9j. Pour définir ces catégories, les données ont été réparties en 3 groupes d'effectif similaire en fonction du poids à 9j (appelés 'Petits', 'Moyens', 'Gros'). Au sein de chacun de ces groupes de poids les effets de la densité d'élevage et du traitement alimentaire ont été étudiés par ANOVA à deux facteurs (densité et aliment), et les différences significatives entre groupes ont été déterminées en utilisant le test de Student-Newman-Keuls ($p \leq 0.05$).

Le potentiel de croissance des animaux estimé par leur poids à 9j a un effet sur la réponse des animaux à la densité d'élevage (Tableau 21). Une tendance à l'interaction entre poids à 9j et densité d'élevage a été observée sur les poids à 36j ($p=0,07$). Cette interaction devient significative sur le poids à 41j. Concernant l'effet de la densité selon les classes de poids des animaux à 36 j, seuls les gros animaux ont vu leur poids négativement influencé par la densité (Tableau 22, -2.0%). En revanche, à 41j, les animaux de poids moyen sont aussi touchés par cet effet négatif (-2.4% et -3.3% pour les moyens et gros respectivement). Parallèlement à ces baisses de poids, les GP sont affectés. Ainsi alors que les gros animaux

sont affectés dès la période de 23 à 36 j (-3.2%), aussi bien les moyen que les gros sont affectés sur la période de 36 à 41 j (-8.3%) et (-9.4%) respectivement. Les GP sur la dernière période de croissance mettent également en évidence un effet significatif négatif de la densité sur les petits animaux (-7.7%). Ces résultats mettent en évidence que les animaux ayant le potentiel de croissance le plus élevé sont les plus susceptibles de réagir à l'augmentation de la densité d'élevage. Un impact de la génétique des animaux sur leur susceptibilité à l'augmentation de la densité d'élevage avait déjà pu être mis en évidence, mais entre lignée (Skomorucha et al., 2009). A notre connaissance, cette étude met pour la première fois en évidence un effet du potentiel de croissance d'animaux issus d'une même lignée sur leur sensibilité à la densité d'élevage. La plus grande sensibilité des gros animaux à la densité pourrait être liée à leur statut oxydatif. En effet il a été montré, d'une part, que le stress oxydatif est plus important chez les animaux sélectionnés pour leur rapidité de croissance (Nain et al., 2008) et, d'autre part, que l'augmentation de la densité d'élevage augmente le stress oxydatif chez les animaux (Simsek et al., 2009). Ainsi les animaux ayant un potentiel de croissance élevé, de par leur statut oxydatif défavorable, pourraient souffrir plus du surcroît d'oxydation lié à la densité d'élevage.

Le potentiel de croissance n'a pas eu d'effet significatif sur l'efficacité des phytobiotiques, comme le montre l'absence d'interaction entre les facteurs poids à 9j et aliment concernant le poids et le GP (Tableau 21). Quelle que soit la catégorie de poids de l'animal, l'aliment n'a pas d'effet significatif sur le poids ou le gain de poids des animaux au cours de leur croissance. (Tableau 22).

Cependant, une interaction entre poids à 9j, densité d'élevage et aliment a été observée sur le poids à 36j, ainsi qu'une tendance sur les GP entre 23 et 36j ($p=0,06$; Tableau 21). Un impact sur la variance des poids de l'ensemble des animaux, différent selon la densité d'élevage considérée, a été observé (Partie 3 chapitre 2.1.2). En faible densité d'élevage, Exp1 a entraîné une augmentation de la variance du poids en fin d'élevage, tandis qu'en densité élevée elle était réduite avec ce même aliment et dans une moindre mesure avec l'aliment Exp2. Cette réduction de la variance pourrait s'expliquer par un effet différent des phytobiotiques selon le potentiel de croissance des animaux et la densité d'élevage. En densité élevée, ceux-ci seraient plus efficaces sur les animaux à plus faible potentiel de croissance. C'est ce que suggère l'interaction entre poids à 9j, densité d'élevage et aliment, observée à 36j. En densité élevée, une augmentation numérique, non significative, du poids des petits est

observée ce qui n'est pas le cas pour les gros (résultats non présentés). Le faible effectif des petits animaux pourrait expliquer que ce résultat ne soit pas significatif.

De plus, les différences entre traitements Exp1 et Exp2 (impacts différents sur la variance de poids et triple interaction entre poids à 9j, densité d'élevage et aliment) suggèrent que les deux modèles de PHY n'agissent pas sur les mêmes populations d'animaux. Ces résultats sont probablement à mettre en relation avec les principes actifs contenus dans chacun des modèles de PHY et avec les facteurs limitant la croissance des différentes populations d'animaux.

Tableau 21 : Analyse de variance à 2 facteurs (densité, traitement) avec comme co-variable le poids des animaux à 9 jours

Valeur de P	Poids			Gain de poids		
	23j	36j	41j	9-23j	23- 36j	36- 41j
Aliment (A)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Densité (D)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Poids 9j (P9)	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
A x D	NS	0,02	0,10	NS	0,05	NS
A x P9	NS	NS	NS	NS	NS	NS
D x P9	NS	0,07	0,04	NS	NS	NS
A x D x P9	NS	0,02	NS	NS	0,06	NS

Tableau 22 : Effet de l'inclusion d'extraits végétaux selon la densité d'élevage et la catégorie de poids à 9j sur le poids et le gain de poids des animaux mis en place dans des conditions optimales

Valeur de P		Poids						Gain de poids					
		36j			41j			23- 36j			36- 41j		
		Petits	Moyens	Gros	Petits	Moyens	Gros	Petits	Moyens	Gros	Petits	Moyens	Gros
Aliment (A)	Aliment (A)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Densité (D)	NS	NS	0,03	NS	0,01	<0,01	NS	NS	0,02	<0,01	<0,01	<0,01
	A x D	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Aliment	Témoin	2122	2329	2453	2565	2780	2916	1135	1230	1268	444	454	468
	Exp1	2156	2311	2462	2576	2791	2938	1167	1246	1276	424	445	477
	Exp2	2178	2348	2461	2607	2745	2913	1201	1222	1277	429	436	456
	ESM ¹	23,6	16,5	18,2	27,7	20,7	21,5	17,3	14,2	14,9	9,2	8,3	8,3
Densité	Basse	2152	2346	2490 ^a	2615	2814 ^a	2986 ^a	1169	1246	1300 ^a	456 ^a	469 ^a	495 ^a
	Elevée	2152	2318	2441 ^b	2569	2747 ^b	2887 ^b	1167	1224	1259 ^b	421 ^b	430 ^b	451 ^b
	ESM ¹	19,3	13,4	14,8	22,6	16,7	17,3	14,2	11,6	12,0	7,4	6,6	6,6

¹ESM = Ecart type de la moyenne

En densité basse, 95 petits, 101 moyens et 96 gros animaux ont été mis en place par traitement et leur effectif à 41j était de 29 petits, 48 moyens et 48 gros suite à des prélèvements pour une autre expérimentation

En densité élevée, 132 petits, 132 moyens et 133 gros animaux ont été mis en place par traitement et leur effectif à 41j était de 65 petits, 81 moyens et 85 gros suite à des prélèvements pour une autre expérimentation

II. Effet sur la croissance et le microbiote digestif dans des conditions post éclosion proches de celles utilisées en élevage industriel

2.1. Présentation de l'étude

Les deux modèles de phytobiotiques décrits dans ce manuscrit n'ont pas amélioré les performances de croissances des animaux placés dans des conditions post éclosions expérimentales, destinés à optimiser leur croissance.

Cependant, certains des composés contenus dans ces mélanges de phytobiotiques sont rapportés stimuler la croissance des volailles lorsqu'ils sont inclus dans leur alimentation. Ces études ont été effectuées sans que des mesures spécifiques aient été prises pour optimiser les conditions post éclosion. De plus, lors de la présente étude, une action différente des phytobiotiques selon la densité d'élevage a été observée sur la variance des poids, suggérant que les conditions d'élevage puissent modifier les effets de ces molécules sur les animaux. Enfin, le modèle de phytobiotiques Exp2 distribué à des animaux en élevage industriel a montré précédemment un effet positif sur leur croissance (Rcoquillay, communication personnelle).

Dans ce travail nous avons donc voulu étudier l'effet des deux modèles de phytobiotiques sur des animaux placés dans des conditions post éclosion moins favorable à la croissance des animaux et plus proches de celles pratiquées dans des élevages industriels (éclosion dans un couvoir industriel après 22j d'incubation, transport sur une distance de plus de 150 km). Les résultats de l'expérimentation présentée dans la première section de ce chapitre suggéraient que la densité d'élevage et le potentiel de croissance puissent moduler la réponse des animaux aux phytobiotiques utilisés. Ces facteurs ont donc été conservés lors de l'expérimentation décrite dans cette section. L'étude a été réalisée avec les mêmes modèles témoin et expérimentaux distribués à des animaux placés à 12 ou 17 animaux/m². Par ailleurs, les phytobiotiques utilisés dans les deux modèles expérimentaux contenant de nombreuses molécules ayant un effet antibactérien, nous voulions étudier si leur ingestion par les animaux pouvait entraîner des modifications au niveau de leur microbiote digestif.

L'effet des phytobiotiques sur les performances de croissance et le microbiote digestif a donc été étudié pour l'ensemble des animaux, ce qui fait l'objet du paragraphe 2.2 de ce chapitre, et en fonction de leur potentiel de croissance, ce qui fait l'objet du paragraphe 2.3.

2.2. Effets sur l'ensemble des animaux

La première partie de cette section est consacré aux résultats concernant l'impact du modèle expérimental Exp1 sur la croissance et le microbiote digestif des animaux. Ces résultats sont présentés sous forme d'un article en cours de rédaction en vue d'une publication dans *Animal Feed Science and Technology* et de résultats complémentaires. La seconde partie est consacrée aux résultats obtenus en utilisant le modèle expérimental Exp2 et est présentée sous forme d'un article en cours de rédaction en vue d'une publication dans *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* et de résultats complémentaires.

2.2.1. Effet d'un mélange de phytobiotiques a effet antibactérien administré à partir de 3 semaines

2.2.1.1. Effets d'un mélange de phytobiotiques naturels sur la croissance et le microbiote digestif du poulet de chair selon leur densité d'élevage

Cet article est en cours de préparation en vue de sa soumission dans *Animal Feed Science et Technology*.

1 **Effect of a natural phytobiotic blend and stocking density on growth performance and**
2 **digestive microbiota of broiler chickens**

3 S. Guardia^{*}, B. Konsak^{*}, S. Combes^{†‡§}, F. Levenez[#], L. Cauquil^{†‡§}, J. -F. Guillot^{||}, M.
4 Leconte^{*}, C. Moreau-Vauzelle[¶], M. Lessire^{*}, H. Juin[¶], I. Gabriel^{*1}

5
6 ^{*}INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France

7 [†]INRA, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326
8 Castanet-Tolosan, France

9 [‡]Université de Toulouse, INPT ENSAT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion
10 Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

11 [§]ENVT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-
12 31076 Toulouse, France

13 [#]INRA, UMR1319 Micalis, F-78352 Jouy En Josas, France

14 ^{||}I.U.T. DE TOURS, Laboratoire de microbiologie, 29 rue du Pont-Volant, F-37082 Tours,
15 France

16 [¶]INRA, UE1206 Elevage alternatif et santé des monogastriques, Le Magneraud, F-17700
17 Saint-Pierre-d'Amilly, France

18

19 **Abstract**

20 Phytobiotics are currently used as alternative to antibiotics growth promoters. However, their
21 efficiency is highly variable. This discrepancy could be related to rearing conditions which
22 strongly differs between studies. Moreover, the mechanisms leading to a growth improvement
23 of poultry when fed by a diet containing phytobiotics are still unknown. The digestive
24 microbiota could be involved as many phytobiotics contains antibacterial molecules. In the
25 present study the impact of a phytobiotic blend on the growth performance was investigated
26 on broilers reared at 12 birds/m² or 17 birds/m². The changes on digestive microbiota were
27 also analyzed by molecular fingerprinting and real time PCR quantification. At low stocking
28 density the phytobiotics improved the growth performances leading to a final body weight
29 6.1% higher. This was due to a strong increase of feed intake and a slight decrease of feed
30 conversion ratio. At high stocking density, the phytobiotics had no effect on final weight, but
31 slightly improved the feed conversion ratio. Rearing condition have thus to be taken into
32 account when investigating the impact of phytobiotics in animals growth and physiology.
33 The phytobiotics induced changes in the digestive microbiota higher in the caeca than in crop
34 or ileum. The impact of phytobiotics on microbiota could have contributed to the
35 improvement of chicken growth. A functional analysis is now needed to understand the
36 importance of those changes for chickens' growth.

37

38 **Keywords:** Chicken, plant extract, growth performance, digestive microbiota,

39

40 **1. Introduction:**

41 Antibiotic growth promoters (AGP), are widely used in animal nutrition since the 1950s for
42 the improvements in growth (+3% to +10%), feed consumption, feed efficiency (+3% to
43 +5%) and decrease of mortality (Thomke and Elwinger, 1998). However due to their
44 presumed role in generating bacterial resistance toward antibiotics, and to answer consumer
45 demand and environmental concern, the European Union has ban their use in livestock since
46 beginning 2006, and in several countries poultry industry try to find alternative to these
47 products. Alternative to AGP are thus needed to maintain farm productivity and sustainability.
48 The mode of action of AGP is not fully understood. It is usually assumed that they improve
49 animal growth performance through a reduction of total bacterial load and a modulation of
50 digestive microbiota (Thomke and Elwinger, 1998b), but an impact on the host's immune
51 response may also be implied (Niewold, 2007). Products showing anti-bacterial activity as
52 phytobiotics (compounds derived from plants) are thus potential candidates for replacing AGP
53 (Cowan, 1999; Ceylan 2004). Moreover, natural phytobiotic are composed of several
54 antimicrobial molecules with different biological activities that allow them to interact with a
55 wide range of cellular mechanism making it difficult for bacteria to develop resistance. They
56 are thus widely used as growth enhancer for livestock including poultry.
57 However, phytobiotics' efficiency is highly variable in term of effect on feed conversion ratio
58 (FCR; +3% to -12%) or daily weight gain (DWG; -3% to +8%) (Windisch, et al., 2008). As
59 for AGP, the inconsistency of phytobiotics in promoting growth could be related to rearing
60 conditions which strongly differs between studies. Higher efficiency of antibiotic and non-
61 antibiotic growth promoters are commonly observed in deteriorated housing conditions
62 compared to optimal ones (Orban, et al., 1997; Ravindran, et al., 2006).
63 Moreover, the negative effect of feed additives on growth performance sometimes observed
64 may partly be related to the use of antimicrobial compounds during the first days of birds' life
65 as observed by Baurhoo et al., (2007) with AGP or by Dieumou et al., (2009) with
66 phytobiotics. Antibacterial compound may disturb early bacterial colonization of the digestive
67 tract which can have a negative effect on digestive tract development (Chowdhury et al 2007;
68 Hildebrand *et al.*, 2008).
69 Due to the numerous biological activities of phytobiotics, they could improve animal growth
70 by several mechanisms including antibacterial activities. However, the role of the digestive
71 microbiota on the growth promoting activity of phytobiotics is still not understood. Indeed,

72 the few studies investigating the effect of phytobiotics on microbiota of livestock show a
73 strong discrepancy of results (Brenes and Roura, 2010; Windisch, et al., 2008).

74 The present work was thus carried out to investigate the impact of a phytobiotic blend on
75 chickens' growth performance and digestive microbiota for different rearing conditions
76 commonly applied in industrial husbandry: a low or a high stocking density.

77

78 **2. Materials and methods:**

79 *2.1. Plant extracts and experimental diets*

80 Two types of dietary treatment were used: a control dietary treatment without phytobiotics
81 (control) or an experimental one containing phytobiotics in the finisher and withdrawal diets
82 (PHY). The dietary treatments were four phased diets presented as 2.5 mm pellets: starter
83 from d1 to d10, grower from d10 to d22, finisher from d22 to d32 and withdrawal from d32 to
84 d42 (Table 1).

85 The control dietary treatment was mainly composed of wheat, soybean meal and maize
86 (starter: estimated ME 12,293 kJ/kg, measured CP 227 g/kg; grower: estimated ME 12,493
87 kJ/kg, measured CP 216 g/kg; finisher: estimated ME 12,690 kJ/kg, measured CP 20.7 g/kg;
88 withdrawal: estimated ME 12,991 kJ/kg, measured CP 19.8 g/kg). During the starter, grower
89 and finisher periods, 200 ppm of a coccidiostat (diclazuryl) with limited effects on intestinal
90 microbiota (FDA, 1996) was added. In the PHY dietary treatment, the control dietary
91 treatment was supplemented by 1 g/kg of a natural phytobiotic blend (PHY) from d22 until
92 the end of the experiment (PHY: ENTX®, Phytosynthèse, Riom, France). PHY blend
93 included 1,8 cineol, (E)-cinnamaldehyde, allicin, and diallyl sulfides and was composed of
94 eucalyptus (*Eucalyptus globulus*), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and garlic (*Allium*
95 *sativum*) essential oils (EO) and garlic extract. Those plant extracts are reported to have *in*
96 *vitro* antibacterial activity (Ceylan and Fung, 2004; Cowan, 1999; Smith-Palmer, et al., 1998).

97

98 *2.2. Animals and housing*

99 A total of 1,344 males, White Ross PM3 broilers, vaccinated against infectious bronchitis
100 were obtained from a commercial hatchery (Boye, St Hilaire de Loulay, France). The
101 experiment was performed in an experimental poultry facility at the experimental unit (INRA,
102 Le Magneraud, France), and conducted according to the French specific guidelines related to
103 experimental animals (European Commission, 2010). Birds were reared in pens (2.75 m² of
104 useful area) on wood shavings. The programmed ambient temperature was: 32°C from d1 to

105 d3; and gradual decreased to reach 20°C from d40 until the end of experiment (Guardia et al.,
106 2011). Lighting program was 23 h of light for the d5, 20 h until d11 and 18 h afterwards.
107 Chickens were feed *ad libitum* with the dietary treatments and had free access to water.

108

109 *2.3. Experimental design*

110 One-day-old chickens of similar mean body weight ($44.5 \pm 0.08\text{g}$) were randomly distributed
111 between 32 pens (2.75 m^2). This work was conducted within the framework of a broader
112 scientific research program including 48 pens. Six replicate pens per treatment were used for
113 growth performance measurements and two replicate pens per treatment were used for
114 microbiota analyses. Birds were placed at two stocking density (low and high) as per
115 European Council Directive 2007/43/EC (European Commission, 2007) and were feed with
116 either the control or the PHY dietary treatment. The low stocking density consisted of 12
117 birds/ m^2 equivalent to 33 birds per pen (i.e. $31 \text{ kg}/\text{m}^2$ predicted at d39; Aviagen, 2009)
118 whereas the high stocking density, consisted of 17 birds/ m^2 equivalent to 47 birds per pen (i.e.
119 $43 \text{ kg}/\text{m}^2$ predicted at d39; Aviagen, 2009). In order to balance early mortality, two additional
120 birds were added to each floor pen at the beginning of the experiment. At d10, the lightest and
121 heaviest chickens were removed to reach 33 or 47 birds per pen for low and high stocking
122 density respectively.

123

124 *2.4. Growth Performance Measurement*

125 The mortality was recorded daily. At d1, birds from the same pen were weighed
126 together, and thereafter weighed individually at d10, d24, d32 and d39 with no fasting period.
127 Feed intake was recorded by pen for each growth period. Daily weight gain (DWG) and feed
128 conversion ratio (FCR) were calculated for each period. For DWG calculation, females and
129 dead birds were taken out of the calculation but were included in the FCR calculation.

130

131 *2.5 Sampling for Microbiota Analyses*

132 For microbiota analyses, 20 birds from each dietary treatment and each density level
133 were selected based on their weight when six weeks (d42-d43) old (i.e. ten birds from each of
134 the two floor pens dedicated to microbiota analyses). As specified below, this work was
135 conducted within the framework of a broader scientific research program which for another
136 10 birds was euthanized in the floor pens dedicated to microbial analyses at d22. Sampling
137 was done as described by Guardia et al., (2011). Briefly, crop, distal half of ileum and caeca

138 were immediately collected after bird euthanasia (CO₂ inhalation). The crop was opened
139 longitudinally and the digestive content was collected with a sterile spoon. Digestive contents
140 of the ileum and caeca were collected by gentle pressure along the organ. Samples of five
141 birds were pooled. Four pooled samples for each dietary treatment, each density level and
142 each sampling segment were stored at -80°C until further processing.

143

144 *2.6. Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE) Analysis*

145 DNA was extracted from 200 mg of the pooled samples with the QIAamp DNA Stool
146 Mini Kit (Qiagen Inc., Courtaboeuf, France) as per the manufacturer's recommendations with
147 some modifications as described in Guardia et al., (2011). The fingerprint technique (TTGE)
148 used in this study was described by Seksik, et al. (2003) with minor modifications (Guardia et
149 al., 2011). The primers used for the TTGE analysis were those described by Zoetendal, et al.,
150 (1998) and amplify the variable V6-V8 region of the 16SrRNA gene of Eubacteria (Eurofins
151 Genomics France, Courtaboeuf, France). A TTGE ladder consisting of a PCR amplicon mix
152 (8 cloned rDNA from different bacterial species), obtained from J. Dore and J. P. Furet,
153 (MICALIS, INRA, Jouy en Josas, France) was used to normalize the profiles. Gels were
154 stained using SYBR green, visualized and photographed using the GEL DOC XR system
155 (Bio-Rad Marnes-la-coquette, France). As only 12 samples can be loaded in a single gel, in
156 order to be able to take into account the intensity of band coloration in further gel analyses,
157 samples from birds feed with either the control or the PHY diet were loaded on the same gel,
158 that means for each stocking density and digestive segments (total 6 gels).

159

160 *2.7. Real-time PCR Analysis*

161 DNA for real-time PCR was extracted from 200 mg of the pooled samples with the
162 G'NOME® kit (BIO 101, La Jolla, CA) as per Furet et al. (2009). All bacteria, together with
163 the five major bacterial groups (*Lactobacillus*, *Clostridium leptum*, *C. coccooides*, *Bacteroides*
164 and *Escherichia coli*) were quantified by targeting the 16S rDNA as described in Guardia et
165 al., (2011) using the primers and probe listed in this study. The total copy numbers of the
166 different targeted groups were done as described by Guardia et al., (2011), from 10-fold serial
167 dilutions in water of known concentrations of DNA and used to quantify the copy number of
168 the respective PCR reaction with cycle threshold determined by the second derivative
169 maximum method. Results are presented as number of 16S rDNA copies, with calculations

170 done as Guardia et al., (2011). Numbers of gene copies were expressed per gram of fresh
171 sample and \log_{10} transformed for statistical analysis.

172

173 2.8. Calculations and statistical analyses

174 Statistical analyses on growth performance, real-time PCR and TTGE profiles (for
175 inter pool similarity within dietary treatment) were performed using Statview® software
176 Version 5 (Abacus Concepts, Berkeley, CA). Effect of dietary treatment and stocking density
177 on growth performance and real-time PCR results were analysed by ANOVA with 2 factors
178 using a Student-Newman and Keuls test ($p \leq 0.05$). The impact of the dietary treatment on
179 TTGE profiles for inter pool similarity within a dietary treatment were statistically analysed
180 using a T-test ($p \leq 0.05$). Non-significant differences but with a P-value between 0.05 and 0.10
181 were specified as trends. TTGE gel analysis was conducted using the TIFF files of gel
182 pictures. The TTGE profiles were aligned with Fingerprinting II software (Bio-Rad, Marnes-
183 la coquette, France) using the migration markers. To be able to take into account the intensity
184 of band coloration, all the TTGE analyses were carried between TTGE profiles of samples
185 load in the same gel. For each stocking density and digestive segment, the impact of the
186 dietary treatment on the inter-pool similarity of the microbiota was assessed by calculating the
187 Pearson's coefficient of similarity within each dietary treatment group. The impact of the
188 dietary treatment on the structure of the digestive microbiota was measured for each stocking
189 density and digestive segment using StatFingerprint software Version 1.3 running on R
190 version 2.9 (Michelland, et al., 2009). To assess if the banding patterns were different
191 between dietary treatments a proximity matrix of similarity was constructed by using
192 Pearson's coefficients taking into account band location and intensity. Statistical analysis of
193 similarity (ANOSIM) between band patterns was done using 10,000 Monte Carlo
194 permutations. The ANOSIM-R value indicated the extent to which the groups differed, *i.e.*
195 groups were considered significantly different for $p < 0.05$ and $R > 0.25$ ($R > 0.75$, well-
196 separated groups; $0.50 < R < 0.75$, separated but overlapping groups; $0.25 < R < 0.50$,
197 separated but strongly overlapping groups). These proximity values were also graphically
198 explored by non-metric multidimensional scaling (nMDS) using 10,000 random starts. The
199 extent to which the plot matched the proximity between banding patterns was assessed by the
200 Kruskal's stress.

201 **Table 1.** Composition and nutrient content of control diets (g/kg)

Item	Diets			
	Starter (d1-10)	Grower (d10-22)	Finisher (d22-32)	Withdrawal (d32-42)
Ingredients				
Wheat	370.0	400.0	450.0	500.0
Soybean meal	326.1	284.4	263.3	214.0
Maize	162.0	151.4	194.6	181.5
Pea	60.0	80.0		
Maize gluten meal			8.0	24.0
Soybean oil	46.2	50.0	50.0	50.0
Dicalcium phosphate	16.6	16.0	14.7	12.2
Calcium carbonate	10.3	9.7	10.4	11.0
Sodium chloride	3.0	3.0	3.0	3.0
Mineral-Vitamin mixture ¹	4.0	4.0	4.0	4.0
Lysine-HCL			0.6	
DL-Methionine	1.6	1.3	1.2	0.3
Anticoccidial (diclazuryl) ²	0.2	0.2	0.2	
Calculated nutrient analysis				
Metabolizable Energy (kJ/kg)	12,293	12,493	12,690	12,991
Crude protein	215	202	190	180
Crude fiber	34.4	33.4	30.1	27.9
Fat	65.4	68.5	69.8	69.4
Lysine	11.6	10.7	9.8	8.2
Methionine + cysteine	8.4	7.7	7.5	6.5
Tryptophan	2.6	2.4	2.3	2.1
Threonine	8.0	7.5	6.9	6.5
Calcium	10.0	9.5	9.3	8.7
Available phosphorus	4.2	4.1	3.9	3.5

202 ¹ Supplied per kilogram of diet: Co, 0.4 mg; Cu, 16 mg; Fe, 40 mg; I, 1.6 mg; Mn, 64 mg; Se, 0.2
 203 mg; Zn, 72 mg; retinyl acetate, 12000 IU; cholecalciferol, 3440 IU; DL-alpha tocopheryl acetate,
 204 80 mg; thiamine mononitrate , 4 mg; riboflavin, 6.4 mg; calcium pantothenate, 20 mg;
 205 cyanocobalamin, 0.02 mg; menadione, 4 mg; pyridoxine hydrochloride, 5.6 mg; folic acid, 2.4
 206 mg; biotin, 0.24 mg; niacin, 80 mg; choline chloride, 440 mg; antioxidant
 207 (butylhydroxyanisole, propyl gallat, ethoxyquin) 40 mg

208 ²Clinacox. Jansen Pharmaceutica, Beerse, Belgium

209

210

211

212 **3. Results:**

213 *3.1. Impact of the dietary treatment on the growth performance*

214 The dietary treatment had no impact on chickens' mortality. The stocking density
215 significantly decreased the ADFI during the d32 to d39 periods (Table 2). The PHY diet
216 significantly increased the ADFI during the d24 to d32 and d32 to d39 periods. However, an
217 interaction between dietary treatment and stocking density was observed during the d24 to
218 d32 and d32 to d39 periods, albeit only a tendency ($p < 0.10$). Due to this interaction, the PHY
219 diet enhanced the ADFI at low stocking density only; the ADFI was increased by 5.8% and
220 6.3% during respectively the d24 to d32 and the d32 to d39 rearing periods. Similarly, a
221 significant interaction between dietary treatment and stocking density was observed on the
222 feed intake during the total rearing period. At low stocking density the ADFI was enhanced
223 by 4.8%; by contrast, at high stocking density, the dietary treatment had no effect on the
224 ADFI.

225 Conversely, no interaction between dietary treatment and stocking density was observed on
226 the FCR (table3). The high stocking density significantly increased the FCR during the d24 to
227 d32, the d32 to d39 and the total rearing periods. The PHY diet tended to have a beneficial
228 effect on the FCR during the d24 to d32 period (-1.9%, $p < 0.10$) and had a significant positive
229 effect during the total rearing period (-1.3%). Concerning the DWG, an interaction was
230 observed between the dietary treatment and the stocking density during the d24 to d32, the
231 d32 to d39 and the total rearing periods (table 4). The same was observed for the final weight
232 measured at d39. During the d32 to d39 period, the high stocking density decreased the DWG
233 of the birds receiving the control diet. At low stocking density, the PHY diet enhanced the
234 DWG by 9.4%, 6.9% and 6.3% during respectively the d24 to d32, the d32 to d39 and the
235 total rearing periods. That led to a final body weight 6.1% higher for the PHY group
236 compared to the control one. At high stocking density, the PHY diet had no effect on DWG or
237 final weight.

238

239 *3.2. Impact of the dietary treatment on the digestive microbiota*

240 The TTGE analysis showed an impact of the dietary treatment on the digestive microbiota. At
241 low stocking density, the inter-pool similarity was lower in the crop when birds were fed the
242 PHY treatment (Table 5). The opposite tended to be observed in the caeca ($p < 0.10$). At high
243 density the inter-pool similarity tended to be higher in the crop when birds were fed the PHY
244 treatment ($p < 0.1$).

245 When comparing the structure of TTGE profiles of chickens receiving the control and the
246 PHY diets, an impact of the diet was observed. These effects depended on stocking density
247 and digestive segment (Table 6). At low stocking density, whereas no effect was observed in
248 the upper digestive tract (crop and small intestine), the TTGE profiles of the caeca, were
249 separated according to the diet, albeit slightly overlapping as indicated by the R value
250 ($R=0.68$) (Table 6, Figure1). At high stocking density, whereas no effect was observed at the
251 beginning of the digestive tract (crop), TTGE profiles were separated according to the dietary
252 treatment in the small and lower intestine, with a slight overlap in the ileum and a full
253 separation in the caeca.

254 The dietary treatment had no effect on the total bacteria quantification nor the targeted
255 bacterial groups' quantification (*Lactobacillus*, *Clostridium leptum*, *Clostridium coccooides*,
256 *Bacteroides* and *E.coli* groups), whatever the stocking density or the sample location (data not
257 shown). Thus, a median representation of quantification data for each digestive segment is
258 shown in figure 2. Those results showed a higher bacterial population in caeca (4.5×10^{12}
259 copies of 16S rDNA/g of digestive content) than in crop and ileum (respectively 7.4×10^{11} and
260 2.3×10^{11} copies of 16S rDNA/g of digestive content). In crop and ileum the *Lactobacillus*
261 group was dominant (2.4×10^{11} and 1.1×10^{11} copies of 16S rDNA/g of digestive content
262 respectively), in caeca the *C.coccooides* group was dominant (5.1×10^{11} copies of 16S rDNA/g
263 of digestive content).

264 **Table 2:** Impact of plant extract blend addition in the diet and stocking density on feed intake
 265 of broiler chickens
 266

	Feed intake (g/d/animal) ¹		
	d24-32	d32-39	d1-39
Diet x Density			
Low Density ²			
Control	142.1 ^b	168.7 ^b	95.3 ^b
PHY ⁴	150.4 ^a	179.4 ^a	99.9 ^a
High Density ³			
Control	143.2 ^{ab}	165.4 ^b	95.7 ^b
PHY ⁴	144.6 ^{ab}	166.5 ^b	95.6 ^b
SEM	2.02	2.50	1.11
Diet			
Control	142.7 ^b	167.1 ^b	
PHY ⁴	147.5 ^a	172.9 ^a	
SEM	1.51	2.20	
Density			
Low ²	146.3	174.0 ^a	
High ³	143.9	166.0 ^b	
SEM	1.63	2.04	
P-value			
Diet	0.03	0.03	0.06
Density	0.26	<0.01	0.09
Diet x Density	0.09	0.07	0.05

267

268 a-b For a given parameter, means in the same column with no common superscript differ
 269 significantly (P<0.05)

270 ¹ n=6 floor pen per treatment

271 ²Low density: 12 birds /m²

272 ³High density: 17 birds /m²

273 ⁴PHY diet: control diet with the plant extract blend (1 g/kg) from d22 to d39

274 **Table 3:** Impact of plant extract blend addition in the diet and stocking density on feed
 275 conversion ratio of broiler chickens
 276

	Feed conversion ratio ¹		
	d24-32	d32-39	d1-39
Diet			
Control	1.62	1.95	1.58 ^a
PHY ²	1.59	1.92	1.56 ^b
SEM	0.011	0.020	0.007
Density			
Low ³	1.59 ^b	1.90 ^b	1.56 ^b
High ⁴	1.63 ^a	1.98 ^a	1.58 ^a
SEM	0.011	0.017	0.006
P-value			
Diet	0.07	0.20	0.04
Density	0.02	<0.01	<0.01
Diet x Density	0.97	0.65	0.82

277

278

279 a-b For a given parameter, means in the same column with no common superscript differ
 280 significantly (P<0.05)

281 ²PHY diet: control diet with the plant extract blend (1 g/kg) from d22 to d39

282 ¹ n=6 floor pen per treatment

283 ³Low density: 12 birds /m²

284 ⁴High density: 17 birds /m²

285

286 **Table 4:** Impact of plant extract blend addition in the diet and stocking density on daily
 287 weight gain and final weight of broiler chickens
 288

	Daily weight gain(g/d/animal) ¹			Weight (g) ¹
	d24-32	d32-39	d1-39	d39
Diet x Density				
Low Density ²				
Control	89.6 ^b	91.6 ^b	61.7 ^b	2390 ^b
PHY ⁴	98.0 ^a	97.9 ^a	65.6 ^a	2536 ^a
High Density ³				
Control	88.4 ^b	86.7 ^c	60.9 ^b	2360 ^b
PHY ⁴	91.2 ^b	87.6 ^c	61.5 ^b	2381 ^b
SEM	1.01	1.17	0.57	21.7
P-value				
Diet	<0.0001	<0.01	<0.001	<0.001
Density	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Diet x Density	<0.01	0.02	<0.01	<0.01

289

290 a-b For a given parameter, means in the same column with no common superscript differ
 291 significantly (P<0.05)

292 ¹ For daily weight gain and weight, at d10, n=201per diet at low density and n=274 per diet at
 293 high density; at d 3 , n=180 per diet at low density and n=253 per diet at high density

294 ²Low density: 12 birds /m²

295 ³High density: 17 birds /m²

296 ⁴PHY diet: control diet with the plant extract blend (1 g/kg) from d22 to d39

297 **Table 5** Impact of plant extract blend addition in the diet at low and high stocking density on
 298 similarity of TTGE profiles within each dietary treatment group (Pearson coefficient of
 299 similarity (%))
 300

	Crop ¹	Ileum ¹	Caeca ¹
Low density ²			
Control diet	84.5 ^a	89.2	85.8
PHY ⁴ diet	69.6 ^b	88.4	90.8
SEM	3.92	3.67	1.62
<i>P</i> -value	0.02	0.88	0.06
High density ³			
Control diet	74.2	94.2	92.3
PHY ⁴ diet	87.7	81.7	92.6
SEM	4.85	4.90	0.90
<i>P</i> -value	0.08	0.10	0.81

301
 302 a-b For a given parameter, means in the same column with no common superscript differ
 303 significantly ($P < 0.05$)

304 ¹ For each organ and dietary treatment n=4 pools of 5 birds

305 ²Low density: 12 birds /m²

306 ³High density: 17 birds /m²

307 ⁴PHY diet: control diet with the plant extract blend (1 kg/t) from d22 to d39

308

309 **Table 6:** Impact of phytobiotics addition in the diet¹ at low and high stocking density on the
 310 structure of the chicken digestive microbiota assessed by ANOSIM on a Pearson distance
 311 matrix

Density ²	Crop		Terminal Ileum		Caeca	
	<i>P</i>	R	<i>P</i>	R	<i>P</i>	R
	value	value	value	value	value	value
Low density ³	0.48	-0.02	0.43	0.03	0.03	0.68
High density ⁴	0.44	-0.01	0.03	0.55	0.03	0.92

312 ¹control vs PHY diet (PHY diet = control diet with the plant extract blend blend (1 g/kg) from
 313 d22 to d39)

314 ² For each organ and dietary treatment n=4 pools of 5 birds

315 ³Low density: 12 birds /m²

316 ⁴High density: 17 birds /m²

317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349

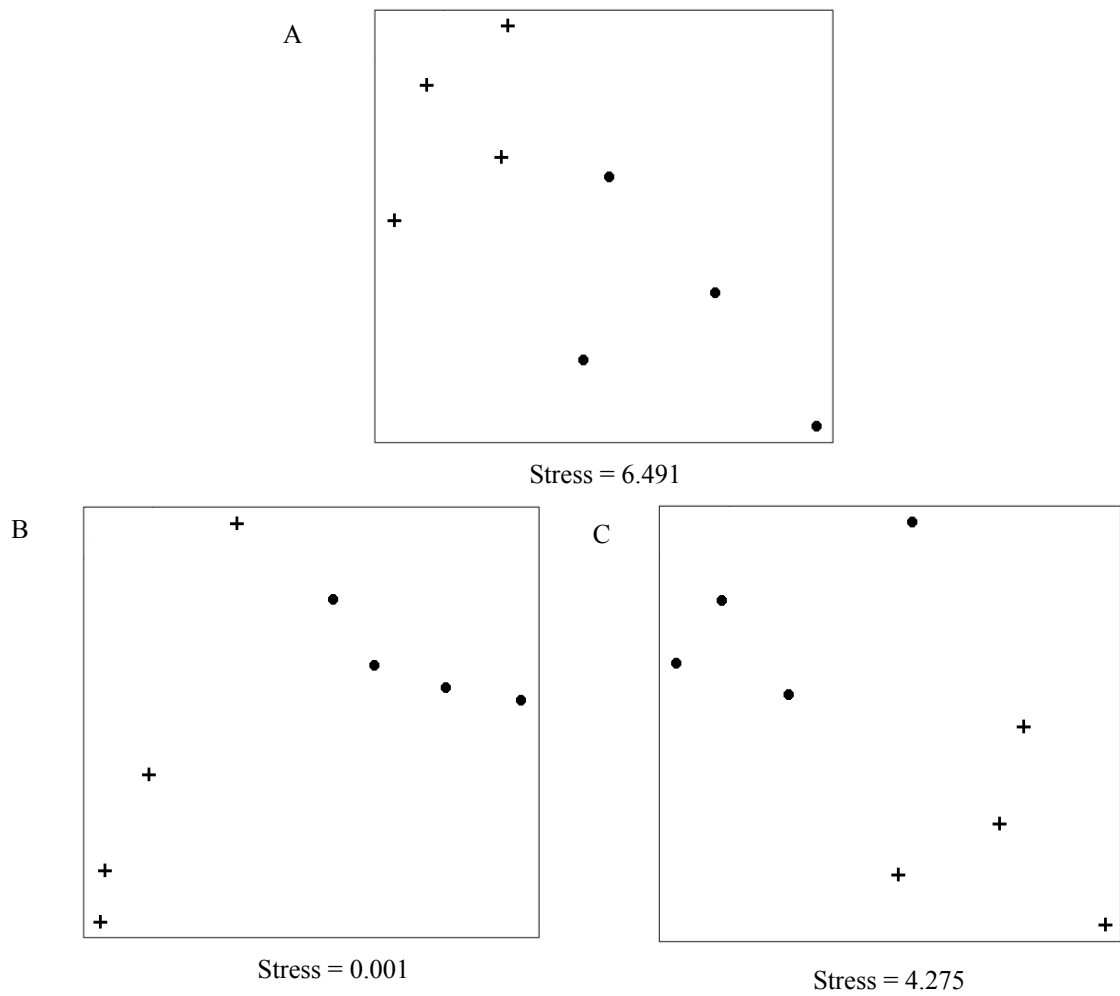


Figure 1 : Two dimensional nMDS plot of the TTGE profiles of control (●) and PHY (+) dietary treatment of A. caeca of birds reared at low stocking density, B. ileum and C. caeca of birds reared at high stocking density done on the proximity index of Pearson (Kruskal's stress obtained for 10000 iterations)

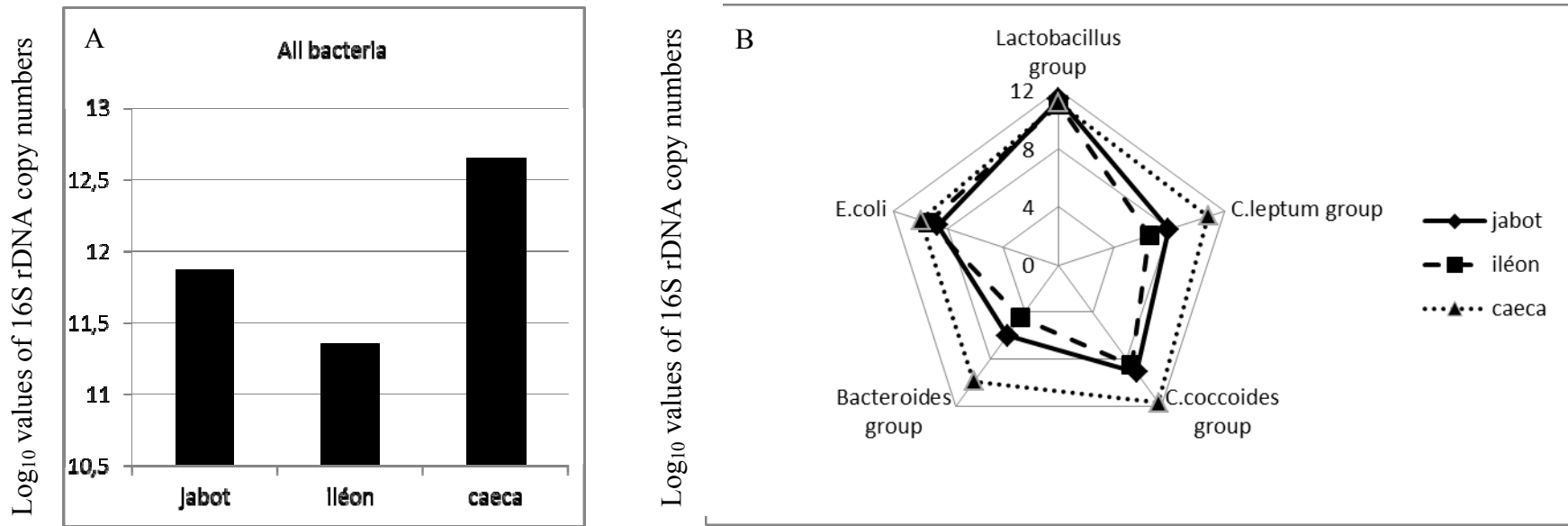


Figure 2 :Real-time PCR quantification of: A, all bacteria and B, major groups of digestive content of chickens in crop, ileum and ceca. Results are given as Log₁₀ values of 16S rDNA copy numbers.

351 **4. Discussion:**

352 *4.1. Impact of the dietary treatment at low stocking density*

353 In low stocking density the PHY diet improve chickens' growth performance during all the
354 rearing period through a strong increase of feed intake and a slight improvement of FCR.
355 Such effect leading to higher growth performance was previously observed with the three
356 components of the phytobiotic blend used in the present study when given to chickens or
357 hens. Cinnamon essential oil can increase broilers feed intake (Al-Kassie, 2009). Garlic,
358 cinnamon and eucalyptus have been reported to be able to improve FCR of broilers chickens
359 or hens (Al-Kassie, 2009; El-Motaal, et al., 2008; Mahmood, et al., 2009; Toghyani et al.,
360 2011). Garlic and cinnamon inclusion in chicken feed can also led to a higher DWG (Al-
361 Kassie, 2009; Lewis, et al., 2003; Mahmood, et al., 2009; Toghyani et al., 2011). However
362 some authors observed no effect of those components on chickens' growth (Kırkpınar et al.,
363 2010; Najafi et Torki, 2010).

364

365 Feed perception is the first mechanism that modulates chickens' feeding behavior. Chickens
366 use vision, touch but also olfaction to explore and chose their feed (Bouvarel et al., 2010).
367 Phytobiotics included in the present study contain pigments and volatiles compounds with
368 strong smell and taste that may be perceived by chickens and that may have direct their
369 feeding behavior. Indeed, recent studies have demonstrated that poultry are able to detect the
370 scent of some phytobiotic components (Jones and Roper, 1997). Moreover, they are able to
371 perceive the taste of some vegetal component as vegetal oils (Furuse, Mabayo and Okumura,
372 1996). In the present work, volatile components as allyl sulfide or cineol can have been
373 perceived by the chickens. Those components can have attractive or repulsive effect on the
374 chickens' feeding behavior, depending on the molecule and their concentration. In the present
375 work, their inclusion in the diet at 1g/kg may have increased the feed appetite and could
376 explain the increase of feed intake.

377 The perception of the PHY blend may also have improved the FCR as feed perception
378 activates gastrointestinal motility, gastric acid and pancreatic enzyme secretion and the
379 release of some gastrointestinal hormones before feed consumption (Katschinski, 2000).
380 Thus, an increase of bile and digestive enzyme secretion had been observed in rats fed with
381 garlic (Platel and Srinivasan, 2004).

382 The slight improvement of FCR observed in this study could also be related to the observed
383 impact of the PHY blend on chicken digestive microbiota and to an impact on digestive

384 physiology. The digestive microbiota can modulate FCR through its impact on nutrient
385 availability (Gabriel et al., 2005) and through hosts-microbiota interactions. Digestive
386 microbiota has in particular a strong impact on host digestive physiology (Chowdury et al.,
387 2007; Dibner et al., 2008). Moreover, an improvement of intestinal structure, as a decrease of
388 crypt depth or an increase of villus height, has been observed in chicken with garlic (Demir, et
389 al., 2005; Abdullah et al., 2010) and may also be observed with cinnamon which contains
390 linalol, a terpene with antiproliferative effect (Loizzo, et al., 2008). Moreover the phytobiotics
391 used in the present work had a broad spectrum of activities including immunomodulatory
392 activities (Spelman et al., 2006). The modulation of chronic immune response could have a
393 positive effect on FCR as the immunity response use nutrient which would be unavailable for
394 growth (Humphrey and Klasing, 2004).

395

396 Concerning the impact of the phytobiotics on the digestive microbiota, an important finding
397 of the present study is that they had an impact on the digestive microbiota which varies
398 according to the digestive segment. A very limited change was observed in the upper
399 digestive tract whereas a major effect was observed in the caeca. *In vivo* studies on livestock
400 suggest that the component of garlic can change the digestive microbiota when added in feed.
401 A decrease of *Staphylococcus* and *Enterobacteria* was observed in the distal part of the
402 digestive tract of chickens fed with garlic, the higher the phytobiotic dosage, the stronger the
403 impact on digestive bacteria (Dieumou, et al., 2009). The garlic also decreased the
404 *Clostridium* count in chickens' intestine (Kirkpınar et al., 2010) and the total bacterial
405 community in cows' rumen (Wanapat, et al., 2008).

406 The higher changes observed on caeca compared to the upper digestive tract could be related
407 to the composition of the microbiota in each organ, the biological fate of phytobiotics, their
408 concentrations and the time of contact between bacteria and phytobiotics or phytobiotic
409 metabolites produced along the digestive tract. The specificities of the microbiota that
410 colonise each organ had probably contributed to the observed changes. Indeed *in vitro*
411 sensibility of digestive bacteria toward phytobiotics used in the EXVa blend differs between
412 bacterial species. For instance cinnamon EO exert a limited anti-bacterial activity toward
413 *Lactobacilli* which is the major bacterial population in crop and ileum (more than 10^{11} copy
414 of 16S rDNA per gram of digestive content in the present study) and a strong antibacterial
415 activity toward *E.coli* which reach high level in caeca (about 10^{10} copy of 16S rDNA per gram
416 of digestive content in the caeca and only 10^9 in crop and ileum) (Si, et al., 2006). In the same

417 way, the minimal inhibitory concentration of garlic EO varies greatly according bacterial
418 species. For instance, it strongly inhibite *Bacteroides fragilis* (MIC: 0.02 to 0.04 mg/ml) and
419 slightly inhibit *Lactobacilus acidophilus* (MIC: 0.17 to 2.75 mg/ml; Ross, et al., 2001). Those
420 two bacterial species belong to bacterial groups that colonize differently the upper and the
421 lower digestive tract, the *Bacteroides* group was about 10^{10} copy of 16S rDNA per gram of
422 digestive content in the caeca, and about 10^6 and less than 10^5 copy of 16S rDNA in the crop
423 and ileum, respectively). The biological fate of phytobiotics could also contribute in the
424 higher modification of caecal microbiota. The fate of phytobiotics is not well known in avian
425 species. Studies in mammals showed that an important part of oral administrated essential oils
426 are rapidly absorbed by the organism before reaching the distal part of the small intestine
427 (Westendarp, 2005; Michiels et al, 2008). This fraction of phytobiotics, for a part undergoes
428 modifications before its elimination by kidneys in urine and for another part is eliminated
429 unmodified in urine (Kohlert, et al., 2002; Sharma et al., 2007). In chicken, urine reaches the
430 caeca by retrograde contractions from cloaca and colon (McWhorter et al., 2009). The active
431 concentration of phytobiotics and phytobiotics metabolites could thus be higher in caeca than
432 in ileum. However, further studies are needed to understand the fate of the phytobiotics used
433 in the present studies as it depend in several factors as phytobiotics' dose (Kohlert et al 2002)
434 and feed composition (Koppel et al 1988) and because differences can occur between
435 mammals and birds physiology (Toutain, 2010). The time of contact between bacteria and
436 phytobiotics could modulate their impact on digestive microbiota according to location as
437 retention time in the upper part of digestive tract could be relatively short compared to the
438 caeca. The feed can stay in crop up to 4 hours, and in small intestine retention time can be
439 about one hour (Sklan, et al., 1975). By contrast, in in the caeca the washout occurs only
440 twice a day, thus the duration of contact in this organ can be longer than in the upper digestive
441 tract (Duke, et al., 1980).

442 The modification of microbiota observed in the caeca ant to a lesser extent in the upper
443 digestive tract could be related to the antibacterial activity of the components present in the
444 phytobiotic blend. Several *in vitro* studies had shown the antibacterial properties of
445 eucalyptus cinnamon and garlic extracts, essential oils or major components on bacteria
446 present in the digestive tract (Smith-Palmer, et al., 1998, Ross et al., 2001; Si et al., 2006).

447
448
449

450 *4.2. Impact of the dietary treatment at high stocking density*

451 By contrast to the low stocking density, in high stocking density, the PHY diet had no impact
452 on chickens' feed intake, but slightly increase the FCR during the overall rearing period. The
453 absence of effect of the PHY on feed intake at high density, whereas an increased
454 consumption was observed at low density may be due to the exposition of the bird to aerial
455 contaminant as NH₃ or dust particle (Al Homidan and Robertson, 2003, Banhazi, et al. 2008,)
456 that may disturb olfaction, either by masking smell detection, or desensitize olfactory
457 receptors (Wathes, 1998).

458 The lesser feeding space allowance in high stocking density could also have prevented the
459 increased feed intake of the PHY diet. Indeed, at low stocking density, the feed intake was
460 increased by 6% in the PHY group. It can be assumed that the birds spent 6% more time at the
461 feeders. In high stocking density compared to low density, 42% more birds were reared. It is
462 thus possible that the feeding space allowance was too small to enable those 42%
463 supplementary birds to increase their feed intake by 6%, *i.e.* to make the feeders used 51%
464 longer by the PHY group at high stocking density than by the control group at low stocking
465 density.

466

467 It is worthy to notice that, in high stocking density, despite no effect on growth, the PHY diet
468 induced changes in digestive microbiota, and these effects were more important in higher
469 density than in lower one. The impact of the PHY diet on digestive microbiota was different
470 according to stocking density: in high density an impact was observed in ileum absent at low
471 density, and the impact on caecal microbiota was stronger. This could be related to the
472 composition of microbiota when the PHY are given to the birds; the microbiota is indeed
473 different between low and high density at 3 weeks of rearing (Guardia et al., 2011). Those
474 differences could also be due to the oxidative stress that can be induced by increased stocking
475 densities (Simsek et al., 2009). Indeed, oxidative stress can impair the epithelial barrier and
476 increase the intestinal barrier permeability (John et al., 2011). That could make easier to the
477 phytobiotics to pass through the epithelial barrier and thus increase their elimination by
478 kidneys in urine and their concentration in the caecal content.

479

480 A disassociation between impact on growth performance and bacterial composition was
481 observed when comparing the two stocking densities. At low density, the PHY blend strongly
482 increased feed intake, slightly improved FCR and changed microbiota. At high stocking

483 density, the PHY blend also slightly improve the FCR, but by contrast to low stocking
484 density, it had no impact on feed intake and it strongly change the digestive microbiota. In
485 complex microbiota, as digestive ones, several bacterial species may assume the same
486 function. Thus, changes can occurs in the bacterial species that compose the microbiota
487 without changing the microbiota functioning. That could explain why, for a same
488 improvement of FCR, the extent of the changes observed in digestive microbiota was not the
489 same at both density.

490

491 The phytobiotic blend used in this study allowed improving chickens' growth performances
492 when reared at low stocking density, but hat a limited impact on zootechnical performances
493 when reared at high stocking density. However in intensive farming, broilers are reared in a
494 broad range of stocking density. Thus, it should be useful to develop a phytobiotic blend
495 improving the growth performances in a wide range of stocking densities.

496

497 **4. Acknowledgments**

498 The authors would like to thank: the technical staff of the experimental unit, particularly
499 P.Rousseau (INRA, UE1206, Le Magneraud, France) for rearing the birds and for the
500 assistance provided during sample collection; M. Leconte (INRA, Nouzilly, France) for
501 laboratory analyses; P. Limouzin (I.U.T. de Tours, Laboratoire de microbiologie, Tours,
502 France) for assistance with bacterial cultivation; J. Dore and JP Furet for providing the TTGE
503 ladders (MICALIS, INRA, Jouy en Josas, France); M.J. Duclos and A. Brionne (INRA,
504 Nouzilly, France) for helpful advice relating to real-time PCR analysis and R. Michelland
505 (INRA, Toulouse, France) for helpful advice in gel pattern analysis. This work was supported
506 by French regional grants (Region Centre, France) and by Phytosynthèse (Riom, France).

507

508 **5. References:**

509 (2010). European comission, Directive 2010/63/UE du parlement européen et du conseil du
510 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques,
511 official journal of european union: l276/233-279.

512 Abdullah Abdullah Y., Mahmoud Kamel Z., Nusairat Basheer M., Qudsieh Rasha I., 2010.
513 Small intestinal histology, production parameters, and meat quality as influenced by

514 dietary supplementation of garlic (*Allium sativum*) in broiler chicks. Italian journal of
515 animal science, 9, 4, 414-419.

516 Al Homidan, A, Robertson, J.F., 2003. Effect of litter type and stocking density on ammonia,
517 dust concentrations and broiler performance. British Poultry Science, 44, 1, S7-S8

518 Al-Kassie, G. A. M., 2009. "Influence of two plant extracts derived from thyme and cinnamon
519 on broiler performance." Pakistan Veterinary Journal 29(4): 169-173.

520 Aviagen. 2009. "Ross PM3 broiler performance objectives." Retrieved 05/05/2010, 2010,
521 from
522 [http://www.aviagen.com/ss/assets/Tech_Center/Ross_Broiler/Ross_PM3_Broiler_Perf](http://www.aviagen.com/ss/assets/Tech_Center/Ross_Broiler/Ross_PM3_Broiler_Performance_Objectives.pdf)
523 [ormance_Objectives.pdf](http://www.aviagen.com/ss/assets/Tech_Center/Ross_Broiler/Ross_PM3_Broiler_Performance_Objectives.pdf).

524 Banhazi, T.M. ; Seedorf, J. ; Laffrique, M. ; Rutley, D. L., 2008. Identification of the risk
525 factors for high airborne particle concentrations in broiler buildings using statistical
526 modeling. Biosystems Engineering, 101, 1, 100-110.

527 Baurhoo B, Letellier A, Zhao X, Ruiz-Feria CA., 2007. Cecal populations of lactobacilli and
528 bifidobacteria and Escherichia coli populations after in vivo Escherichia coli challenge
529 in birds fed diets with purified lignin or mannanoligosaccharides. Poult Sci.
530 Dec;86(12):2509-16

531 Bouvarel, I., Tesseraud, S., Letterier, C., 2010. L'ingestion chez le poulet de chair :
532 n'oublions pas les régulations à court terme. INRA Productions Animales, 23, 5, 391-
533 404.

534 Brenes, A. and E. Roura, 2010. "Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of
535 action." Animal Feed Science and Technology 158(1-2): 1-14.

536 Ceylan, E. and D. Y. C. Fung, 2004. "Antimicrobial activity of spices." Journal of Rapid
537 Methods and Automation in Microbiology 12: 1-55.

538 Chowdhury, S. R., D. E. King, et al., 2007. "Transcriptome profiling of the small intestinal
539 epithelium in germfree versus conventional piglets." BCM Genomics Jul 5;8:215.

540 Cowan, M. M., 1999. "Plant products as antimicrobial agents." Clinical Microbiology
541 Reviews 12(4): 564-582.

542 Demir, E., E. Sarica, et al., 2005. "The use of natural feed additives as alternative to an
543 antibiotic growth promoter in broiler diets." Archiv fur Geflugelkunde 69(3): 110-116.

544 Dibner, J. J., J. D. Richards, et al., 2008. "Microbial Imprinting in Gut Development and
545 Health." Journal of Applied Poultry Research 17(1): 174-188.

546 Dieumou, F. E., A. Tegua, et al., 2009. "Effects of ginger (*Zingiber officinale*) and garlic
547 (*Allium sativum*) essential oils on growth performance and gut microbial population
548 of broiler chickens." *Livestock research for rural development* 21(8): 131.

549 Duke, G. E., O. A. Evanson, et al., 1980. "Electrical potential changes and contractile activity
550 of the distal cecum of turkeys." *Poultry Science* 59(8): 1925-1934.

551 El-Motaal, A. M. A., A. M. H. Ahmed, et al., 2008. "Productive performance and
552 immunocompetence of commercial laying hens given diets supplemented with
553 *Eucalyptus*." *International Journal of Poultry science* 7(5): 445-449.

554 European Commission, 2007. "Council directive 2007/43/EC of 28 June 2007 laying down
555 minimum rules for the protection of chickens kept for meat production." *Official*
556 *Journal of the European Union*, 12 july 2007: L 182/119-128.

557 FDA, 1996. "Environmental assesment for Clinacox™ Type A Medicated Article for Chicken
558 and Turkey (Diclazuril), NADA number 140-951."

559 Furet, J. P., O. Firmesse, et al. , 2009. "Comparative assessment of human and farm animal
560 faecal microbiota using real-time quantitative PCR." *FEMS Microbiology Ecology*
561 68(3): 351-362.

562 Furuse, M., Mabayo, T. and Okumura, J. –I. 1996. "The role of gustation in oil preference in
563 chicken". *Japanese poultry science* 33(4):256-260.

564 Gabriel, I., S. Mallet, et al., 2005,. "La microflore digestive des volailles: facteurs de variation
565 et conséquences pour l'animal." *Productions animales* 18(5): 309-322.

566 Guardia, S., B. Konsack, et al., 2011. "Effect of stocking density on growth performance and
567 digestive microbiota of broilers chickens." *Poultry Science* in press.

568 Hildebrand, H., P. Malmberg, et al., 2008. "Early-life exposures associated with antibiotic use
569 and risk of subsequent Crohn's disease." *Scandinavian Journal of Gastroenterology*
570 43(8): 961-966.

571 Humphrey, B.D., Klasing, K.C., 2004. Modulation of nutrient metabolism and homeostasis by
572 the immune system. *Worlds Poult. Sci. J.* 60, 90-100. Jones, R. B. and T. J. Roper ,
573 1997. "Olfaction in the domestic fowl: A critical review." *Physiology & Behavior*
574 62(5): 1009-1018.

575 John LJ, Fromm M, Schulzke JD. ,2011. Epithelial barriers in intestinal inflammation.
576 *Antioxid Redox Signal.* 15(5):1255-70

577 Katschinski, M. ,2000. "Nutritional implications of cephalic phase gastrointestinal responses."
578 *Appetite* 34(2): 189-196.

579 Kirkpinar, F., Unlu H. B.; Ozdemir G., 2010. Title: Effects of oregano and garlic essential oils
580 on performance, carcass, organ and blood characteristics and intestinal microflora of
581 broilers. *Livestock Science*, 137, 1-3, 619.

582 Klasing, K. C., 1998. *Anatomy and physiology of the digestive system. Comparative avian*
583 *nutrition*. K. C. Klasing. Wallingford, UK, CAB International.

584 Kohlert C., Schindler G., Marz R.W., Abel G., Brinkhaus B., Derendorf H., Grafe E. U. Veit
585 M., 2002. Systemic availability and pharmacokinetics of thymol in humans. *Journal of*
586 *Clinical Pharmacology*, 42, 7, 731-737.

587 Koppel, C., F. Martens, et al., 1988. "Hemoperfusion in Acute Camphor Poisoning." *Intensive*
588 *Care Medicine* 14(4): 431-433.

589 Loizzo, M. R., R. Tundis, et al., 2008. "Antiproliferative effects of essential oils and their
590 major constituents in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells."
591 *Cell Proliferation* 41: 1002–1012

592 Lewis, M. R., S. P. Rose, et al., 2003. "Effects of dietary inclusion of plant extracts on the
593 growth performance of male broiler chickens." *British poultry science* 44(1): S43-S44.

594 Mahmood, S., M. Mushtaq-Ul-Hassan, et al., 2009. "Comparative Efficacy of *Nigella sativa*
595 and *Allium sativum* as Growth Promoters in Broilers." *International Journal of*
596 *Agriculture and Biology* 11(6): 775-778.

597 McWhorter, T. J., E. Caviedes-Vidal, et al., 2009. "The integration of digestion and
598 osmoregulation in the avian gut." *Biological Reviews* 84(4): 533-565.

599 Michiels J., Missotten J., Dierick N., Fremaut D., Maene P., De Smet S., 2008. In vitro
600 degradation and in vivo passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans-
601 cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets. *Journal of the Science of*
602 *Agriculture*, 88, 13, 2371-2381

603 Najafi P.; Toriki M. Performance, 2010. Blood Metabolites and Immunocompetence of
604 Broiler Chicks Fed Diets Included Essential Oils of Medicinal Herbs. *Journal of*
605 *animal and veterinary advances*, 9, 7, 1164-1168.

606 Niewold, T.A., 2007. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth
607 promoters, the real mode of action? A hypothesis. *Poultry science*, 86, 4, 605-609..

608 Orban, J. I., J. A. Patterson, et al., 1997. "Effect of sucrose thermal oligosaccharide caramel,
609 dietary vitamin-mineral level, and brooding temperature on growth and intestinal
610 bacterial populations of broiler chickens." *Poultry Science* 76(3): 482-490.

611 Platel, K. and K. Srinivasan, 2004. "Digestive stimulant action of spices : A myth or reality?"
612 Indian Journal of Medical Research 119(5): 167-179.

613 Ravindran, V., D. V. Thomas, et al., 2006. "Performance and welfare of broilers as affected
614 by stocking density and zinc bacitracin supplementation." *Animal Science Journal*
615 77(1): 110-116.

616 Ross, Z. M., E. A. O'Gara, et al., 2001. "Antimicrobial properties of garlic oil against human
617 enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides
618 and garlic powder." *Applied and environmental microbiology* 67(1): 475-480.

619 Seksik, P., L. Rigottier-Gois, et al., 2003. "Alterations of the dominant faecal bacterial groups
620 in patients with Crohn's disease of the colon." *Gut* 52: 237-242.

621 Sharma R.A., Steward W. P., Gescher A. J., 2007. Pharmacokinetics and pharmacodynamics
622 of curcumin. *Advances in experimental Medecine and Biology*, 595, 453-470

623 Si, W., J. Gong, et al., 2006. "Antimicrobial activity of essential oils and structurally related
624 synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria."
625 *Journal of Applied Microbiology* 100(2): 296-305.

626 Simsek, U. G., B. Dalkilic, et al., 2009. "The influences of different stocking densities on
627 some welfare indicators, lipid peroxidation (MDA) and antioxidant enzyme activities
628 (GSH, GSH-Px, CAT) in broiler chickens." *Journal of Animal and Veterinary*
629 *Advances* 8(8): 1568-1572.

630 Sklan, D., D. Dubrov, et al., 1975. "⁵¹Cr-EDTA, ⁹¹Y and ¹⁴¹Ce as Nonabsorbed Reference
631 Substances in the Gastrointestinal Tract of the Chicken." *The Journal of Nutrition* 105:
632 1549-1552.

633 Smith-Palmer, A., J. Stewart, et al., 1998. "Antimicrobial properties of plant essential oils and
634 essences against five important food-borne pathogens." *Letters in Applied*
635 *Microbiology* 26(2): 118-122.

636 Spelman, K., J. J. Burns, et al., 2006. "Modulation of cytokine expression by traditional
637 medicines: a review of herbal immunomodulators." *Alternative Medicine Review*
638 11(2): 128-150.

639 Thomke, S. and K. Elwinger, 1998. "Growth promotants in feeding pigs and poultry. I.
640 Growth and feed efficiency responses to antibiotic growth promotants." *Annales de*
641 *zootechnie* 47(2): 85-97.

642 Toghyani, M., Toghyani, M., Gheisari, A., Ghalamkari, G., Eghbalsaied, S., 2011. Evaluation
643 of cinnamon and garlic as antibiotic growth promoter substitutions on performance,

644 immune responses, serum biochemical and haematological parameters in broiler
645 chicks. *Journal of Livestock Science*, 138, 1, 167-173.

646 Toutain P. -L., Ferran A., Bousquet-Melou A., 2010. Species differences in pharmacokinetics
647 and pharmacodynamics. *Handbook of experimental pharmacology*, 199, 19-48.

648 Wanapat, M., P. Khejornsart, et al., 2008. "Effect of supplementation of garlic powder on
649 rumen ecology and digestibility of nutrients in ruminants." *Journal of the Science of*
650 *Food and Agriculture* 88(13): 2231-2237.

651 Wathes, C. M., 1998. "Aerial emissions from poultry production." *World's Poultry Science*
652 *Journal* 54:241-51.

653 Westendarp H., 2006. Einsatz und wirkung phyto gener futterzusatzstoffe beim geflugel.
654 *Ubersichten zur Tierernahrung*, 34, 1, 1-26.

655 Windisch, W. M., K. Schedle, et al., 2008. "Use of phytogenic products as feed additives for
656 swine and poultry." *Journal of Animal Science* 86(Suppl 14): E140-148.

657 Zoetendal, E. G., A. D. L. Akkermans, et al., 1998. "Temperature gradient gel electrophoresis
658 analysis of 16S RNA from human faecal samples reveals stable and host-specific
659 communities of actives bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3854-
660 3859.

661

2.2.1.2. Résultats complémentaires

Suite à l'analyse des profils obtenus par TTGE, nous avons excisé les bandes dont l'intensité était visuellement modifiée par le traitement Exp1 en comparaison du traitement témoin. Ces bandes ont ensuite été purifiées puis séquencées dans le but de procéder à leur identification (voir partie 2, chapitre 2.3.2).

Trois bandes ont présenté des variations d'intensité et ont été excisées (Tableau 23). L'intensité de la bande A, détectée dans le jabot des animaux élevés en basse densité, était réduite par le traitement Exp1, de même que celle de la bande B détectée dans l'iléon des animaux élevés en forte densité. L'intensité de la bande C détectée dans les caeca des animaux élevés en forte densité était plus forte avec le traitement Exp2. Les bandes A et C n'ont pas pu être purifiées avec succès. La bande B présentait 98% d'homologie avec plusieurs bactéries de la famille des Enterobacteriaceae, notamment avec *Escherichia coli*.

Tableau 23 : Identification des bandes de profil TTGE présentant une variation d'intensité en fonction du traitement alimentaire (témoin ou Exp1)

Segment digestif	Densité normale (12 animaux/m ²)				Densité élevée (17 animaux/m ²)			
	Bande		contrôle	Exp1	Identification bande		contrôle	Exp1
Jabot	Bande A	Intensité	+++	+	∅			
		Identification	Bande contaminée					
Iléon	∅				Bande B	Intensité	+++	++
						Identification	Enterobacteriaceae	
Caeca	∅				Bande C	Intensité	+	+++
						Identification	Bande contaminée	

∅ : aucune bande ne présentait visuellement de variation d'intensité entre traitement

+ : Intensité faible

++ : Intensité moyenne

+++ : Intensité forte

2.2.2. Effet d'un programme alimentaire commercial basé sur l'utilisation d'un mélange de phytobiotiques aux propriétés antioxydantes et immunomodulatrices suivi d'un mélange aux propriétés antibactériennes

2.2.2.1. Effet d'un programme alimentaire contenant deux mélanges de phytobiotiques et des conditions d'élevage sur les performances de croissances et le microbiote digestif du poulet

Cet article est en cours de rédaction en vue d'une publication dans *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*

1 **Effect of a feeding program containing two phytobiotic blends on growth performance**
2 **and digestive microbiota of broiler chickens according to housing conditions**

3 S. Guardia^{*}, B. Konsak^{*}, S. Combes^{†‡§}, F. Levenez[#], L. Cauquil^{†‡§}, J. -F. Guillot^{||}, M.
4 Leconte^{*}, C. Moreau-Vauzelle[¶], M. Lessire^{*}, H. Juin[¶], I. Gabriel^{*1}

5
6 ^{*}INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France

7 [†]INRA, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326
8 Castanet-Tolosan, France

9 [‡]Université de Toulouse, INPT ENSAT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion
10 Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

11 [§]ENVT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-
12 31076 Toulouse, France

13 [#]INRA, UMR1319 Micalis, F-78352 Jouy En Josas, France

14 ^{||}I.U.T. DE TOURS, Laboratoire de microbiologie, 29 rue du Pont-Volant, F-37082 Tours,
15 France

16 [¶]INRA, UE1206 Elevage alternatif et santé des monogastriques, Le Magneraud, F-17700
17 Saint-Pierre-d'Amilly, France

18

19 **Abstract**

20 Feeding programs containing phytobiotics are commonly included in the diet of poultry.
21 However their efficiency for improving growth performance or to secure digestive microbiota
22 is inconstant. Rearing condition can alter the efficiency of several growth promoters given to
23 chickens and have a strong impact on digestive microbiota balance. This could contribute to
24 the inconsistency of phytobiotics efficiency reported by literature. The present study was thus
25 carried-out to investigate the impact of a feeding program containing a sequence of
26 phytobiotic blends on the growth performance and the digestive microbiota of broiler reared
27 at low (12 birds/m²) or high (17 birds/m²). The phytobiotics-based rearing program improved
28 the growth performance of chickens leading to a final body weight (d39) 5% and 2% higher at
29 low and high stocking density respectively. This improvement was due to an increase of feed
30 intake and a decrease of feed conversion ratio when chickens were fed the phytobiotics-based
31 program compared to the control one. The phytobiotics had also an impact on chickens'
32 digestive microbiota. Those changes could partly explain the growth promoting effect of the
33 phytobiotics used in the present study. However, several others mechanisms could be
34 involved.

35

36

37 **Keywords:** Chicken, plant extract, growth performance, digestive microbiota,

38

39

40 **Introduction**

41 Numerous feeding programs containing phytobiotics are currently used by chickens' breeders
42 to replace antibiotics as growth factors and to secure chickens' digestive microbiota balance.
43 However, despite manufacturer claims, scientific studies underline a high variability on
44 phytobiotics efficiency in terms of improvement of growth performance (feed conversion
45 ratio: +3% to -12%; daily weight gain: -3% to +8%) or impact on digestive microbiota
46 (Brenes and Roura, 2010; Windisch, et al., 2008).

47 Those results could partly be related to the different rearing conditions which strongly differ
48 between studies. Indeed, higher efficiency of antibiotic and non-antibiotic growth promoters
49 are commonly observed in deteriorated environmental conditions (increased temperature,
50 stocking density or sanitary pressure) compared to optimal ones (Orban, et al., 1997; Lee et
51 al., 2004; Ravindran, et al., 2006). However the literature data on the impact of sanitary
52 pressure and housing conditions on phytobiotic-based feeding programs efficiency are scarce
53 and concern only few phytobiotic blends (Allen et al., 1997; Lee et al., 2004; Guardia et al.,
54 2011b).

55 Moreover, as housing condition have strong impacts on digestive microbiota balance (Shane,
56 2000; Burkholder et al., 2008; Guardia et al., 2011a), they could also modulate the impact of
57 phytobiotics blends on chicken digestive microbiota.

58 As chickens extensively reared may experience various environmental conditions as large
59 range of stocking densities or housing temperatures, it is critical to understand the impact of
60 such factors on the efficiency of phytobiotics.

61 The present work was thus carried out to investigate the impact of a phytobiotic-based feeding
62 program on chickens' growth performance and digestive microbiota when reared in different
63 housing conditions (low or high stocking density).

64

65 **Materials and methods:**

66 *Plant extracts and experimental diets*

67 Two types of dietary treatment were used: a control dietary treatment without phytobiotics
68 (control) or a commercial feeding program containing phytobiotics (PHY).

69 The control dietary treatment was mainly composed of wheat, soybean meal and maize. Four
70 diets were given to the chickens, a starter diet during the d1 to d10 period (estimated ME
71 12,293 kJ/kg kcal/kg, measured CP 227g/kg), a grower diet during the d10 to d22 period
72 (estimated ME 12,493 kJ/kg, measured CP 216g/kg), a finisher diet during the d22 to d32

73 period (estimated ME 12,690 kJ/kg, measured CP 20.7g/kg) and a withdrawal diet during the
74 d32 to d42 period (estimated ME 12,991 kJ/kg, measured CP 19.8g/kg ; Table 1). During the
75 starter, grower and finisher periods, 200 ppm of a coccidiostat (diclazuryl) with limited effects
76 on intestinal microbiota (FDA, 1996) was added. The dietary treatments were presented as 2.5
77 mm pellets.

78 The PHY dietary treatment consisted in the control diet supplemented by 0.3 g/kg of a natural
79 phytobiotic blend (Immunostart: Immunostart®, Phytosynthèse, Riom, France) in the starter
80 diet, by 0.8 g/kg of a second natural phytobiotic blend (ENTX: ENTX®, Phytosynthèse,
81 Riom, France) in the grower diet and by 1 g/kg of ENTX in the finisher and withdrawal diets.

82 The Immunostart blend included uncarines, eleutherosides, curcumine,
83 bisdemethoxycurcumine, demethoxycurcumine, catechins, proanthocyanidins and naringin
84 and was composed of extract of uncaria (*Uncaria tomentosa*), eleutherococcus
85 (*Eleutherococcus senticosus*), curcuma (*Curcuma longa*), grape seed (*Vitis vinifera*) and
86 naringin (extracted from grapefruit mesocarp, *Citrus paradisi*). Those plant extract can
87 modulate immunity and have antioxidant activity (Cavia-Saiz, et al., 2010; Deyama et al.,
88 2001; Epstein, et al., 2010; Heitzman, et al., 2005; Nassiri-Asl and Hosseinzadeh, 2009). The
89 ENTX blend included 1,8 cineol, (E)-cinnamaldehyde, allicin, and diallyl sulfides and was
90 composed of eucalyptus (*Eucalyptus globulus*), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and
91 garlic (*Allium sativum*) essential oils and garlic extract. Those plant extracts are reported to
92 have in vitro antibacterial activity (Ceylan and Fung, 2004; Cowan, 1999; Smith-Palmer, et
93 al., 1998).

94

95 *Animals and housing*

96 A total of 1,344 males, White Ross PM3 broilers, vaccinated against infectious bronchitis
97 were obtained from a commercial hatchery (Boye, St Hilaire de Loulay, France). The
98 experiment was performed the experimental poultry facility of INRA, Le Magneraud
99 (France), and conducted according to the French specific guidelines related to experimental
100 animals (European Commission, 2010). Birds were reared on wood shavings in pens (2.75 m²
101 of useful area). The programmed ambient temperature was 32°C from d1 to d3; and gradually
102 decreased to reach 20°C from d40 until the end of experiment (Guardia et al., 2011a).
103 Lighting program was 23 h of light for d5, 20 h until d11 and 18 h afterwards. Chickens were
104 feed *ad libitum* with the dietary treatments and had free access to water.

105

106 *Experimental design*

107 One-day-old chickens of similar mean body weight (44.5 ± 0.01 g) were randomly distributed
108 between 32 pens (2.75 m^2). Six replicate pens per treatment were used for growth
109 performance measurements and two replicate pens per treatment were used for microbiota
110 analyses. Birds were placed at two stocking density (low and high) as per European Council
111 Directive 2007/43/EC (European Commission, 2007) and were feed with either the control or
112 the PHY dietary treatment. The low stocking density consisted of 12 birds/ m^2 equivalent to 33
113 birds per pen (i.e. $31 \text{ kg}/\text{m}^2$ predicted at d39; Aviagen, 2009) whereas the high stocking
114 density, consisted of 17 birds/ m^2 equivalent to 47 birds per pen (i.e. $43 \text{ kg}/\text{m}^2$ predicted at
115 d39; Aviagen, 2009). In order to balance early mortality, two additional birds were added to
116 each floor pen at the beginning of the experiment. At d10, the lightest and heaviest chickens
117 were removed to reach 33 or 47 birds per pen for low and high stocking density respectively.
118

119 *Growth Performance Measurement*

120 The mortality was recorded daily. At d1, birds from the same pen were weighed
121 together, and thereafter weighed individually at d10, d24, d32 and d39 with no fasting period.
122 Feed intake was recorded by pen for each growth period. Daily weight gain (DWG) and feed
123 conversion ratio (FCR) were calculated for each period. For DWG calculation, females and
124 dead birds were taken out of the calculation but were included in the FCR calculation.
125

126 *Sampling for Microbiota Analyses*

127 For microbiota analyses, 20 birds from each dietary treatment and each density level
128 were selected based on their weight when six weeks (d42-d43) old and sampling was done as
129 described by Guardia et al., (2011a and 2011b). Digestive contents of crop, distal half of
130 ileum and caeca were immediately collected after bird euthanasia (CO_2 inhalation). Four
131 pooled samples from five chickens were done for each dietary treatment, each density level
132 and each sampling segment. They were stored at -80°C until further processing.
133

134 *Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE) Analysis*

135 DNA was extracted from 200 mg of the pooled samples with the QIAamp DNA Stool
136 Mini Kit (Qiagen Inc., Courtaboeuf, France) as per the manufacturer's recommendations with
137 some modifications described in Guardia et al., (2011a). The fingerprint technique (TTGE)
138 used in this study was described by Seksik, et al. (2003) with minor modifications (Guardia et

139 al., 2011a). The primers used for the TTGE analysis were those described by Zoetendal, et al.,
140 (1998) and amplify the variable V6-V8 region of the 16SrRNA gene of Eubacteria (Eurofins
141 Genomics France, Courtaboeuf, France). As only 12 samples can be loaded in a single gel,
142 samples from birds feed with either the control or the PHY diet were loaded on the same gel,
143 that means for each stocking density and digestive segments (total 6 gels).

144

145 *Real-time PCR Analysis*

146 DNA for real-time PCR was extracted from 200 mg of the pooled samples with the
147 G'NOME® kit (BIO 101, La Jolla, CA) as per Furet et al. (2009). All bacteria, together with
148 the five major bacterial groups (*Lactobacillus*, *Clostridium leptum*, *C. coccoides*, *Bacteroides*
149 and *Escherichia coli*) were quantified by targeting the 16S rDNA as described in Guardia et
150 al., (2011a) using the primers, probe and methods described in this study.

151

152 *Calculations and statistical analyses*

153 Statistical analyses on growth performance, real-time PCR and TTGE profiles (for
154 inter pool similarity within dietary treatment) were performed using Statview® software
155 Version 5 (Abacus Concepts, Berkeley, CA). Effect of dietary treatment and stocking density
156 on growth performance and real-time PCR results were analysed by ANOVA with 2 factors
157 using a Student-Newman and Keuls test ($p \leq 0.05$). The impact of the dietary treatment on inter
158 pool similarity of TTGE profiles within a dietary treatment were statistically analysed using a
159 T-test ($p \leq 0.05$). Non-significant differences but with a P-value between 0.05 and 0.10 were
160 specified as trends. TTGE gel analysis was conducted using the TIFF files of gel pictures. The
161 TTGE profiles were aligned with Fingerprinting II software (Bio-Rad, Marnes-la coquette,
162 France) using the migration markers. All the TTGE analyses were carried between TTGE
163 profiles of samples load in the same gel. For each stocking density and digestive segment, the
164 impact of the dietary treatment on the inter-pool similarity of the microbiota was assessed by
165 calculating the Pearson's coefficient of similarity within each dietary treatment group. The
166 impact of the dietary treatment on the structure of the digestive microbiota was measured for
167 each stocking density and digestive segment using StatFingerprint software Version 1.3
168 running on R version 2.9 (Michelland, et al., 2009). To assess if the banding patterns were
169 different between dietary treatments a proximity matrix of similarity was constructed by using
170 Pearson's coefficients taking into account band location and intensity. Statistical analysis of
171 similarity (ANOSIM) between band patterns was done using 10,000 Monte Carlo

172 permutations. The ANOSIM-R value indicated the extent to which the groups differed, *i.e.*
173 groups were considered significantly different for $p < 0.05$ and $R > 0.25$ ($R > 0.75$, well-
174 separated groups; $0.50 < R < 0.75$, separated but overlapping groups; $0.25 < R < 0.50$,
175 separated but strongly overlapping groups
176

177 **Table 1.** Composition and nutrient content of control diets (g/kg)

Item	Diets			
	Starter (d1-10)	Grower (d10-22)	Finisher (d22-32)	Withdrawal (d32-42)
Ingredients				
Wheat	370.0	400.0	450.0	500.0
Soybean meal	326.1	284.4	263.3	214.0
Maize	162.0	151.4	194.6	181.5
Pea	60.0	80.0		
Maize gluten meal			8.0	24.0
Soybean oil	46.2	50.0	50.0	50.0
Dicalcium phosphate	16.6	16.0	14.7	12.2
Calcium carbonate	10.3	9.7	10.4	11.0
Sodium chloride	3.0	3.0	3.0	3.0
Mineral-Vitamin mixture *	4.0	4.0	4.0	4.0
Lysine-HCL			0.6	
DL-Methionine	1.6	1.3	1.2	0.3
Anticoccidial (diclazuryl) [†]	0.2	0.2	0.2	
Calculated nutrient analysis				
Metabolizable Energy (kJ/kg)	12,293	12,493	12,690	12,991
Crude protein	215	202	190	180
Crude fiber	34.4	33.4	30.1	27.9
Fat	65.4	68.5	69.8	69.4
Lysine	11.6	10.7	9.8	8.2
Methionine + cysteine	8.4	7.7	7.5	6.5
Tryptophan	2.6	2.4	2.3	2.1
Threonine	8.0	7.5	6.9	6.5
Calcium	10.0	9.5	9.3	8.7
Available phosphorus	4.2	4.1	3.9	3.5

178 * Supplied per kilogram of diet: Co, 0.4 mg; Cu, 16 mg; Fe, 40 mg; I, 1.6 mg; Mn, 64 mg; Se, 0.2
 179 mg; Zn, 72 mg; retinyl acetate, 12000 IU; cholecalciferol, 3440 IU; DL-alpha tocopheryl acetate,
 180 80 mg; thiamine mononitrate , 4 mg; riboflavin, 6.4 mg; calcium pantothenate, 20 mg;
 181 cyanocobalamin, 0.02 mg; menadione, 4 mg; pyridoxine hydrochloride, 5.6 mg; folic acid, 2.4
 182 mg; biotin, 0.24 mg; niacin, 80 mg; choline chloride , 440 mg; antioxidant
 183 (butylhydroxyanisole, propyl gallat, ethoxyquin) 40 mg

184 [†]Clinacox. Jansen Pharmaceutica, Beerse, Belgium

185
 186
 187

188 **Results:**

189 *Impact of the dietary treatment on the growth performance*

190 The dietary treatment had no impact on chickens' mortality. No interaction was observed
191 between the diet and the density on the broilers' growth performance, except during the d1 to
192 d10 rearing period (Tables 2, 3 and 4). During this period, at low stocking density the feed
193 intake tended ($p = 0.08$) to be higher in the PHY group leading to a body weight 3.4% higher.
194 By contrast, at high stocking density, the feed intake tended ($p = 0.08$) to be lower in the PHY
195 group leading to a 4.6% lower body weight (Tables 2, 3 and 4).

196 During the d10 to d24 period, growth performance weren't affected by the density or the diet
197 (Tables 2, 3 and 4).

198 The stocking density increase had no impact on the feed intake of the d24 to d32 rearing
199 period or during the total rearing period. By contrast, the feed intake was decreased by 3.2%
200 in high compared to low density during the d32 to d39 rearing period (Table2). In high
201 stocking density compared to low, the FCR was deteriorated during the d24 to d32, the d32 to
202 d39 and the total rearing period (+3.2%, +3.2% and +2.6% respectively; Table 3). Those
203 results lead to a lower DWG in high stocking density during the d24 to d32, the d32 to d39
204 and the total rearing period (-2.8%, -6.1% and -2.8% respectively) and to a final body weight
205 2.8% lower (Table 4).

206 The feed intake was increased by the PHY diet by 3.7% and 3.9% during the d24 to d32 and
207 d32 to d39 rearing periods respectively, and tended to be increased by 2.6% during the total
208 rearing period ($p=0.07$, Table 2). The FCR was improved by the PHY diet during the d24 to
209 d32, the d32 to d39 and the total rearing period (-1.0%, -2.1% and -1.0% respectively; Table
210 3). That led to a higher DWG in the PHY group compared to the control group during the d24
211 to d32, the d32 to d39 and the total rearing period (+6.6%, +5.4% and +3.4% respectively)
212 and to a final body weight 3.4% higher (Table 4).

213

214 *Impact of the dietary treatment on the digestive microbiota*

215 The dietary treatment had no impact on the inter-pool similarity of the digestive microbiota,
216 whatever the stocking density or the age of the broilers (data not shown).

217 When chickens were 3 weeks old, the structure of the digestive microbiota was affected to a
218 limited extent by the diet only in the caeca of broilers reared at high stocking density ($R=0.53$;
219 Table 5). When broilers were 6 weeks old, the crop microbiota was affected to a limited
220 extent by the diet when chickens were reared at low stocking density ($R= 0.61$). The diet had

221 a strong impact on the structure of the ileal microbiota at high stoking density ($R = 1$) and on
222 the caecal microbiota whatever the density ($R = 0.75$ and 0.90 at low and high density
223 respectively).

224 The PHY diet had no impact on the quantification of the major bacterial groups, except in the
225 caeca of 3 weeks old broilers (data not shown). In this organ an interaction was observed
226 between diet and density factors for the quantification of the *E.coli* species. At low stocking
227 density the PHY diet had no impact whereas at high stocking density it increase this bacterial
228 population by 8.5 fold ($p < 0.01$, 4.5×10^9 and 3.8×10^{10} 16S rDNA copies/g of digestive content
229 of the control and PHY groups respectively). In the caeca of animals feed with the PHY diet,
230 the *C. leptum* group quantification was slightly decrease (1.6 fold decrease) compared to the
231 quantification in animals feed with the control diet ($p = 0.01$; 7.9×10^{10} and 5.0×10^{10} 16S rDNA
232 copies/g of digestive content of the control and PHY groups respectively).

233

234 **Table 2:** Impact of plant extract blend addition in the diet and stocking density on feed intake
 235 of broiler chickens
 236

	Feed intake (g/d/animal)*				
	d1-10	d10-24	d24-32	d32-39	d1-39
Diet					
Control	23.2	79.3	142.7 ^b	167.1 ^b	95.5
PHY [†]	23.3	79.6	148.0 ^a	173.6 ^a	98.0
SEM	0.24	0.88	1.46	1.92	0.88
Density					
Low [‡]	23.0	79.1	145.6	173.1 ^a	97.1
High [§]	23.5	79.7	145.2	167.6 ^b	96.4
SEM	0.24	0.88	1.67	1.99	0.95
P-value					
Diet	0.88	0.83	0.02	0.02	0.07
Density	0.20	0.63	0.86	0.04	0.58
Diet x Density	0.08	0.66	0.49	0.38	0.41

237 a-b For a given parameter, means in the same column with no common superscript differ
 238 significantly (P<0.05)

239 * n=6 floor pen per treatment

240 [†]PHY diet: control diet with the EXVa plant extract blend (0.3 g/kg) from d1 to d10, and the
 241 Phy b plant extract blend (0.8 g/kg) from d10 to d22 then (1 g/kg) from d22 to d39

242 [‡]Low density: 12 birds /m²

243 [§]High density: 17 birds /m²

244 **Table 3:** Impact of plant extract blend addition in the diet and stocking density on feed
 245 conversion ratio of broiler chickens

246

	Feed conversion ratio*				
	d1-10	d10-24	d24-32	d32-39	d1-39
Diet					
Control	1.10	1.39	1.62 ^a	1.95 ^a	1.58 ^a
PHY [†]	1.11	1.39	1.59 ^b	1.91 ^b	1.56 ^b
SEM	0.008	0.006	0.011	0.016	0.007
Density					
Low [‡]	1.09 ^b	1.38	1.58 ^b	1.90 ^b	1.55 ^b
High [§]	1.12 ^a	1.40	1.63 ^a	1.96 ^a	1.59 ^a
SEM	0.007	0.005	0.011	0.014	0.005
P-value					
Diet	0.50	0.58	0.02	0.02	0.01
Density	0.03	0.10	<0.01	<0.01	<0.01
Diet x Density	0.10	0.60	0.64	0.68	0.19

247 a-b For a given parameter, means in the same column with no common superscript differ
 248 significantly (P<0.05)

249 * n=6 floor pen per treatment

250 [†]PHY diet: control diet with the EXVa plant extract blend (0.3 g/kg) from d1 to d10, and the
 251 Phy b plant extract blend (0.8 g/kg) from d10 to d22 then (1 g/kg) from d22 to d39

252 [‡]Low density: 12 birds /m²

253 [§]High density: 17 birds /m²

254

255 **Table 4:** Impact of plant extract blend addition in the diet and stocking density on daily
 256 weight gain and final weight of broiler chickens

257

	Daily weight gain (g/d)*					Weight (g)
	d1-10	d10-24	d24-32	d32-39	d1-39	d39
Diet x Density						
Low Density [†]						
Control	20.8 ^b	57.1	89.3 ^c	91.2 ^b	61.6 ^b	2384 ^b
PHY [‡]	21.5 ^a	58.2	96.6 ^a	96.7 ^a	64.8 ^a	2507 ^a
High Density [§]						
Control	21.6 ^a	57.6	87.9 ^c	86.2 ^c	60.7 ^b	2351 ^b
PHY [‡]	20.6 ^b	57.1	92.7 ^b	90.4 ^b	62.1 ^b	2403 ^b
SEM	0.22	0.58	0.96	0.18	0.59	22.3
Diet						
Control	21.2	57.4	88.5 ^b	88.2 ^b	61.1 ^b	2365 ^b
PHY [‡]	21.0	57.5	94.3 ^a	93.0 ^a	63.2 ^a	2446 ^a
SEM	0.16	0.41	0.68	0.84	0.42	15.8
Density						
Low [†]	21.1	57.7	92.9 ^a	94.0 ^a	63.2 ^a	2446 ^a
High [§]	21.1	57.3	90.3 ^b	88.3 ^b	61.4 ^b	2377 ^b
SEM	0.16	0.41	0.69	0.84	0.42	15.9
P-value						
Diet	0.65	0.62	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Density	0.89	0.60	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Diet x Density	<0.01	0.15	0.19	0.61	0.11	0.11

258 a-c For a given parameter, means in the same column with no common superscript differ
 259 significantly (P<0.05)

260 *For daily weight gain and weight, at d10, n=209 per diet at low density and n=291 per diet at
 261 high density; at d 39 , n=183 per diet at low density and n=264 per diet at high density

262 [†]Low density: 12 birds /m²

263 [‡]PHY diet: control diet with the EXVa plant extract blend (0.3 g/kg) from d1 to d10, and the
 264 Phy b plant extract blend (0.8 g/kg) from d10 to d22 then (1 g/kg) from d22 to d39

265 [§]High density: 17 birds /m²

266 **Table 5:** Impact of phytobiotics addition in the diet* at low and high stocking density on the
 267 structure of the chicken digestive microbiota assessed by ANOSIM on a Pearson distance
 268 matrix

Age	Density [†]	Crop		Terminal Ileum		Caeca	
		<i>P</i>	R	<i>P</i>	R	<i>P</i>	R
		value	value	value	value	value	value
3 weeks	Low density [‡]	0.37	0.03	0.52	-0.06	0.17	0.18
	High density [§]	0.17	0.22	0.29	0.15	0.03	0.53
6 weeks	Low density [‡]	0.03	0.61	0.31	0.08	0.03	0.75
	High density [§]	0.23	0.20	0.03	1.00	0.03	0.90

269 * control vs PHY diet (PHY diet: control diet with the EXVa plant extract blend (0.3 g/kg)
 270 from d1 to d10, and the Phy b plant extract blend (0.8 g/kg) from d10 to d22 then (1 g/kg)
 271 from d22 to d39)

272 † For each organ and dietary treatment n=4 pools of 5 birds

273 ‡Low density: 12 birds /m²

274 §High density: 17 birds /m²

275

276

277

278

279 **Discussion:**

280 During the d1 to d10 rearing period an interaction between the dietary treatment and the diet
281 was observed. At low stocking density, the DWG of the birds fed with PHY was higher
282 compared to the DWG of the birds fed with the control diet and the opposite was observed at
283 high stocking density. However those differences had disappeared after d10 and therefore
284 have a limited biological significance.

285 Increased stocking density depressed chickens' growth performances during the two last
286 rearing phases (3 to 6 weeks old) as observed in many studies (see Bessei, 2006 and Estevz,
287 2007 per review) and could be due to a deterioration of chickens' environment and changes in
288 chickens behavior (Guardia et al., 2011a).

289 The PHY feeding program increased the chickens' growth performances from d24 to d39
290 leading to improved growth performances during the total rearing period. This improvement
291 was statistically significant whatever the stocking density albeit the increase was numerically
292 higher at low stocking density (final body weight increased by 5% and 2% at low and high
293 stocking density respectively). An increase of chickens' growth performance was previously
294 reported in several of the studies conducted with component of the Immunostart (Ali et al.,
295 2010; Lee et al., 2010) or the ENTX blends (Hernandez et al., 2004; Al-Kassie et al., 2009;
296 Kumar et al., 2010; Toghyani et al., 2011). An improvement of feed intake and DWG of
297 chickens feed the ENTX blend from 3 to 6 weeks was also previously observed when reared
298 at low but not high stocking density (Guardia et al., 2011b).

299 In the present study, the improvement of the DWG is related both to an increase of feed intake
300 and a decrease of FCR. The increase of feed intake could be related to an increase of feed
301 appetite. Indeed as chickens are able to detect the scent of some pytobiotics components as
302 allyl sulfide or cineol (Jones and Roper, 1997) and can perceive coulour changes (Lecuelle et
303 al., 2011), their feeding behavior could have been modified in a positive way by those scents
304 and by the pigments included in the PHY blends.

305 The improvement of FCR could be related to different factors including positive changes in
306 chickens' digestive microbiota, modulation of chickens' immunity or improvement of
307 chickens' oxidative status. The Immunostart blend (Nassiri-Asl and Hosseinzadeh, 2009) and
308 especially the ENTX blend (Smith-Palmer et al., 1998; Cowan, 1999; Ceylan an Fung , 2004)
309 contains molecules that have shown *in vitro* antibacterial properties. Other classes of
310 antibacterial components such the AGP are well known to improve animal growth
311 performances most probably through their action on digestive microbiota (Thomke and

312 Elwinger, 1999), suggesting the same mechanism could act with phytobiotics. Moreover, anti-
313 inflammatory properties and activities on immunity could also be involved in the growth
314 promoting effect of AGP (Niewold, 2007). Taking into account that several components of
315 the Immunostart blend have shown strong anti-inflammatory activities (Deyama et al., 2001;
316 Spelman et al., 2006; Nassiri-Asl and Hosseinzadeh, 2009), such mechanism could also be
317 involved in the observed improvement of growth performance when chickens were fed by the
318 PHY diet. The antioxidant properties of the Immunostart blend (Araujo and Leon, 2001;
319 Deyama et al., 2001; Valerio and Gonzales, 2005; Goni et al., 2007; Cavia-Saiz et al., 2010)
320 could also have improved the chicken oxidative status and increased their performance,
321 particularly in high stocking density which have a negative effect on oxidative status of birds
322 (Simsek et al., 2009). That could be the reason why the ENTX blend, which don't have such
323 strong antioxidant properties, in unable to improve the growth performance of chickens reared
324 at high stocking density when given alone (Guardia et al., 2011b).

325

326 In agreement with the microbiota related theory, changes in chicken digestive microbiota
327 were observed in this work when they were fed with the PHY diet. Previous studies have
328 shown an impact on the digestive microbiota when animals were fed by several component of
329 the ENTX blend. Inclusion of cynamaldehyde, the major component of cinnamon essential
330 oil, can decrease anaerobic bacteria population and more particularly coliform populations in
331 pig simulated microbiota (Micheils et al., 2008). In the same way garlic is reported to
332 decrease *Staphylococcus* and *Enterobacteria* count in the distal part of the digestive tract of
333 chickens (Dieumou, et al., 2009) and to decrease *Clostridium* counts in chickens' intestine
334 (Kirkpınar et al., 2010).

335 In the present work, the PHY diet induced different changes in the microbiota according to
336 the location in the digestive tract, to the rearing conditions and to the chicken age.

337 The changes were higher in the caeca than in crop or terminal ileum. As hypothesized by
338 Guardia et al., (2011b), this could be due to the longer time of contact between bacteria and
339 phytobiotics in the caeca due to the higher mean retention time in this organ. Indeed, the
340 washout of digestive content occurs only twice a day in caeca (Duke, et al., 1980). Bacterial
341 composition of the digestive microbiota, which differs according to organ, had also probably
342 contributed to the observed changes. Indeed, *in vitro* sensibility of digestive bacteria toward
343 the antibacterial component used in the present study differs between bacterial species (Ross,
344 et al., 2001; Si, et al., 2006; Michiels et al, 2008), the major the bacterial population of the

345 upper digestive tract (*i.e. Lactobacillus*) being less sensitive than the important bacterial
346 population of caeca (*i.e. Bacteroides* or *Escherichia*).

347 These differences could also be due to the concentration of the active molecules in the digesta
348 of the different organs. The existing data about the fate of those molecules after ingestion are
349 limited in avian species and differences can occur between mammals and birds (Toutain,
350 2010). However, according to studies conducted in mammal, several of the principal
351 antibacterial molecules included in the ENTX diet, as cinamaldehyde, eugenol, allyl sulfurs or
352 cineol, are rapidly absorbed before reaching the distal part of the small intestine (Kohlert et al,
353 2000; Amagase., 2006; Michiels et al, 2008; Michiels., 2009). This fraction of phytobiotics, is
354 eliminated in urine for a part unmodified, and for another part as phytobiotics' metabolites
355 (Kohlert, et al., 2002; Sharma et al., 2007). In chicken, urine reaches the caeca by retrograde
356 contractions from cloaca and colon (McWhorter et al., 2009). The active concentration of
357 active phytobiotics metabolites could be thus higher in caeca than in ileum, and explain the
358 more intense changes of caecal microbiota.

359 The changes of digestive microbiota were more pronounced when chickens were reared at
360 high stocking density. This could be related to bacterial composition of the digestive
361 microbiota, which differs according to stocking density. Indeed, a the strong impact of
362 stocking density was previously observed on the digestive microbiota of 3 and 6 weeks old
363 chickens (Guardia et al., 2011a).

364 The impact of the PHY diet on chicken digestive microbiota increased as the birds grew older.
365 This could partly due to the given dose of the ENTX blend which was higher during the week
366 prior to the last microbiota analysis (6 week) than during the week prior to the first microbiota
367 analysis (3 week). Moreover, at 3 week microbial population of the PHY group started to
368 diverge from the microbial population of the control group, at least in the caeca. One can thus
369 assume that through the constant pressure of the PHY blend, the bacterial populations
370 continue to diverge, explaining the higher differences between dietary groups at 6 than at 3
371 weeks.

372
373 In the present study, the commercial feeding program containing phytobiotics improved
374 chickens growth performance whatever the density. Changes in microbiota occur in chicken
375 feed with this program, more intense at high stocking density. The growth promoting effect of
376 the phytobiotic-based feeding program may act through the observed impact on digestive
377 microbiota. A functional analysis of the chickens' digestive microbiota according to the diet

378 would contribute to confirm this hypothesis. Moreover, other mechanisms like modification
379 of the oxidative and inflammatory status of the birds could have occurred. Further work is still
380 needed to confirm those hypotheses.

381

382 **References**

383 Ali, M.N., Qota, E.M.A., Hassan, R.A., 2010. Recovery from adverse effects of heat stress on
384 slow-growing chicks using natural antioxidants without or with sulphate. *Int. J. Poult.*
385 *Sci.* 9, 109-117.

386 Al-Kassie, G.A.M., 2009. Influence of two plant extracts derived from thyme and cinnamon
387 on broiler performance. *Pakistan Veterinary Journal* 29, 169-173.

388 Allen, P.C., Lydon, J., Danforth, H.D., 1997. Effects of components of *Artemisia annua* on
389 coccidia infections in chickens. *Poult. Sci.* 76, 1156-1163.

390 Amagase, H., 2006. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *Journal of*
391 *Nutrition*, 136, 3, 716S-725S.

392 Araujo, C.A.C., Leon, L.L., 2001. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Mem. Inst.*
393 *Oswaldo Cruz* 96, 723-728.

394 Aviagen, 2009. Ross PM3 broiler performance objectives. Retrieved 05/05/2010, 2010, from
395 Bessei, W., 2006. Welfare of broilers: a review. *World's Poultry Science Journal* 62(3): 455-
396 465.

397 Brenes, A., Roura, E., 2010. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of
398 action. *Anim. Feed Sci. Technol.* 158, 1-14.

399 Burkholder, K. M., K. L. Thompson, M. E. Einstein, T. J. Applegate, and J. A. Patterson.
400 2008. Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology,
401 and susceptibility to *Salmonella enteritidis* colonization in broilers. *Poult. Sci.*
402 87:1734-1741.

403 Cavia-Saiz, M., Busto, M.D., Pilar-Izquierdo, M.C., Ortega, N., Perez-Mateos, M., Muniz, P.,
404 2010. Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection
405 capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. *J. Sci.*
406 *Food Agric.* 90, 1238-1244.

407 Ceylan, E., Fung, D.Y.C., 2004. Antimicrobial activity of spices. *J. Rapid. Meth. Autom.*
408 *Microbiol.* 12, 1-55.

409 Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 564-
410 582.

411 Deyama, T., Nishibe, S., Nakazawa, Y., 2001. Constituents and pharmacological effects of
412 *Eucommia* and Siberian ginseng. *Acta Pharmacol. Sin.* 22, 1057-1070.

413 Dieumou, F.E., Teguaia, A., Kuate, J.R., Tamokou, J.D., Fonge, N.B., Dongmo, M.C., 2009.
414 Effects of ginger (*Zingiber officinale*) and garlic (*Allium sativum*) essential oils on
415 growth performance and gut microbial population of broiler chickens. *Livestock*
416 *research for rural development* 21, 131.

417 Duke, G.E., Evanson, O.A., Huberty, B.J., 1980. Electrical potential changes and contractile
418 activity of the distal cecum of turkeys. *Poult. Sci.* 59, 1925-1934.

419 Epstein, J., Sanderson, I.R., MacDonald, T.T., 2010. Curcumin as a therapeutic agent: the
420 evidence from in vitro, animal and human studies. *Br. J. Nutr.* 103, 1545-1557.

421 Estevez, I., 2007. Density Allowances for Broilers: Where to Set the Limits? *Poultry Science*
422 86(6): 1265-1272.

423 European Commission ,2007. Council directive 2007/43/EC of 28 June 2007 laying down
424 minimum rules for the protection of chickens kept for meat production. *Official*
425 *Journal of the European Union*, 12 jully 2007: L 182/119-128.

426 FDA, 1996. Environmental assesment for Clinacox™ Type A Medicated Article for Chicken
427 and Turkey (Diclazuril), NADA number 140-951.

428 Furet, J. P., O. Firmesse, et al, 2009. Comparative assessment of human and farm animal
429 faecal microbiota using real-time quantitative PCR." *FEMS Microbiology Ecology*
430 68(3): 351-362.

431 Goni, I., Brenes, A., Centeno, C., Viveros, A., Saura-Calixto, F., Rebole, A., Arija, I.,
432 Estevez, R., 2007. Effect of dietary grape pomace and vitamin E on growth
433 performance, nutrient digestibility, and susceptibility to meat lipid oxidation in
434 chickens. *Poult. Sci.* 86, 508-516.

435 Guardia, S., Konsak, B., Combes, S., Levenez, F., Cauquil, L., Guillot, J. F., Moreau-
436 Vauzelle, C., Lessire, M., Juin, H., Gabriel, I., 2011b. Effect of a natural phytobiotic
437 blend and stocking density on growth performance and digestive microbiota of broiler
438 chickens. In prep in *Animal Feed Science and Technology*.

439 Guardia, S.; Konsak, B.; Combes, S.; Levenez, F.; Cauquil, L.; Guillot, J. -F.; Moreau-
440 Vauzelle, C.; Lessire, M.; Juin, H.; Gabriel, I., 2011a. Effects of stocking density on the
441 growth performance and digestive microbiota of broiler chickens. *Poultry Science*, 90,
442 1878-1889.

443 Heitzman, M.E., Neto, C.C., Winiarz, E., Vaisberg, A.J., Hammond, G.B., 2005.
444 Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of Uncaria (Rubiaceae).
445 Phytochemistry 66, 5-29.

446 Hernández, F., Madrid, J., García, V., Orengo, J., Megías, M.D., 2004. Influence of two plant
447 extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poult. Sci.* 83,
448 168-174.

449 Jones, R.B., Roper, T.J., 1997. Olfaction in the domestic fowl: A critical review. *Physiol.*
450 *Behav.* 62, 1009-1018

451 Kirkpinar, F., Unlu H. B.; Ozdemir G., 2010. Title: Effects of oregano and garlic essential oils
452 on performance, carcass, organ and blood characteristics and intestinal microflora of
453 broilers. *Livestock Science*, 137, 1-3, 619.

454 Kohlert C., Schindler G., Marz R.W., Abel G., Brinkhaus B., Derendorf H., Grafe E. U. Veit
455 M., 2002. Systemic availability and pharmacokinetics of thymol in humans. *Journal of*
456 *Clinical Pharmacology*, 42, 7, 731-737.

457 Kohlert, C., van Rensen, I., März, R., Schindler, G., Graefe, E.U., Veit, M., 2000.
458 Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans
459 *Planta Med.* 66, 495-505.

460 Kumar, S., Sharadamma, K.C., Radhakrishna, P.M., 2010. Effects of a garlic active based
461 growth promoter on growth performance and specific pathogenic intestinal microbial
462 counts of broiler chicks. *Int. J. Poult. Sci.* 9, 244-246.

463 Lecuelle S, Bouvarel I, Chagneau AM, Laviron F, Lescoat P, Leterrier C., 2011. Early visual
464 experience of food does not appear to reduce subsequent feed neophobia in turkeys.
465 *Poult Sci.* 90, 1-9

466 Lee, K.-W., Everts, H., Beynen, A.C., 2004. Essential Oils in Broiler Nutrition. *Int. J. Poult.*
467 *Sci.* 3, 738-752.

468 Lee, S.H., Lillehoj, H.S., Jang, S.I., Kim, D.K., Ionescu, C., Bravo, D., 2010. Effect of
469 Dietary Curcuma, Capsicum, and Lentinus on Enhancing Local Immunity against
470 *Eimeria acervulina* Infection. *Journal of Poultry Science* 47, 89-95.

471 McWhorter, T. J., E. Caviedes-Vidal, et al., 2009. The integration of digestion and
472 osmoregulation in the avian gut. *Biological Reviews* 84(4): 533-565.

473 Michiels J., Missotten J., Dierick N. A., Fremaut D., Maene P., De Smet S., 2008. In vitro
474 degradation and in vivo passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans-

475 cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets. *Journal of the Science of*
476 *Agriculture*, 88, 13, 2371-2381

477 Michiels J., Missotten J., Fremaut D., De Smet S Dierick N. A., 2009. In vitro characterisation
478 of the antimicrobial activity of selected essential oil components and binary
479 combinations against the pig gut flora. *Animal Feed Science and Technology*, 151,
480 111-127.

481 Nassiri-Asl, M., Hosseinzadeh, H., 2009. Review of the Pharmacological Effects of *Vitis*
482 *vinifera* (Grape) and its Bioactive Compounds. *Phytother. Res.* 23, 1197-1204.

483 Niewold, T.A., 2007. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth
484 promoters, the real mode of action? A hypothesis. *Poultry science*, 86, 4, 605-609.

485 Orban, J.I., Patterson, J.A., Sutton, A.L., Richards, G.N., 1997. Effect of sucrose thermal
486 oligosaccharide caramel, dietary vitamin-mineral level, and brooding temperature on
487 growth and intestinal bacterial populations of broiler chickens. *Poult. Sci.* 76, 482-490.

488 Ravindran, V., D. V. Thomas, et al., 2006. Performance and welfare of broilers as affected by
489 stocking density and zinc bacitracin supplementation. *Animal Science Journal* 77(1):
490 110-116.

491 Ross, Z. M., E. A. O'Gara, et al., 2001. Antimicrobial properties of garlic oil against human
492 enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides
493 and garlic powder. *Applied and environmental microbiology* 67(1): 475-480.

494 Seksik, P., L. Rigottier-Gois, et al., 2003. Alterations of the dominant faecal bacterial groups
495 in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 52: 237-242.

496 Shane, S. M. 2000. *Campylobacter* infection of commercial poultry. *Revue Scientifique Et*
497 *Technique De L Office International Des Epizooties* 19:376-395.

498 Sharma R.A., Steward W. P., Gescher A. J., 2007. Pharmacokinetics and pharmacodynamics
499 of curcumin. *Advances in experimental Medicine and Biology*, 595, 453-470

500 Si, W., J. Gong, et al., 2006. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related
501 synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria.
502 *Journal of Applied Microbiology* 100(2): 296-305.

503 Simsek, U.G., Dalkilic, B., Ciftci, M., Yuce, A., 2009. The influences of different stocking
504 densities on some welfare indicators, lipid peroxidation (MDA) and antioxidant enzyme
505 activities (GSH, GSH-Px, CAT) in broiler chickens. *Journal of Animal and Veterinary*
506 *Advances* 8, 1568-1572.

507 Sklan, D., Dubrov, D., Eisner, U., Hurwitz, S., 1975. ⁵¹Cr-EDTA, ⁹¹Y and ¹⁴¹Ce as non
508 absorbed reference substances in the gastrointestinal tract of the chicken. *J. Nutr.* 105,
509 1549-1552.

510 Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L., 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils
511 and essences against five important food-borne pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 26,
512 118-122.

513 Thomke, S. and K. Elwinger, 1998. Growth promotants in feeding pigs and poultry. I. Growth
514 and feed efficiency responses to antibiotic growth promotants. *Annales de zootechnie*
515 47(2): 85-97.

516 Toghyani, M., Toghyani, M., Gheisari, A., Ghalamkari, G., Eghbalsaied, S., 2011. Evaluation
517 of cinnamon and garlic as antibiotic growth promoter substitutions on performance,
518 immune responses, serum biochemical and haematological parameters in broiler chicks.
519 *Journal of Livestock Science*, 138, 1, 167-173.

520 Toutain P. -L., Ferran A., Bousquet-Melou A. 2010. Species differences in pharmacokinetics
521 and pharmacodynamics. *Handbook of experimental pharmacology*, 199, 19-48.

522 Valerio Jr, L.G., Gonzales, G.F., 2005. Toxicological aspects of the south american herbs cat's
523 claw (*Uncaria tomentosa*) and Maca (*Lepidium meyenii*). *Toxicol. Rev.* 24, 11-35.

524 Windisch, W.M., Schedle, K., Plitzner, C., Kroismayr, A., 2008. Use of phytogetic products
525 as feed additives for swine and poultry. *J. Anim. Sci.* 86, E140-148.

526 Zoetendal, E. G., A. D. L. Akkermans, et al., 1998. Temperature gradient gel electrophoresis
527 analysis of 16S RNA from human faecal samples reveals stable and host-specific
528 communities of actives bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3854-
529 3859.

2.2.2.2. Résultats complémentaires

Suite à l'analyse des profils obtenus par TTGE, nous avons excisé les bandes dont l'intensité était visuellement modifiée par le traitement Exp2 en comparaison du traitement témoin. Ces bandes ont ensuite été excisées puis séquencées dans le but de procéder à leur identification (voir partie 2, chapitre 2.3.2).

A 3 semaines d'âge, 4 bandes présentaient des variations d'intensité entre le traitement témoin et le traitement Exp2 (Tableau 24). Les bandes A et C, identifiées respectivement dans l'iléon des animaux élevés en faible densité et les caeca des animaux élevés en forte densité présentaient une intensité plus faible avec le traitement Exp2. Elles présentaient respectivement 97% d'homologie avec plusieurs bactéries du genre des *Lactobacillus* (dont *L. johnsonii*) et 92% d'homologies avec plusieurs bactéries de l'ordre des clostridiales. L'intensité des bandes B et D, identifiées respectivement dans l'iléon et les caeca d'animaux élevés en forte densité, était plus importante avec le traitement Exp2. Elles présentaient une d'homologie de séquence de 97 et 96% respectivement avec plusieurs bactéries de la famille des Enterobacteriaceae, notamment avec *Escherichia coli*. A 6 semaines d'âge, trois bandes ont présenté des variations d'intensité et ont été excisées (Tableau 23). L'intensité de la bande E, détectée dans le jabot des animaux élevés en basse densité, était réduite par le traitement Exp1, de même que celle de la bande F détectée dans l'iléon des animaux élevés en forte densité. L'intensité de la bande G détectée dans les caeca des animaux élevés en forte densité était plus forte avec le traitement Exp2. Les bandes E et G n'ont pas pu être purifiées avec succès. La bande F présentait 98% d'homologie avec plusieurs bactéries de la famille des Enterobacteriaceae, notamment avec *Escherichia coli*.

Les résultats observés pour les bandes C et D confirment les observations faites par PCR en temps réel. Concernant les lactobacilles, ces résultats n'ont pas été détectés par PCR en temps réel, probablement car les amorces ayant permis leur quantification ciblaient plusieurs espèces tandis que les bandes issues des profils TTGE étaient spécifiques d'une seule espèce. Ainsi, une diminution de la charge d'une espèce a pu être contrebalancée par l'augmentation d'une autre.

Tableau 24 : Identification des bandes de profil TTGE présentant une variation d'intensité en fonction du traitement alimentaire (témoin ou Exp2)

Age	Segment digestif	Densité normale (12 animaux/m ²)			Densité élevée (17 animaux/m ²)		
		Bande	contrôle	Exp2	Identification bande	contrôle	Exp2
3 sem	Jabot	Ø			Ø		
	Iléon	Bande A	Intensité ++ Identification Lactobacillus	+	Bande B	Intensité ++ Identification Enterobacteriaceae	+++
	Caeca	Ø			Bande C	Intensité ++ Identification Clostridiales	+
					Bande D	Intensité + Identification Enterobacteriaceae	++
6 sem	Jabot	Bande E	Intensité +++ Identification Bande contaminée	+	Ø		
	Iléon	Ø			Bande F	Intensité +++ Identification Enterobacteriaceae	++
	Caeca	Ø			Bande G	Intensité + Identification Bande contaminée	++

Ø : aucune bande ne présentait visuellement de variation d'intensité entre traitement

+ : Intensité faible

++ : Intensité moyenne

+++ : Intensité forte

2.3. Effets en fonction du potentiel de croissance des animaux

Ces résultats ont donné lieu à une présentation sous forme de poster lors des huitièmes journées de la recherche avicole, 25 et 26 mars 2009, St Malo.

**EFFET DE L'INCLUSION DE COMBINAISONS D'EXTRAITS VEGETAUX
NATURELS SELON LA DENSITE D'ELEVAGE SUR LES PERFORMANCES DE
CROISSANCE DE POULETS DE CHAIR EN FONCTION DE LEUR POIDS EN
DEBUT D'ELEVAGE**

**Guardia Sarah¹, Recoquillay François², Juin Hervé³, Lessire Michel¹, Leconte Maryse¹,
Guillot Jean François⁴, Gabriel Irène¹**

¹INRA - UR 83, Unité de Recherches Avicoles 37380 NOUZILLY ; ²PHYTOSYNTHESE - 57, av Jean Jaures, Z.I. de Mozac Volvic, BP 50100 - 63203 RIOM; ³INRA - Unité d'Elevage Alternatif et Santé des Monogastriques- Le Magneraud Saint-Pierre-d'Amilly - 17700 SURGERES ; ⁴I.U.T. DE TOURS - Laboratoire de microbiologie - 29, rue du Pont-Volant - 37082 TOURS

RÉSUMÉ

Pour comprendre le mode d'action des alternatives aux antibiotiques facteurs de croissance, il est nécessaire de connaître l'origine de la variabilité individuelle des réponses, ce qui permettra d'améliorer l'utilisation de ces alternatives. Pour cela, les performances de croissance de poulets de chair, recevant ou non des combinaisons d'extraits végétaux, sont étudiées en fonction du potentiel de croissance des animaux, estimé par leur poids en début d'élevage (10j). Une combinaison d'extraits végétaux naturels (EXVa) à action antimicrobienne est utilisée seule ou précédée d'une autre combinaison (EXVb) à action principale antioxydante et immunomodulatrice. Deux traitements expérimentaux (Exp1 et Exp2) sont comparés à un traitement 'Témoin' ne contenant aucun de ces extraits végétaux. Exp1 contient la combinaison EXVa à partir de 22j, et Exp2 contient la combinaison EXVb de 1 à 10j, puis EXVa à partir de 10j. L'étude est effectuée à deux densités d'élevage, en parquets de 3m², une densité de 12 animaux /m² (densité normale), et une densité de 17 animaux/m² (densité élevée). La croissance des animaux est suivie jusqu'à 39j. Les données sont analysées en fonction de la catégorie de poids à 10j des animaux : 'Petits', 'Moyens' et 'Gros'.

L'effet des 2 traitements aux 2 densités d'élevage est différent selon la catégorie de poids considérée. En densité d'élevage normale, Exp1 entraîne par rapport au traitement Témoin une augmentation significative du gain moyen quotidien de 24 à 39j pour les Petits (+15%) et les Moyens (+9%), mais est sans effet chez les Gros. Exp2 en revanche est efficace pour les 3 catégories de poids (Petits : +9%, Moyens : +11%, Gros : +5%), cependant son effet sur les Petits est moins important que celui de Exp1. En densité d'élevage élevée, Exp1 a un effet positif bien que non significatif sur le gain moyen quotidien des Petits (+5%) et Exp2 entraîne une augmentation significative chez les Moyens et les Gros (+6%). En conclusion, cette étude montre que la réponse des animaux aux traitements étudiés dépend du milieu d'élevage mais aussi du potentiel de croissance des animaux.

ABSTRACT

In order to understand the mechanism of alternatives to in-feed antibiotic growth factors, origin of individual variability response must be determined, in order to improve the use of alternatives. For this purpose, performance of chicken fed with or without plant extract blends were studied according to the growth potential of animal estimated by their body weight at d10. A plant extract blend (EXVa) with an antimicrobial effect was used alone or preceded by another blend (EXVb) whose main effects were antioxidant and immunomodulator. The animals were fed with a 'Control' treatment, without any additive, or two experimental dietary treatments, Exp1 (EXVa blend incorporated from 22 to 39 days) and Exp2 (EXVb blend incorporated up to 10 days and EXVa from 10 to 39 days). This study was performed at two stocking densities, in 3m² floor pens, either 12 birds/m² (normal density) or 17 birds/m² (high density). Growth rate was recorded until broilers were 39 days old and analysed for each weight group defined at 10 days (Light, Medium, Heavy).

The effect of the 2 dietary treatments at the 2 stocking densities was different according to bird weight group. At the normal density, Exp1 led, compared to Control treatment, to a significant increase of daily life weight gain from d24 to 39 for the Light (+15%) and Medium group (+9%) and ineffective for the Heavy one. In contrast, Exp2 was effective on all groups (Light: +9%, Medium: +11%, Heavy: +5%). However its effect on light group was lower than that of Exp1. At the high density, Exp1 enhanced daily life weight gain of Light group, although not significantly (+5%), and Exp2 enhanced significantly Medium and Heavy groups (+6%). In conclusion, dietary effect depends on environment, but also on the growth potential of bird.

INTRODUCTION

Depuis l'annonce de l'interdiction des antibiotiques facteurs de croissance (AFC), effective en janvier 2006, de nombreuses alternatives sont couramment utilisées afin d'améliorer les performances de croissance des animaux d'élevage. Or, les différentes études effectuées montrent une grande variabilité de résultats, ainsi qu'une grande variabilité inter-individuelle. En effet, différents facteurs peuvent affecter les réponses des animaux à ces alternatives. Ainsi, des facteurs extrinsèques aux animaux, tels que les conditions d'élevage et d'alimentation (plus ou moins dégradées) peuvent influencer sur l'efficacité de ces additifs (Lee et al., 2004 ; Postollec et al., 2007 ; Guardia et al., 2009). De plus, les animaux présentent des réponses individuelles à ces molécules, liées entre autres à leur potentiel génétique (Nordskog et Johnson, 1953 ; Pietrzak et al., 2006).

Il est donc nécessaire pour appréhender le mécanisme d'action d'une alternative aux AFC d'apprécier la variabilité individuelle de la réponse des animaux.

Dans ce travail, nous avons choisi d'étudier la réponse de poulets de chair à des extraits végétaux naturels en fonction de leur potentiel de croissance estimé par leur poids en début d'élevage (10j). Cette étude a été effectuée dans deux conditions environnementales différentes, ici deux densités d'élevage (normale et élevée).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Aliments

Au cours de cette étude, trois traitements alimentaires sont comparés : un traitement témoin et deux expérimentaux (Exp1 et Exp2) (Guardia et al., 2009). Le traitement Exp1 contient une combinaison d'extraits végétaux naturels à activité principale antimicrobienne (EXVa, Phytosynthèse, Riom, France) à partir de 22j à la concentration de 1kg/T. Le traitement Exp2 contient une combinaison d'EXV naturels à activité immunomodulatrice et anti-oxydante (EXVb, Phytosynthèse, Riom, France) à la concentration de 0,3 kg/T jusqu'à 10j d'âge puis le mélange EXVa à 0,8 kg/T de 10 à 22j et enfin le mélange EXVa à 1 kg/t à partir de 22j.

Chaque traitement est décliné en 4 phases : démarrage, croissance, finition et retrait. Les aliments sont granulés (2.5 mm dès le démarrage) à la vapeur.

1.2. Animaux et conditions d'élevage

Les animaux utilisés sont des poulets mâles, blancs, de souche Ross PM3. A l'arrivée des poussins de 1j, ils sont répartis dans 18 parquets de 2,75 m² à une densité d'élevage normale (12 animaux/m²) et 18 parquets de 2,75 m² à une densité d'élevage forte (17 animaux/m²). Six parquets de chaque densité reçoivent le traitement témoin, six le traitement Exp1 et six le traitement Exp2 (Guardia et al., 2009). Les animaux sont pesés individuellement et sans mise à jeun à 10j, 24j, 32j et 39j. Les gains de poids moyens quotidiens (GMQ) sont calculés.

1.3. Analyses statistiques

Ces analyses sont effectuées en utilisant le logiciel StatView® (Abacus concepts, Berkeley, CA, USA). Elles sont réalisées par analyse de variance (ANOVA) à trois facteurs (densité d'élevage (2), traitement alimentaire (3) et bloc (6)) avec comme co-variable le poids à 10j des animaux. Les calculs montrant l'absence d'effet bloc, les résultats de l'analyse sont présentés sans cet effet bloc.

Cette analyse montrant un effet 'poids à 10j', pour chaque parquet les animaux sont répartis en 3 groupes d'effectif similaire en fonction de leur poids à 10j (Petits, Moyens, Gros). Les performances de croissance de chacun des 3 groupes sont alors analysées par analyse de variance à deux facteurs (densité d'élevage, traitement alimentaire). Quand une interaction est observée entre l'effet densité et l'effet traitement alimentaire, les six groupes expérimentaux sont comparés entre eux. Les différences significatives entre groupes sont déterminées en utilisant le test de Student-Newman-Keuls ($p \leq 0.05$). Les différences non significatives (NS ; $p \leq 0,10$), mais montrant des différences biologiques (Robinson et al., 2006) sont appelées tendances.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

L'indicateur du potentiel de croissance des animaux utilisé dans cette étude, est le poids vif à 10j d'âge et non pas le poids à 1j qui dépend du potentiel génétique de l'animal, mais aussi de facteurs indépendants du potentiel génétique, c'est-à-dire du poids de l'œuf à l'éclosion (dépendant de l'âge des reproducteurs (Almeida et al., 2006)) et du poids du résidu du sac vitellin.

L'analyse de variance avec comme co-variable, le poids vif à 10j d'âge, montre un net effet de cette variable sur la croissance ultérieure (Tableau 1).

Aucune différence statistique de poids à 10j n'est observée entre traitements si l'on considère l'ensemble des animaux. Cependant lorsque les données sont analysées par catégorie de poids, quelques différences statistiques, bien que numériquement peu importantes, apparaissent pour les animaux Petits et Moyens (Données non présentées). Ces différences, allant jusqu'à un maximum de 5%, n'ont probablement pas de significations biologiques (Robinson et al., 2006). Ainsi, la différence significative observée entre les 2 densités d'élevage pour le groupe témoin (5%) n'est vraisemblablement pas due à l'effet densité d'élevage, compte tenu de la très faible densité pondérale à cette période d'élevage (<4 kg/m²). De même, les différences significatives de poids entre le régime témoin et les régimes Exp1 et Exp2, ne sont probablement pas attribuables aux régimes expérimentaux.

Entre 10 et 24j, les différences entre traitements observées à 10j pour les animaux Moyens disparaissent, mais se maintiennent pour les Petits.

2.1. Performance des animaux en densité normale

En densité normale, de 24 à 39j, les traitements Exp1 et Exp2 améliorent le GMQ des Petits animaux par rapport au traitement témoin de 14,9% et 9,1% respectivement, l'amélioration étant plus importante avec Exp1 que Exp2 (Tableau 2A). Cet effet bénéfique conduit à un poids moyen à 39j plus élevé par rapport au traitement Témoin de 11,7% et 6,8% avec les traitements Exp1 et Exp2 respectivement (Tableau 2B). Il est peu probable que l'amélioration observée en fin d'élevage pour le traitement Exp1 soit uniquement liée au biais causé par la répartition initiale des animaux qui entraîne la différence observée à 10j et maintenue à 24j. En effet, les différences entre ces deux traitements s'accroissent suite à l'introduction du mélange d'extraits végétaux EXVa à 22j. Ainsi à 10j les animaux recevant le traitement Exp1 ont un poids supérieur de 2,9% à ceux recevant le traitement témoin. A 24j alors que le mélange est introduit depuis 2j cette différence atteint 6,5% et elle est de 10,2% et 11,7% à 32 et 39j respectivement (Tableau 2B, données à 10, 24 et 32j non présentées)

Les animaux Moyens qui reçoivent les traitements Exp1 et Exp2 voient leur GMQ de 24 à 39j amélioré de 9,2% et 11,6% respectivement par rapport au Témoin, les conduisant à 39j à un poids moyen supérieur de 6,3% et 8,2% par rapport au traitement Témoin (Tableaux 2A et 2B). Cette amélioration des performances de croissance est comparable à celle observée quand on considère l'ensemble des animaux (Tableaux 2A et 2B).

La croissance des Gros animaux, au contraire de celle des Petits et Moyens, n'est pas améliorée par le traitement Exp1. En revanche, le traitement Exp2 améliore le GMQ de ces animaux de 5,0% par rapport au témoin, conduisant à un poids final plus élevé bien que NS de 3,2% (Tableaux 2A et 2B).

Ainsi, en densité d'élevage normale on observe un effet positif sur les performances de croissance des animaux du traitement Exp1 par rapport au Témoin, très important pour les Petits, important pour les Moyens, et sans effet chez les Gros. L'amélioration des performances est différente avec le traitement Exp2, celui-ci étant efficace pour les animaux Petits et Moyens, mais aussi pour les Gros bien que de façon moins importante. Exp2 est cependant moins efficace que Exp1 pour les Petits animaux.

L'action préférentielle sur les Petits animaux du mélange d'extraits végétaux EXVa du traitement Exp1, qui contient des composés ayant une activité antimicrobienne (Smith-Palmer et al., 1998 ; Cowan, 1999 ; Ceylan et Fung, 2004), pourrait s'expliquer par une flore digestive moins favorable chez les petits animaux. Les animaux avec des potentiels de croissance différents pourraient présenter des différences dans l'expression des gènes ayant des conséquences sur l'équilibre de la flore digestive. Ainsi, la composante génétique a une forte influence sur la flore digestive comme le montrent des études effectuées chez l'homme. Il a été observé que la flore

de jumeaux homozygotes est plus similaire que celle entre jumeaux dizygotes ou individus non apparentés (Stewart et al, 2005). Ceci pourrait être lié aux interactions hôte-microorganismes, lié en particulier aux glucides non digérés par l'hôte et donc disponibles pour la flore digestive (Bäckhed et al, 2005), ainsi qu'au système immunitaire contrôlant le développement de la flore digestive (Neish, 2009).

L'effet moins important de Exp2 par rapport à Exp1 sur les petits animaux pourrait être dû aux effets immunomodulateurs, anti-oxydants, et régulateurs de certaines sécrétions digestives de EXVb (Anonymous, 1999 ; Platel et Srinivasan, 2000 ; Anonymous, 2002 ; Heitzman et al., 2005 ; Spelman et al., 2006). Les animaux avec des potentiels de croissance différents ont une physiologie différente qui pourraient être due à des différences de sécrétions enzymatiques (Zhang et Aggrey, 2003), ou de développement du système immunitaire (Klasing et al., 1991). Ceci pourrait peut-être aussi expliquer l'effet positif de Exp2 sur les gros animaux, alors que Exp1 seul est inefficace.

2.2. Effet de la densité d'élevage sur les performances des animaux du traitement témoin

L'effet de la densité d'élevage en fonction du poids à 10j est évalué en comparant les traitements témoins en densités normale et forte (Tableaux 2A et 2B). Chez les animaux Petits et Moyens, on n'observe pas d'effet de la densité d'élevage sur la croissance et le poids à 39j. En revanche, les Gros animaux placés en forte densité d'élevage ont un poids de 4,6% inférieur à celui des animaux élevés en densité normale (Tableau 2B). Les animaux avec le plus fort potentiel de croissance sont donc plus affectés par une dégradation des conditions d'élevage. Une interaction entre les effets du potentiel génétique des animaux et de la densité d'élevage a déjà été observée sur la croissance des animaux par (Tarrago et Puchal, 1977) mais va à l'encontre de travaux plus récents n'en montrant aucune (Moreira et al., 2004).

2.3. Performance des animaux en forte densité

En forte densité d'élevage, chez les Petits animaux, les deux traitements expérimentaux n'ont pas d'effet significatif sur la croissance (Tableaux 2A et 2B).

Chez les animaux Moyens et Gros, le traitement Exp2 a un effet bénéfique. Il entraîne respectivement une augmentation significative du GMQ de 24 à 39j de 5,7% et 5,9% (Tableau 2A) conduisant à un poids à 39j supérieur bien que NS de 2,7% et 2,5% (Tableau 2B). De même qu'en densité normale d'élevage, les animaux Moyens sont représentatifs de l'ensemble des animaux (Tableaux 2A et 2B).

En densité d'élevage élevée, comme en densité normale le traitement Exp1 a un effet bénéfique sur les Petits animaux, bien que cet effet soit beaucoup moins important. L'effet sur la flore d'EXVa n'est peut-être plus assez efficace en conditions défavorables. Ainsi, EXVa seul n'a plus d'effet sur les

animaux Moyens. Cependant, l'utilisation d'une combinaison à effet immunomodulateur EXVb de 1 à 10j et/ou d'EXVa de 10 à 22j avant l'emploi d'EXVa de 22 à 39j, permet d'améliorer les performances aussi bien des Moyens que des Gros animaux.

Ainsi, dans des conditions normales d'élevage, le mélange EXVa seul est suffisant pour améliorer les performances de croissance d'animaux ayant un faible potentiel de croissance. A contrario, en condition d'élevage dégradée seule la succession des deux mélanges permet d'améliorer les performances de croissance d'animaux à fort potentiel de croissance.

CONCLUSION

Les animaux ne répondent pas de la même façon aux deux traitements selon leur potentiel de croissance. Ainsi, un des traitements semble plus adapté à des animaux à faible potentiel de croissance, alors que l'autre semble plus adapté à des animaux à fort potentiel de croissance, d'autant plus s'ils sont élevés en conditions d'environnement dégradées. De ce fait, pour comprendre les mécanismes d'action des alternatives aux AFC les animaux répondant le mieux à ces produits seraient un bon modèle d'étude. D'un point de vue pratique, ceci montre que l'effet des alternatives dépend non seulement de l'environnement d'élevage des animaux, mais aussi de leur potentiel génétique, et donc que ces alternatives doivent être adaptées en fonction des animaux ciblés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Almeida, J.G., Dahlke, F., Maiorka, A., Faria Filho, D.E., Oelke, C.A., 2006. Arch. Vet. Sc., (11), 45-49.
- Anonymous, 1999. WHO monographs on selected medicinal plants I. Geneva, World Health Organization Library Cataloguing in Publication Data,(1), 115-124.
- Anonymous, 2002. WHO monographs on selected medicinal plants I. Geneva, World Health Organization Library Cataloguing in Publication Data,(2), 83-96.
- Bäckhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., Gordon, J.I., 2005. Science (307), 1915-1920.
- Ceylan, E. Fung, D.Y.C., 2004. J. Rapid. Meth. Autom. Microbiol., (12), 1-55.
- Cowan, M.M., 1999. Clin. Microbiol. Rev., (12), 564-582.
- Gabriel, I., Lessire, M., Mallet, S., Guillot, J.F., 2006. Worlds Poult. Sci. J., (62), 499-511.
- Guardia, S., Recoquillay, F., Juin, H., Lessire, M., Leconte, M., Guillot, J.F., Gabriel, I. (2009). 8 èmes Journées de la Recherche Avicole, St Malo, France.
- Heitzman, M.E., Neto, C.C., Winiarz, E., Vaisberg, A.J., Hammond, G.B., 2005. Phytochemistry, (66), 5-29.
- Klasing, K.C., Johnstone, B.J., Benson, B.N., 1991. Recent advances in animal nutrition - 1991. 135-146.
- Lee, K.-W., Everts, H., Beynen, A.C., 2004. Int. J. Poult. Sci., (3), 738-752.
- Moreira, J., Mendes, A.A., d.O. Roca, R., Garcia, E.A., d.A. Naas, I., Garcia, R.G., d.A. Paz, I.C.L, 2004. Rev. Bras. Zootec., (33), 1506-1519.
- Neish, A.S., 2009. Gastroenterology.(136), 65-80.
- Nordskog, A.W., Johnson, E.L., 1953. Poult. Sci., (32), 1046-1051.
- Pietrzak, D., Mroczek, J., Lesnik, E., Swierczewska, E., 2006. Med. Weter., (62), 917-921.
- Platel, K. Srinivasan, K., 2000. Nahrung, (44), S42-S46.
- Postollec, G., Maurice, R., Huonnic, D., Boilletot, E., Michel, V., Burel, C., (2007). Septièmes Journées de la Recherche Avicole, TOURS, France.
- Robinson, P.H., Wiseman, J., Uden, P., Mateos, G., 2006. Anim. Feed Sci. Technol. (129), 1-11 (Editorial)
- Smith-Palmer A., J. Stewart, L. Fyfe, 1998. Lett. Appl. Microbiol., (26), 118-122.
- Spelman, K., Burns, J.J., Nichols, D., Winters, N., Ottersberg, S., Tenborg, M., 2006. Altern. Med. Rev., (11), 128-150.
- Stewart, J.A., Chadwick VS, M.A., 2005. J Med Microbiol. 2005, (54), 1239-42.
- Tarrago, J., Puchal, F., 1977. Br. Poult. Sci., (18), 95-99.
- Zhang, W., Aggrey, S.E., 2003. Worlds Poult. Sci. J., (59), 328-339.

Tableau 1 : Analyse de variance à 2 facteurs (densité, traitement) avec comme co-variable le poids des animaux à 10j

Effet	Valeur de P		
	GMQ 10-24j	GMQ 24-39	Poids 39j
Densité (D)	0,11	0,99	0,57
Traitement (T)	0,43	**	*
Poids 10j (P10)	***	***	***
D x T	0,46	0,34	0,30
D x P10	0,17	0,33	0,80
T x P10	0,49	*	*
D x T x P10	0,61	0,53	0,47

* P<0,05 ; ** P< 0,01 ; *** P <0,001

Tableau 2 : Effet de l'inclusion d'extraits végétaux selon la densité d'élevage et la catégorie de poids à 10j sur les gains de poids et le poids final de poulets à croissance rapide (mâles)

Ensemble des animaux (n=198 en densité normale et n=282 en densité élevée, à 10 j)

Pour chaque catégorie de poids (n=66 en densité normale et n=94 en densité élevée) à 10j

A. Gain moyen quotidien (GMQ) des poulets

		Gain Moyen Quotidien 10-24j				Gain Moyen Quotidien 24-39j				
		Ensemble	Petits	Moyens	Gros	Ensemble	Petits	Moyens	Gros	
Valeur de P	Traitement (T)	0,33	0,08	0,46	0,81	***	***	***	**	
	Densité (D)	0,10	0,09	0,18	0,52	***	***	***	***	
	T x D	0,13	*	0,14	0,70	**	*	*	0,98	
Densité	Normale	Témoin	57,1	50,0 ^b	57,1	64,6	90,4 ^{bc}	82,0 ^c	89,3 ^{bc}	100,4 ^b
		Exp1	59,1	53,7 ^a	59,2	64,4	98,0 ^a	94,2 ^a	97,5 ^a	102,3 ^{ab}
		Exp2	58,6	51,6 ^{ab}	59,2	64,6	98,1 ^a	89,5 ^b	99,7 ^a	105,4 ^a
	Elevée	Témoin	57,7	51,1 ^{ab}	58,0	64,1	87,6 ^c	81,8 ^c	88,3 ^c	92,9 ^d
		Exp1	57,5	50,9 ^{ab}	56,9	64,8	89,6 ^{bc}	85,8 ^{bc}	87,7 ^c	95,3 ^{cd}
		Exp2	57,2	49,6 ^b	58,0	63,6	92,2 ^b	84,4 ^{bc}	93,3 ^b	98,4 ^{bc}
		ESM ¹	0,59	0,86	0,80	0,78	0,95	1,63	1,47	1,44
Traitement	Témoin	57,5		57,6	64,3				95,9 ^b	
	Exp1	58,2		57,9	64,6				98,2 ^{ab}	
	Exp2	57,8		58,5	64,0				101,2 ^a	
	ESM ¹	0,42		0,57	0,55				1,06	
Densité	Normale	58,3		58,5	64,6				102,7 ^a	
	Elevée	57,5		57,6	64,1				95,6 ^b	
	ESM ¹	0,34		0,47	0,45				0,84	

B. Poids des poulets à 39 j

		Poids vif à 39j				
		Ensemble	Petits	Moyens	Gros	
Valeur de P	Traitement (T)	***	***	***	*	
	Densité (D)	***	**	***	***	
	T x D	*	*	*	0,87	
Densité	Normale	Témoin	2390 ^b	2128 ^c	2374 ^b	2682 ^{abc}
		Exp1	2536 ^a	2376 ^a	2523 ^a	2712 ^{ab}
		Exp2	2534 ^a	2273 ^b	2568 ^a	2767 ^a
	Elevée	Témoin	2360 ^b	2152 ^{bc}	2372 ^b	2560 ^d
		Exp1	2381 ^b	2202 ^{bc}	2349 ^b	2602 ^{cd}
		Exp2	2411 ^b	2160 ^{bc}	2436 ^b	2625 ^{bcd}
		ESM ¹	22,1	34,8	30,6	29,2
Traitement	Témoin				2609 ^b	
	Exp1				2648 ^{ab}	
	Exp2				2681 ^a	
	ESM ¹				21,2	
Densité	Normale				2720 ^a	
	Elevée				2595 ^b	
	ESM ¹				16,9	

Densité d'élevage normale : 12 animaux /m², Densité d'élevage élevée : 17 animaux /m²

ESM : Erreur Standard de la Moyenne

Exp 1 : EXVa (1 kg/t) 22-39j, Exp 2 : EXVb (0,3 kg/t) 1-10j, EXVa (0,8 kg/t) 10-22j et EXVa (1 kg/t) 22-39j

^{a-d} Les moyennes sans lettre commune, au sein d'une même colonne pour un paramètre donné, diffèrent significativement (* P≤0,05 ; ** P< 0,01 ; *** P <0,001)

Ensemble : résultats de tous les animaux ; Petits, Moyens, Gros : résultats par catégorie de poids 10j

Résumé

Dans ce second chapitre nous avons présenté les études mises en place pour étudier les facteurs pouvant influencer l'impact des phytobiotiques sur la croissance du poulet de chair, et pour étudier leurs modes d'action.

Dans la première section nous avons étudié, en fonction de la densité d'élevage, l'impact de deux traitements alimentaires contenant des phytobiotiques sur la croissance de poulets de chair placés dans des conditions post-éclosions expérimentales, destinées à favoriser leur croissance. Dans ces conditions expérimentales, les deux traitements alimentaires contenant les phytobiotiques n'ont pas eu d'effet sur l'ingestion, le gain de poids ou le poids en fin d'élevage mais ont légèrement détérioré l'indice de consommation. Bien que ces résultats soient significatifs pour les deux densités d'élevage, ils étaient moins marqués en densité élevée, suggérant que les phytobiotiques puissent avoir un effet différent dans des conditions d'élevage moins favorable à la croissance des animaux.

Ces résultats ont amené à conduire une seconde étude en utilisant les mêmes traitements alimentaires et densités d'élevage, mais en plaçant les animaux dans des conditions post-éclosion similaires à celles appliqués en élevage industriel, et moins favorable à la croissance ultérieure des animaux. Le traitement alimentaire contenant à partir de 3 semaine le mélange de phytobiotiques à activité principale antibactérienne a permis une amélioration des performances de croissance des animaux placés en faible densité. Cette amélioration était due à une forte augmentation de l'ingéré, et à une augmentation plus limitée de l'indice de consommation. En forte densité d'élevage, le mélange de phytobiotiques n'as pas permis d'améliorer le poids des animaux, mais a modérément amélioré leur indice de consommation. Ce traitement alimentaire a également entraîné des modifications du microbiote digestif qui pourraient être l'un des facteurs explicatifs de l'amélioration de la croissance. Le programme alimentaire contenant l'association de deux mélanges de phytobiotiques aux activités principales antioxydants et immunomodulatrices, puis antibactérienne a permis une amélioration des performances de croissance quelle que soit la densité d'élevage. Cette amélioration était due à une augmentation de l'ingéré et à une diminution de l'indice de consommation. Là encore l'ingestion de l'aliment contenant les phytobiotiques a conduit à des modifications du microbiote qui pourraient contribuer à expliquer l'amélioration des performances

zootechniques. L'efficacité des deux traitements alimentaires contenant les phytobiotiques étaient modifiée, quelle que soit la densité d'élevage, par le potentiel de croissance des animaux. Le premier traitement alimentaire a conduit à une plus forte amélioration de la croissance des petits animaux, tandis que le second traitement alimentaire a conduit à de meilleurs résultats chez les gros animaux, suggérant un impact de la génétique dans la réponse des animaux aux phytobiotiques.

Quatrième partie.

Discussion générale et perspectives

Comme nous l'avons déjà indiqué, l'objectif de ce travail de thèse était triple. Dans un premier temps, nous voulions valider que les mélanges de phytobiotiques utilisés pouvaient stimuler les performances de croissance de poulets de chair. Dans un deuxième temps, nous voulions déterminer dans quelle mesure les conditions d'élevage des animaux pouvaient influencer sur l'efficacité de ces facteurs de croissance. Enfin, nous voulions comprendre si une action des phytobiotiques sur le microbiote digestif des animaux était susceptible de contribuer à expliquer leur action de facteur de croissance.

Ce travail a nécessité le développement préalable dans le laboratoire de méthodes d'étude du microbiote digestif du poulet afin de mieux le caractériser, étape indispensable pour évaluer l'importance de l'impact des phytobiotiques sur sa composition (expérience 1).

Pour déterminer les conditions d'applications dans lesquelles les phytobiotiques utilisés entraînaient une amélioration réelle des performances de croissance des animaux, certains facteurs susceptibles de moduler l'efficacité de ces produits ont été caractérisés (expériences 2 et 3).

Enfin, pour déterminer si une action des phytobiotiques sur le microbiote digestif pouvait contribuer à expliquer leur action sur la croissance, des analyses zootechniques des animaux ont été conduites parallèlement à l'étude de leur microbiote (expérience 3).

Chapitre 1 – Analyse critique des approches d'étude du microbiote digestif

I. Echantillonnage des bactéries des contenus digestifs et du mucus

Nous avons étudié le microbiote digestif du poulet à partir de deux types d'échantillons nécessitant des méthodes de prélèvement très différentes : les contenus digestifs et le mucus digestif.

1.1. Contenus digestifs

Dans le jabot, l'extraction des contenus digestifs a été faite à l'aide d'une spatule stérile après ouverture longitudinale de l'organe. Dans l'iléon et les caeca, l'extraction a été faite par pression douce le long de la paroi externe de l'organe. La difficulté lors du prélèvement de contenus digestifs réside dans le risque de contamination des contenus par des bactéries colonisant le mucus à cause d'une érosion partielle de la couche externe du mucus sous la pression exercée sur l'organe. Cependant, cette érosion est vraisemblablement du même ordre d'importance que celle qui a lieu lors du déplacement du bol alimentaire le long du tractus digestif sous la pression des fibres musculaire de la muqueuse digestive. Les analyses effectuées par TTGE ont montré une différenciation nette entre le microbiote des contenus digestif et celui du mucus, ce qui suggère qu'il n'y a pas eu d'importantes contaminations d'un microbiote par l'autre.

1.2. Mucus

Comme évoqué dans l'introduction bibliographique, il existe plusieurs méthodes pour préparer des échantillons destinés à étudier le microbiote du mucus et des muqueuses digestives. Quand le microbiote est étudié par des approches moléculaires nécessitant une extraction d'ADN bactérien, les bactéries du mucus et de la muqueuse sont isolées des tissus digestifs soit par scrapping (raclage de la muqueuse intestinale à l'aide d'une lame de verre stérile par exemple), soit par l'action couplée d'un détergent et d'une agitation mécanique forte.

Une étude de Li et al., (2003) a montré que le scrapping entraîne des problèmes lors de l'utilisation des échantillons pour des PCR. Nos méthodes d'analyse du microbiote nécessitant une étape de PCR, nous avons exclu ce procédé et nous avons prélevé les échantillons selon la méthode décrite par Gong, et al., (2002a). Après avoir nettoyé le mucus par une agitation douce dans du sérum physiologique, cette méthode consiste à désagréger le réseau formé par le mucus en dénaturant les liaisons entre les mucines, à l'aide d'un détergent (tween 80) et d'une agitation mécanique. Cette méthode de séparation des bactéries du tissu intestinal et du mucus est rapportée décrocher 95% des bactéries adhérentes (Li, et al., 2003).

Ce choix méthodologique nous a permis d'amplifier avec succès l'ADNr 16S bactérien des échantillons de mucus. Le fait que les analyses effectuées par TTGE à partir de ces échantillons montrent une différenciation nette par rapport au microbiote des contenus digestif ce qui suggère que l'étape de lavage du mucus a permis d'éviter une contamination des échantillons par le microbiote des contenus digestif. Cependant, on ne peut exclure que cette étape ait en partie biaisé les résultats en entraînant une perte d'une partie du mucus non adhérent et des bactéries le colonisant. De plus, les bactéries récupérées sont séparées de la solution contenant du détergent par centrifugation. Lors de cette étape, il ne peut être exclu que les bactéries les plus petites soient éliminées, entraînant un léger biais dans la population récupérée. Pour limiter ce biais, des vitesses de centrifugation rapides ont été appliquées pendant des temps importants : 20 minutes à 27000G pour des volumes de 200ml et 40 minutes à 13000G pour des volumes de 2 ml.

II. Analyse moléculaire du microbiote

Les méthodes d'analyse moléculaire que nous avons utilisées permettent, par rapport à des méthodes culturales, l'étude de bactéries aussi bien cultivées que non cultivées ou non cultivables. Cependant, elles nécessitent une étape d'extraction ainsi que d'amplification de l'ADN bactérien et sont donc sujettes aux biais apportés par ces étapes.

2.1. Extraction d'ADN

L'objectif d'une extraction d'ADN bactérien est d'être la plus exhaustive possible et d'être la moins sélective possible de l'ADN bactérien extrait. Elle doit également permettre d'éliminer les molécules pouvant avoir une action inhibitrice sur la PCR (issues de l'échantillon ou introduites pendant l'extraction). En effet, chaque type de bactérie possède

une paroi spécifique entraînant une résistance différente à la rupture aux agents physiques, chimiques, ou enzymatiques. De plus, les milieux digestifs, en particulier les contenus digestifs, contiennent de très nombreuses molécules issues des aliments (polysaccharides, lipides, protéines ...) et des productions endogènes de l'animal (mucine, cellules desquamées, sécrétion ...). Ces différents composants peuvent modifier l'efficacité d'extraction de l'ADN, mais également l'efficacité des PCR. Les méthodes d'extractions doivent donc être adaptées à chaque type de milieu biologique, et chaque type de microbiote. Idéalement, il faudrait connaître la composition des matrices étudiées pour adapter la méthode d'extraction. Cependant, dans le cas des milieux digestifs, la connaissance de la composition n'est que parcellaire. De ce fait, les différentes équipes travaillant en écologie microbienne ont développé de très nombreuses méthodes, et ce de façon empirique. Certaines de ces méthodes s'appuient sur l'utilisation de kits commerciaux pour diminuer les temps d'extraction. Les grandes étapes de ces méthodes consistent à rompre les parois bactériennes par des méthodes enzymatiques, chimiques ou mécaniques, puis à éliminer les contaminants par différentes modalités.

Lors des travaux décrits dans ce manuscrit, le kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen Inc., Courtaboeuf, France) a été utilisé. Il consiste en une lyse chimique et enzymatique des bactéries suivie d'une purification de l'ADN par l'utilisation d'une matrice adsorbante préalablement à l'adsorption de l'ADN sur une colonne de silice. Ce kit est rapporté comme étant efficace pour étudier la diversité des écosystèmes digestifs (Li, et al., 2003; Nordgard, et al., 2005). Plusieurs approches empiriques ont été tentées pour en augmenter l'efficacité d'extraction. Nous avons essayé d'ajouter une étape de broyage mécanique pour favoriser la rupture des membranes bactériennes, mais sans obtenir de résultats concluant. Pour les extractions d'échantillon de mucus conduisant à des quantités d'ADN extrait très faibles, nous avons concentré les extraits en déposant sur les colonnes de silice, utilisées pour purifier l'ADN, des volumes d'extraction supplémentaire. Les volumes ont été choisis pour ne pas saturer les colonnes, en s'assurant que les proportions entre volume déposé et quantité d'ADN récupérées étaient maintenues.

Par la suite, pour augmenter l'exhaustivité des extractions d'ADN dans le but de procéder à des analyses quantitative du microbiote digestif, nous avons utilisé le kit G'NOME® kit (BIO 101, La Jolla, USA) selon une méthode modifiée par Furet, et al., (2009). Cette méthode associe une lyse chimique et mécanique des bactéries a une

purification de l'ADN par des cycles de solubilisation / précipitation après adsorption des impuretés sur du polyvinylpolypyrrolidone. Elle a été retenue car elle conduit à une efficacité d'extraction similaire à celle de Godon et al., 1997 qui permet une extraction très exhaustive de l'ADN bactérien issu de contenus digestifs (Furet, et al., 2009), en un temps plus court.

2.2. Empreinte moléculaire par TTGE

2.2.1. Choix des amorces

Nous avons choisi de réaliser l'analyse globale du microbiote digestif par TTGE en nous focalisant uniquement sur les bactéries car elles constituent la population de microorganismes la plus abondante de cet écosystème (Kim et Mundt, 2011). Elle nécessite une étape d'amplification de l'ADN bactérien, réalisée avec des amorces ciblant spécifiquement les bactéries.

Le choix des amorces utilisées pour cette étape est important car il conditionne les profils de migration obtenus. En effet, seuls migrent des fragments d'ADN appartenant à des espèces bactériennes reconnues par les amorces ciblées. Nous avons choisi d'utiliser le couple d'amorces proposé par Zoetendal, et al., (1998) qui ciblent la région V6-V8 de l'ARNr 16S bactérien. Or, cibler cette région lors d'analyse par empreinte moléculaire permet d'obtenir un compromis intéressant entre des profils de migration riches, et des fragments d'ADN assez longs pour être identifiés, 433 pb (Yu and Morrison, 2004). Cependant toutes les études n'aboutissent pas aux mêmes conclusions sur l'intérêt de cette région pour mettre en évidence la richesse d'une population bactérienne. Ainsi, Huws et al., (2007) obtiennent une richesse et une diversité bactérienne plus importante avec la région V6-V8 qu'avec la région V3, alors que Yu et Morrison, (2004) montrent l'opposé. D'autres régions que la V6-V8 peuvent également s'avérer informatives, telles que les régions V3 et V6 qui permettent une bonne identification des séquences (Wuse et al., 2008).

2.2.2. Analyse des données

La migration des fragments d'ADN se faisant sur gel, elle peut être soumise à des biais de coloration. En effet, même en standardisant la méthode de révélation des gels, il y a des variations dans la quantité d'agent intercalant pénétrant dans le gel, ainsi que dans l'intensité de l'exposition aux ultraviolets. En comparant des échantillons ayant migré sur des gels

différents, on ne peut donc pas prendre en compte l'intensité de coloration, mais seulement la position des bandes. Cela engendre une limitation importante dans l'utilisation de cette méthode, puisque 12 échantillons seulement peuvent migrer simultanément. De plus, pour les analyses inter-gel, lorsque les données des profils sont transformées en données de type « présence/absence », ou lorsque un indice de diversité est calculé, il faut définir des pics correspondant à la migration d'un fragment d'ADN, à partir des courbes d'intensité de coloration. Cette étape, comporte une part de subjectivité. En effet, il faut paramétrer le logiciel afin de détecter ces pics d'intensité, et la validation de ce paramétrage se fait de manière visuelle en vérifiant que les pics mis en évidence correspondent aux bandes observées sur la photographie du profil TTGE.

De plus, comme toutes les méthodes d'empreinte moléculaire, la TTGE peut être soumise à des biais liés à la co-migration de certains fragments d'ADN ayant des séquences différentes (Muyzer and Smalla, 1998) et à l'existence d'une hétérogénéité intra-spécifique de l'ADNr 16S qui peut entraîner l'apparition de plusieurs bandes pour une même espèce bactérienne (Muyzer and Smalla, 1998).

2.2.3 Bilan

Malgré ses limites, cette approche s'est avérée pertinente pour mettre en évidence une structuration spatiale du microbiote dans les différents organes du tractus digestif mais aussi suivre son évolution sur une période d'élevage, ainsi que pour étudier les différences globales du microbiote digestif d'animaux subissant différents traitements (aliments, conditions d'élevage).

2.3. Quantification par PCR en temps réel

Nous avons, dans un second temps, choisi de quantifier les bactéries majoritaires du microbiote digestif du poulet par une approche indépendante de la culture, la PCR quantitative en temps réel. L'objectif était de déterminer si ces groupes bactériens numériquement importants étaient sensibles aux différents traitements appliqués aux animaux. La PCR en temps réel permet aussi bien de quantifier des groupes phylogénétiques que des espèces bactériennes. Cette quantification ne peut cependant pas être qualifiée d'absolue. En effet, elle est sensible à la matrice dont est issu l'ADN car celle-ci apporte des concentrations

variables d'inhibiteurs. Elle dépend également du couple d'amorces utilisé, déterminant la spécificité de la réaction, mais également jouant sur son efficacité.

2.3.1. Choix des groupes bactériens

Cinq groupes phylogénétiques, auxquels appartiennent la majorité des bactéries des contenus digestif et du mucus du poulet, ont été sélectionnés: les lactobacilles et bactéries apparentées, *E.coli*, les *Bacteroides* et *Prevotella*, les bactéries apparentées à *Clostridium leptum* et enfin les bactéries apparentées à *Clostridium coccoïdes* (Bjerrum, et al., 2006; Lu, et al., 2003). D'autres groupes bactériens sont quantitativement ou fonctionnellement importants, comme les *Enterococcus* dans les contenus digestifs ou les pathogènes opportunistes. Par conséquent, notre approche, compte tenu du nombre d'échantillons à traiter et du temps de mise au point nécessaire pour optimiser les réactions de PCR, n'est pas exhaustive, mais nous permet tout de même d'étudier et de quantifier les cinq groupes bactériens paraissant les plus importants.

2.3.2. Choix du système qPCR : Taqman ou SybrGreen

Le système TaqMan nécessite l'utilisation de 2 amorces et d'une sonde, ce qui rend difficile leur dessin. En effet il faut être capable de trouver une zone de l'ADNr 16S qui permette le dessin de ces sondes et amorces de manière à ce qu'elles soient capables de s'hybrider à l'ADN de la majorité des organismes du groupe ciblé, sans s'hybrider à l'ADN d'organismes extérieurs à ce groupe. De plus, le dessin de ces sondes et amorces doit répondre à de nombreuses contraintes concernant leur longueur, leur composition en bases (température d'hybridation homogène, pas de bases trop répétées,...), la longueur du fragment amplifié, le positionnement de la sonde par rapport aux amorces... Cependant ce système présente l'avantage d'être beaucoup plus spécifique que le système SybrGreen, ce dernier imposant moins de contraintes lors du dessin des amorces et étant moins couteux. Cependant il demande beaucoup plus de temps en mise au point et en vérification de spécificité *in vitro*. Le système TaqMan a été retenu pour l'analyse des bactéries totales tandis que le système SybrGreen a été choisi pour cibler les groupes bactériens spécifiques.

2.3.3. Choix des amorces / sondes

Les amorces utilisées dans les travaux présentés dans ce manuscrit sont issues de la littérature. Nous avons fait le choix d'utiliser des amorces issues de la littérature et déjà utilisées dans le laboratoire pour plusieurs raisons :

- Le dessin *in silico* d'amorces destinées à étudier des groupes bactériens au sein de populations bactériennes plus large est complexe, car comme évoqué précédemment, de nombreux paramètres doivent être pris en compte en plus de leur spécificité et taux de couverture.
- Les vérifications de spécificité *in silico* ne sont pas suffisantes, des vérifications complémentaires *in vitro* doivent être effectuées (Morales et al., 2009). Ces vérifications nécessitent la culture de nombreuses espèces bactériennes appartenant aux différents groupes bactériens ciblés. Or les laboratoires dans lesquels ont été effectuées les analyses ne disposent pas des installations nécessaires.

Le dessin d'amorce se fait en fonction des connaissances disponibles de la séquence des ARN 16S bactériens. Comme les connaissances dans ce domaine sont en constant développement, il est préférable d'utiliser des amorces de dessin récent ou du moins dont la spécificité et le taux de couverture *in silico* ont été vérifiés récemment. Par ailleurs, les jeux d'amorces employés conduisent à l'amplification de fragments PCR de taille importante (>300 pb), ce qui peut réduire l'efficacité de PCR (Ludwig et Schleifer, 2000) et induire un biais dans les résultats.

2.3.4. Efficacité de PCR : présence d'inhibiteur de PCR dans les échantillons

Pour parvenir à une quantification précise des groupes ciblés au sein d'un échantillon, il est nécessaire de supprimer les phénomènes d'inhibition de PCR qui peuvent avoir lieu notamment en raison de la présence d'inhibiteurs de polymérases dans les extraits d'ADN. Pour réduire la quantité d'inhibiteurs dans une réaction de PCR, l'extrait d'ADN à amplifier est dilué avant d'être introduit dans le mélange réactionnel (Wilson, 1997). Cependant en diluant ainsi l'échantillon, le seuil de détection de la réaction est détérioré. En effet, la PCR en temps réel permet en théorie la quantification de l'ADN à partir d'une seule molécule introduite dans le volume réactionnel. Ainsi, un groupe bactérien ne pourra être détecté que si après dilution de l'échantillon, au moins une copie d'ADNr 16S reste présente dans le volume

de solution d'ADN utilisé dans la réaction. Cela peut poser problème dans le cas des groupes bactériens minoritaires présent en faible concentration dans les échantillons analysés. Un compromis doit donc être trouvé entre présence d'inhibiteur et seuil de détection. De plus, l'amplification des groupes bactériens minoritaires peut être limitée par la présence de l'ADN des autres groupes bactériens comme montré par Ludwig et Schleifer, (2000).

2.3.5. Expression des résultats

Les résultats de PCR quantitative sont exprimés en copies d'ADNr 16S, ce qui ne représente pas directement le nombre de cellules bactériennes, puisque le nombre de copies par chromosome bactérien de cette séquence d'ADN varie d'une espèce bactérienne à l'autre (Lee et al., 2009). De plus, selon le cycle cellulaire de l'espèce bactérienne considérée, le statut physiologique et la phase de croissance des bactéries, le génome bactérien peut présenter une polyploïdie partielle à un temps t, ce qui peut engendrer une variation dans le nombre de copie d'ADNr16S par cellule.

2.3.6. Bilan

La PCR en temps réel ne conduit pas à une quantification absolue des différentes espèces bactériennes présentes dans un échantillon. En revanche elle permet de connaître l'abondance relative de groupes bactériens entre échantillons de même type obtenus dans des conditions comparables. De plus, elle permet, une fois les phases de mise au point terminées, de traiter rapidement un grand nombre d'échantillons (une plaque de 384 puits est préparée et amplifiée en quelques heures).

Résumé

La TTGE et la PCR en temps réel permettent d'étudier un microbiote en s'affranchissant des limitations liées aux méthodes culturales. Cependant elles ont elles aussi leurs limites qui peuvent engendrer des biais dont il faut avoir conscience lors de l'interprétation des résultats.

Ces deux méthodes nécessitent une étape d'extraction d'ADN qui va déterminer la population bactérienne réellement caractérisée. Cette étape se doit d'être la plus spécifique et la moins sélective possible afin que la population étudiée soit proche de la population bactérienne réellement présente dans l'échantillon. Ces méthodes sont toutes deux basées

sur une amplification de l'ADN d'une population ciblée. Le choix des amorces est donc extrêmement important pour que les ADN ciblés soient spécifiques du groupe bactérien cible, et couvrent le maximum d'espèces appartenant à ce groupe. La principale limitation propre à la TTGE réside dans le fait que seuls 12 échantillons peuvent être analysés sur un même gel, or les méthodes de comparaison d'échantillons placés sur des gels différents entraînent une perte d'information. Concernant la PCR en temps réel, le système utilisé joue un rôle dans la spécificité des résultats obtenus. De plus, cette méthode permet de quantifier le nombre de copies d'ADNr 16S ciblé, ce qui n'est pas directement transposable en nombre de bactéries présentes appartenant à ce groupe, du fait du nombre variable de copies d'ADNr 16S par cellule.

Ces deux méthodes permettent d'accéder à une information très différente. La TTGE permet d'étudier un écosystème et ses évolutions de manière globale. Au contraire la PCR en temps réel, permet une approche quantitative de groupes ou d'espèces ciblée. Ainsi, malgré leurs limites respectives, l'utilisation complémentaire de ces deux méthodes permet d'obtenir une vision assez complète d'un écosystème digestif bactérien.

Chapitre 2 – La dynamique temporelle et la structuration spatiale du microbiote digestif du poulet doivent-elles être prises en compte lors de l'étude de ses modifications ?

I. Structuration spatiale du microbiote digestif

1.1. Connaissance de la structuration spatiale

1.1.1. Le long du tractus digestif

Les deux expérimentations menées sur le microbiote digestif du poulet (essais 1 et 3) nous ont permis de confirmer l'existence d'une évolution spatiale de celui-ci le long du tractus digestif, ce qui a déjà été observé par d'autres études (Lu, et al., 2003; van der Wielen, et al., 2002). Cette évolution se caractérise par la présence d'espèces bactériennes différentes selon les organes, et surtout une abondance relative des différentes espèces et groupes phylogénétiques propres à chaque organe. La figure 29 illustre les degrés de proximité des profils TTGE d'échantillons provenant de contenus digestifs d'animaux âgés de 3 et 6 semaines élevés à 12 animaux/m². Elle met en évidence pour chacune des expérimentations des regroupements de profils par organe. Un premier cluster correspond aux échantillons de jabot, deux autres correspondent aux échantillons d'iléon, et enfin, un quatrième correspond aux échantillons de caeca. Dans le jabot environ 10¹² copies d'ADNr 16 S /g de digesta, correspondant majoritairement à des bactéries apparentées aux lactobacilles. Dans l'iléon, environ 10¹¹ copies d'ADNr 16 S /g de digesta ont pu être quantifiées, majoritairement apparentées aux lactobacilles. Enfin, dans les caeca, de 10¹² à 10¹³ copies d'ADNr 16 S /g de digesta ont été détectées, elles étaient majoritairement apparentées aux *Clostridium*, *Lactobacillus* et *Bacteroides*. Ainsi, de l'entrée vers la sortie du tractus digestif la part de bactéries anaérobies strictes augmente alors que la pression partielle en oxygène diminue (He et al., 2009). La spécificité du microbiote en fonction de sa localisation le long du tractus s'explique par les paramètres environnementaux propres à chaque organe et par les fortes variations de composition des substrats disponibles, liées aux caractéristiques du digesta,

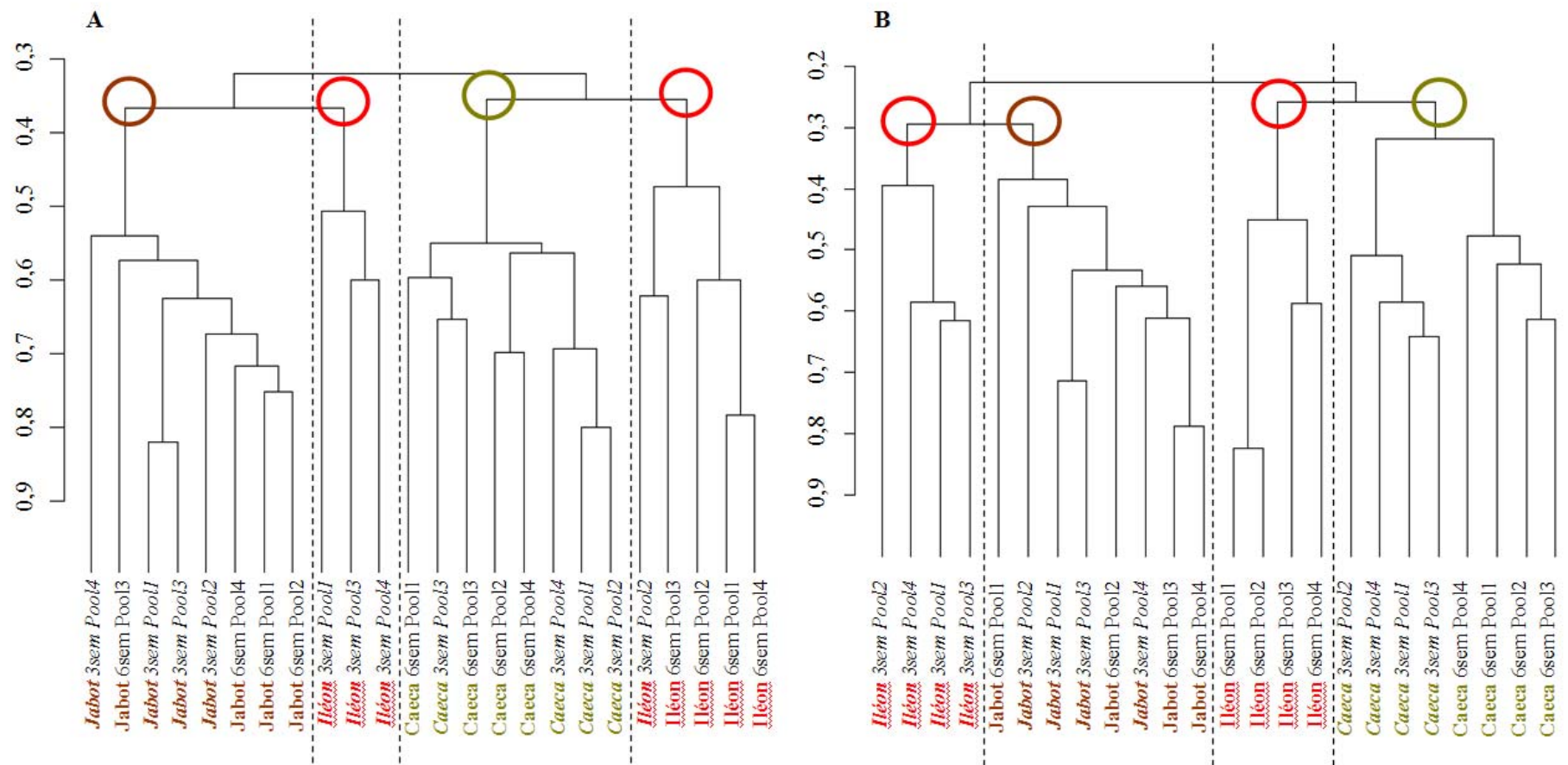


Figure 29 : Représentation par dendrogramme de l'analyse de similarité du microbiote des contenus digestifs de poulets de 3 et 6 semaines
 A. animaux issus de l'expérience 1, B. animaux issus de l'expérience 3. Les embranchements des arbres correspondant à des échantillons provenant du jabot sont entourés par des cercles marron, ceux de l'iléon par des cercles rouges, et ceux des caeca par des cercles verts. L'échelle en ordonnées représente le degré de similarité de Dice (échantillons identiques 1, échantillons totalement différents 0)

1.1.2. Au sein de chaque organe

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence une structuration spatiale du microbiote au sein de chacun des segments digestifs étudiés, selon un axe mucus-lumen. Ainsi, l'étude par TTGE réalisée sur les échantillons de l'expérimentation 1 a révélé que dans chaque segment digestif, le microbiote du mucus a une structure différente de celui des contenus digestifs. Là encore, les différences observées entre localisations sont vraisemblablement liées aux caractéristiques de chaque biotope et à l'adaptation des bactéries à ces différents milieux. Dans le mucus, la part de substrats endogènes, tels que les mucines, est plus importante que dans les contenus digestifs. La pression partielle en oxygène est plus élevée (Marteyn, et al., 2010) et le pH plus proche de la neutralité (Allen and Flemström, 2005) dans le mucus que dans les contenus. De plus, toutes les espèces bactériennes ne sont pas capables d'adhérer aussi efficacement au mucus, ce qui peut en partie expliquer les différences entre microbiote des contenus et du mucus, et plus particulièrement la plus faible diversité observée dans le mucus.

1.2. Impact sur l'étude des facteurs de variation du microbiote

Le microbiote digestif du poulet est structuré dans l'espace, non seulement le long du tractus digestif, mais aussi au sein de chaque organe. Or, la sensibilité des bactéries à des modifications environnementales varie d'une espèce à l'autre. Par conséquent, une modification de l'environnement peut favoriser la croissance de certaines espèces au détriment d'autres. Plusieurs facteurs propres à chaque espèce vont déterminer leur adaptation à un milieu, notamment le taux de croissance, les besoins énergétiques, l'affinité pour les substrats, ou la capacité de résistance aux conditions environnementales (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007d ; Louis et O'Byrne, 2010). La structuration spatiale du microbiote digestif souligne donc l'importance de considérer plusieurs localisations lorsqu'on étudie les modifications du microbiote par différents facteurs tels que des facteurs génétiques ou des modifications environnementales (conditions d'élevage, alimentation). En effet, il est peu probable que des populations bactériennes différentes réagissent de la même manière à un facteur modifiant la nature de leur biotope. Un facteur externe à l'animal, comme par exemple un changement de la composition de l'aliment, ne modifiera donc pas de la même manière les caractéristiques du digesta dans tous les segments digestifs.

La nature des interactions entre microorganismes et hôte varie selon la localisation dans le tractus digestif. Ainsi, alors que le microbiote digestif agit de manière globale sur la croissance et la santé de l'hôte, des spécificités se dégagent selon la localisation. Par exemple, dans le jabot, les populations de lactobacilles ont un rôle important dans l'initiation de la digestion des glucides, alors que dans l'intestin grêle, les bactéries sont en concurrence directe avec l'hôte pour l'utilisation des nutriments, et peuvent donc réduire la digestibilité des lipides. Dans les caeca, certaines populations bactériennes peuvent avoir un rôle positif dans le métabolisme énergétique de l'hôte en produisant des acides gras volatils. De plus les bactéries colonisant le mucus doivent jouer un rôle important sur la santé de l'hôte en empêchant une colonisation des muqueuses par des bactéries pathogènes. Pour comprendre comment un facteur extérieur à l'animal peut avoir un effet sur celui-ci via son action sur le microbiote, il est donc important de pouvoir suivre les modifications du microbiote dans les différents segments digestifs. De plus, pour comprendre par quels mécanismes le microbiote digestif est modifié par ces facteurs externes, il est important de pouvoir estimer leurs effets sur le biotope. L'idéal serait donc d'effectuer en parallèle une caractérisation du biotope (pH, pO₂, potentiel d'oxydoréduction, composition, temps de rétention) et du microbiote. L'ensemble de ces mesures est cependant très contraignante à réaliser sur les mêmes animaux. En effet, certaines mesures requièrent des quantités de digesta importantes, pas forcément disponibles chez de jeunes animaux, et augmentent les risques de contamination du microbiote.

II. Evolution temporelle

2.1 Connaissance de l'évolution temporelle

Une diminution de la variabilité interindividuelle du microbiote a été observée au cours de la période d'élevage dans la majorité des sites de prélèvement. La forte variabilité observée entre les jeunes poussins pourrait s'expliquer d'une part par le fait que la génétique influence la composition du microbiote (Zoetendal et al., 2001 ; Konzak et al., 2011) mais aussi par le fait que les premières bactéries rencontrées par l'animal sont soumises au hasard, comme proposé par Curtis et Sloan (2004). Avec l'âge, les animaux étant placés dans un environnement contenant une charge bactérienne importante (fèces, litière, air, eau, aliment), celui-ci va jouer un rôle important dans la composition du microbiote, comme cela a pu être montré dans d'autres études (Mulder et al., 2009 ; Yin et al., 2010). De plus, les animaux étant

placés dans le même bâtiment d'élevage équipé d'une ventilation dynamique, nourris avec le même aliment et abreuvés à la même eau, il est raisonnable de supposer que les populations bactériennes de leur environnement direct sont peu différentes, ce qui induirait une homogénéisation du microbiote avec l'âge.

De plus, comme le montrent les résultats des analyses des profils TTGE et les variations quantitatives des différents groupes bactériens ciblés par PCR en temps réel, les travaux présentés dans ce manuscrit ont confirmé l'existence d'une dynamique temporelle du microbiote, comme déjà observée par ailleurs (Lu, et al., 2003; Torok, et al., 2007). Ceci s'illustre, par exemple, par la formation de clusters par âge, comme observés dans une représentation en dendrogramme des proximités entre profils TTGE (Figure 29). Dans l'expérience 1, le regroupement par âge des profils TTGE est particulièrement visible pour les contenus digestifs de l'iléon alors que dans l'expérience 3, ces résultats sont très marqués dans l'iléon mais aussi dans les caeca. Ces modifications peuvent s'expliquer par plusieurs facteurs, liés aussi bien à l'évolution naturelle de l'écosystème digestif vers un état de stabilité, qu'aux changements de caractéristiques du biotope dus à la croissance des animaux. Par exemple, Palander, et al., (2010) ont observé un accroissement du temps de transit du digesta avec l'âge, ce qui pourrait permettre une multiplication des cellules bactériennes plus importante avant leur élimination par le transit digestif. D'autres paramètres du biotope sont également fortement modifiés par la croissance des animaux, tels que la composition du digesta qui évolue au cours de la digestion, ou encore la maturation du tractus digestif qui entraîne des changements de digestibilité des nutriments et des modifications de sécrétions endogènes (Iji, et al., 2001).

2.2. Impact sur l'étude des facteurs de variation du microbiote

La variabilité interindividuelle du microbiote digestif du jeune poussin s'est avérée plus importante que celle de poussins plus âgés. Pour avoir une vision représentative du microbiote digestif d'une population de jeunes permettant la mise en évidence de variations liées à un facteur donné, un nombre plus important d'animaux devra donc être utilisé.

La composition du microbiote digestif variant d'un âge à l'autre, un même facteur appliqué à différents âges peut avoir des effets différents. A la vue de ces résultats, il apparaît intéressant de caractériser la nature (absence de réponse, perturbation avec retour à l'état initial ou perturbation sans retour à l'état initial) et la vitesse de la réponse du microbiote

digestif du poulet face à différentes perturbations (changement de composition de l'aliment, utilisation de molécules antibactériennes dans l'aliment, modes d'élevage défavorable à l'animal...) selon la période de vie de l'animal. Les résultats de ces études pourraient non seulement apporter un nouvel éclairage sur la dynamique du microbiote digestif du poulet, mais également être pris en compte dans les études visant à contrôler le microbiote digestif dans un sens favorable aux performances de croissance des animaux. En effet, cela pourrait contribuer à déterminer à quelle période le microbiote digestif est le plus susceptible d'être modifié efficacement sans entraîner d'effets néfastes sur la santé des animaux.

Pour mener de telles études, l'idéal serait de suivre l'évolution du microbiote digestif d'un même animal au cours du temps. Chez le poulet, cela est nettement plus compliqué que pour les gros mammifères monogastriques, pour lesquels des canules sont utilisées pour prélever régulièrement des contenus digestifs. Une alternative est l'étude du microbiote digestif des fientes cloacales. Cela permet de suivre l'effet d'un facteur sur la croissance et le microbiote d'un animal tout au long de sa durée d'élevage. Cependant cette méthode présente aussi des limites car elle ne permet de travailler que sur le microbiote cloacal, qui diffère de celui des autres segments digestif.

Résumé

L'étude du microbiote digestif du poulet nous a permis de mettre en évidence son évolution spatiale et temporelle ainsi que sa structuration au sein des différents organes. Le microbiote digestif ne peut donc pas être résumé aux populations présentes dans un seul segment digestif, ou une seule localisation, mucus ou contenus. De plus, la dynamique temporelle affecte à la fois la composition du microbiote qui évolue au cours de la vie de l'animal, mais aussi sa variabilité interindividuelle. Les dynamiques spatiale comme temporelle devraient être prises en compte lors de l'étude des modifications du microbiote par des facteurs externes. En effet, des populations bactériennes différentes ne seront pas modifiées de la même façon suite à un changement de leur environnement. De plus, la forte variabilité interindividuelle du microbiote chez le jeune animal doit être prise en compte dans les choix des effectifs échantillonnés lors d'études portant sur cette période de vie.

Chapitre 3 – Peut-on mettre en évidence des facteurs liés aux conditions d'élevage ou à l'animal ayant un impact sur l'efficacité des phytobiotiques ?

I. Les conditions d'élevage

Plusieurs travaux suggèrent un impact des conditions d'élevage sur l'efficacité de différents additifs facteurs de croissance dont les antibiotiques (Orban, et al., 1997; Ravindran, et al., 2006), ces différents additifs se révélant plus efficaces lorsque les conditions d'élevage ne sont pas favorables à l'amélioration des performances de croissances. Nous avons voulu déterminer si un phénomène similaire pouvait être mis en évidence avec les phytobiotiques utilisés au cours de la thèse. Pour cela, des phytobiotiques ont été utilisés en faisant varier, d'une part les conditions post-éclosion des animaux, et d'autre part la densité d'élevage des animaux au sein d'une même expérience.

1.1. Validation des modèles utilisés

1.1.1. Conditions post -éclosion

Deux conditions post-éclosion ont été utilisées dans le cadre de deux essais indépendants. Dans l'expérience 2, nous avons cherché à réduire l'impact négatif du jeûne post-éclosion et du transport sur la croissance (Noy and Sklan, 1999; Suzuki, et al., 2008) en utilisant des animaux incubés 21j (au lieu de 22j) et ayant éclos dans un couvoir expérimental situé sur le site d'élevage. Dans l'expérience 3, aucune mesure particulière n'a été prise pour diminuer ce jeûne (animaux incubés 22j et éclos dans un couvoir industriel situé à 150km du lieu d'élevage).

En l'absence de phytobiotique, les performances de croissance des animaux issus de l'expérience 2 étaient numériquement supérieures à celles des objectifs d'élevage de la souche utilisée, alors que les performances des animaux de l'expérience 3 étaient inférieures (Figure 30). Les plus faibles performances de croissance des animaux de l'expérience 3 pourraient en partie être liées aux conditions post-éclosion : long jeûne post-éclosion et stress lié au

transport. Néanmoins, les deux expériences ayant été conduites sur 2 sites différents, d'autres facteurs liés au lieu d'élevage pourraient aussi avoir contribué à ces différences de croissance. Il est également à noter que la variance des poids des animaux était plus faible lors de l'expérience 2 que lors de l'expérience 3 (Tableau 25). Cela est probablement lié aux mesures mises en place lors de cet essai pour réduire le jeûne post-éclosion. En effet, dans des conditions industrielles telles que celles rencontrées dans l'expérience 3, la sortie des poussins du couvoir se fait généralement après 22 jours d'incubation, afin d'augmenter le nombre d'œufs éclos. De ce fait, il peut s'écouler plus de 24h entre l'éclosion des premiers poussins et celle des derniers. Or, la durée du jeûne post-éclosion ayant des conséquences importantes sur la croissance ultérieure des animaux (Noy and Sklan, 1999; Suzuki, et al., 2008), cette forte variabilité explique probablement le fait que la variance des poids des animaux élevés dans les conditions de l'expérience 3 soit plus importante.

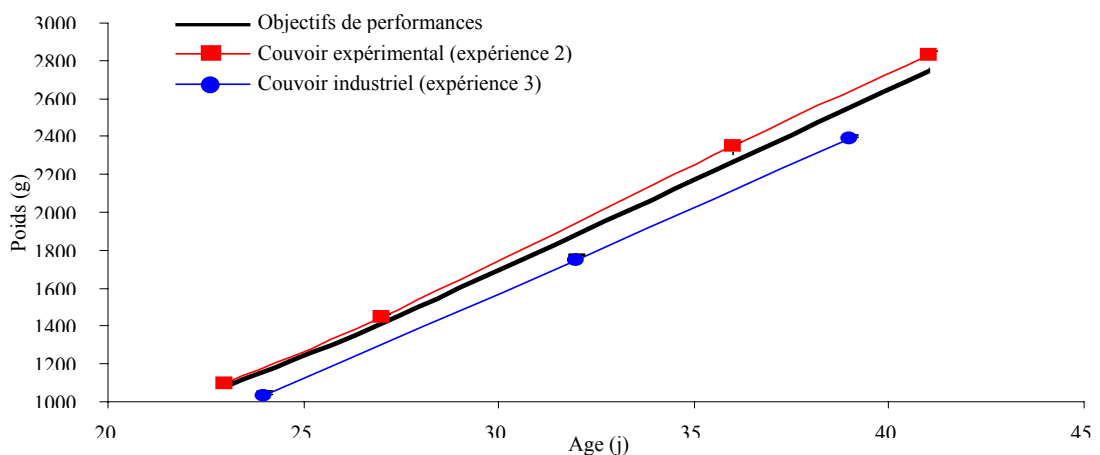


Figure 30 : Comparaison des courbes de croissances des groupes témoins éclos dans un couvoir expérimental situé sur le lieu d'élevage ou industriel situé à 150 km du lieu d'élevage et élevés à 12 animaux/m², par rapport à celle des objectifs de performances de la souche Ross PM3.

Tableau 25 : Effet des conditions post éclosion sur la variance des poids des animaux à 23 et 24 jours.

Traitement alimentaire	Expérience 2, couvoir expérimental (poids 23j)			Expérience 3, couvoir industriel (poids 24j)			Expérience 2 vs Expérience 3 (poids 23-24j)	
	Effectif	Moyenne	Variance	Effectif	Moyenne	Variance	Ratio des variances Expérience 2 vs Expérience 3	Valeur de P
Témoin	253	1100	13872	194	1033	22492	0,616	<0,001
Exp1	251	1110	14622	197	1060	21866	0,669	<0,01
Exp2	253	1099	14812	192	1055	20480	0,723	0,02

Exp1 : EXVa (1 kg/t) 22-39j ; Exp2 : EXVb (0,3 kg/t) 0-10j, EXVa (0,8 kg/t) 10-22j et EXVa (1 kg/t) 22-39j

1.1.2. Densité d'élevage

L'impact négatif de l'augmentation de la densité sur les performances de croissances des animaux recevant un traitement témoin ne contenant pas de phytobiotique a pu être validé au cours de deux essais (expériences 2 et 3). L'augmentation de la densité d'élevage s'est donc avéré un modèle pertinent de dégradation des conditions d'élevage.

1.2. Effet des phytobiotiques selon les conditions d'élevage

1.2.1. Condition post-éclosion

Les modifications des performances zootechniques des animaux par les phytobiotiques se sont avérées différentes selon les conditions post-éclosion. Dans des conditions post-éclosions optimisées pour favoriser la croissance ultérieure des animaux (expérience 2), les phytobiotiques ont entraîné une augmentation de l'IC de l'ordre de 1 %. Dans des conditions post-éclosion proches des conditions commerciales (expérience 3), les phytobiotiques ont amélioré les performances zootechniques des poulets de manière variable selon la densité d'élevage, de 1% pour l'IC et allant de 0 à 6% pour le GMQ.

1.2.2. Densité d'élevage

L'effet de la densité d'élevage sur l'efficacité des phytobiotiques s'est révélé différent selon l'essai considéré. L'analyse des données de l'expérience 2 n'a montré aucun effet des phytobiotiques sur le poids ou gain de poids des animaux quelle que soit la densité d'élevage. En revanche, lors de l'expérience 3, une interaction entre densité d'élevage et traitement alimentaire a été mise en évidence sur la croissance des animaux. Ainsi, lorsque les animaux étaient élevés à 12 animaux/m², les deux traitements expérimentaux ont montré un effet

bénéfique similaire sur la croissance, tandis qu'à 17 animaux/m² seul le traitement Exp2 s'est avéré efficace.

1.2.3. Lien entre niveau de performances et efficacité des phytobiotiques

Les phytobiotiques utilisés dans le cadre de ces travaux n'ont pas eu d'effet positif sur les animaux dont les performances de croissance étaient déjà élevées en lien avec un jeûne post-éclosion réduit (expérience 2). Au contraire, ils se sont avérés bénéfiques dans le cas où les performances de croissance des animaux étaient plus faibles et le jeûne post-éclosion plus important (expérience 3). Cependant, quand les conditions d'élevage étaient très dégradées, jeûne post-éclosion important et densité d'élevage élevée, ces additifs, bien que bénéfiques pour certains, n'étaient pas suffisants pour permettre aux animaux de rattraper les objectifs d'élevage.

Les résultats obtenus dans le cadre des essais 2 et 3 suggèrent donc que, comme cela a été proposé pour les AFC (Ravindran, et al., 2006), les phytobiotiques utilisés n'améliorent pas la croissance des animaux quand elle est déjà proche de leurs limites physiologiques, mais que ces composés peuvent permettre une amélioration des performances zootechniques des animaux dont la croissance est inférieure. Cependant, quand les conditions d'élevage continuent de se dégrader, des facteurs supplémentaires doivent limiter la croissance des animaux, qui ne sont que peu ou pas levés par l'utilisation des phytobiotiques dans l'alimentation (Figure 31).

Ainsi, il a pu être mis en évidence que, comme cela avait déjà été observé pour d'autres types d'additifs alimentaires, les conditions d'élevage modulent l'efficacité des phytobiotiques. Cela explique vraisemblablement une partie des différences rapportées dans la littérature concernant l'efficacité zootechnique de ces produits, puisque les conditions d'élevage dans lesquelles ces études ont été réalisées ne sont pas standardisées.

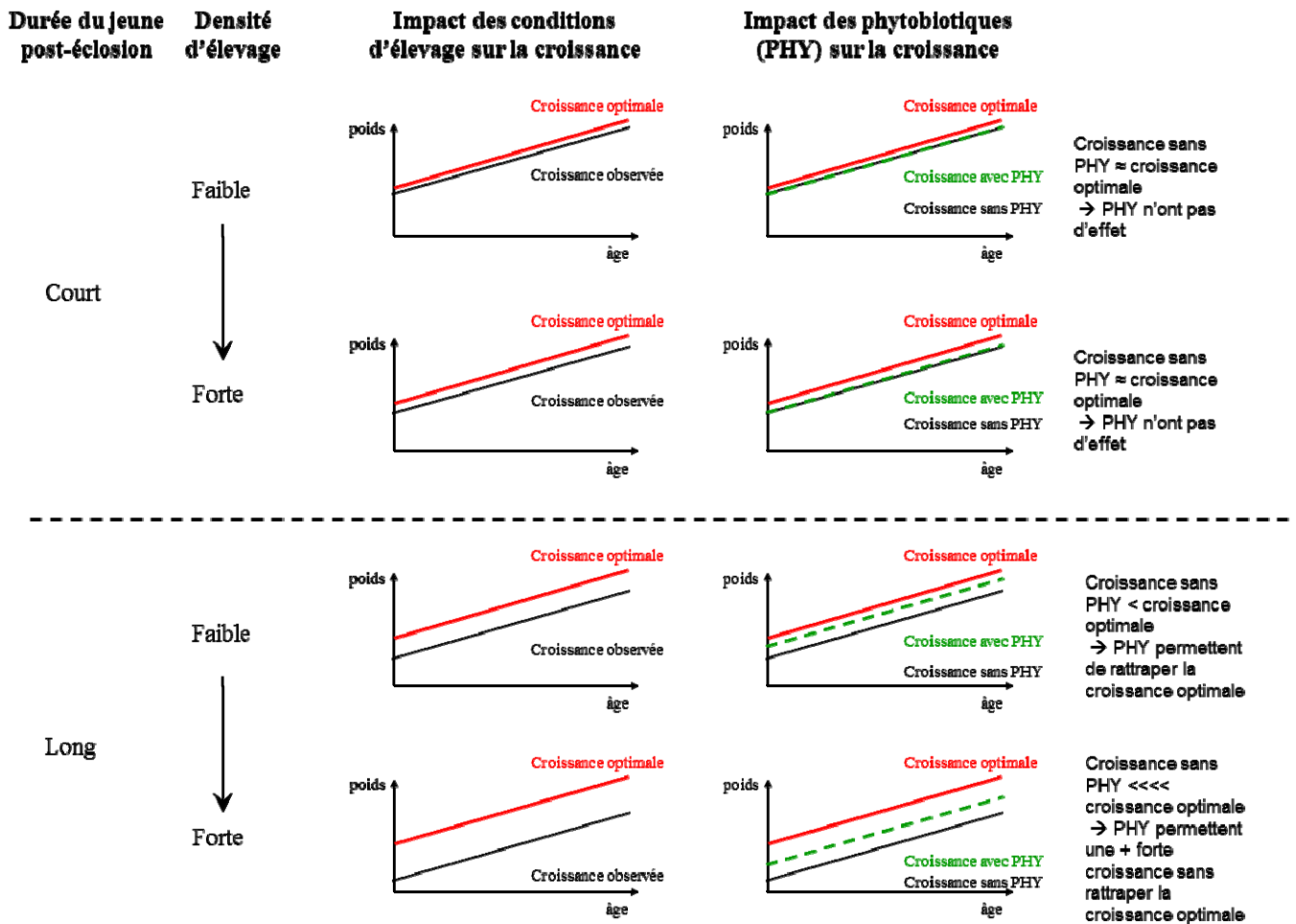


Figure 31 : Schéma récapitulatif de l'effet des conditions d'élevage sur l'efficacité des phytobiotiques utilisés

Un jeune post éclosion limité permet des performances de croissance proches des performances optimales, rendant l'usage des phytobiotiques inutiles. Dans ces conditions une augmentation de la densité d'élevage diminue les performances de croissance, elles restent cependant trop proche de leur optimum pour que les phytobiotiques soient efficaces. Un jeune long post éclosion diminue les performances de croissance par rapport à l'optimum et l'utilisation de phytobiotiques permet alors de compenser cette baisse de performances. Dans les conditions où une augmentation de la densité d'élevage diminue d'autant plus les performances de croissance, les phytobiotiques ne suffisent alors plus à compenser la baisse de performance par rapport à la croissance optimale.

II. Le potentiel de croissance des animaux

2.1. Avantages et limites de l'utilisation d'un indicateur du potentiel de croissance comme facteur génétique

Le potentiel de croissance des animaux correspond au niveau de croissance qu'ils pourraient exprimer dans une situation d'élevage idéale (apport nutritionnels optimaux, pas de pression sanitaire ou de stress, ...). Un phénotype, comme par exemple le poids vif ou le gain de poids, est déterminé par des facteurs génétiques et environnementaux. Le potentiel de croissance représente la part de génétique déterminant la croissance. En effet, il correspond à une situation théorique dans laquelle on considère que l'environnement n'intervient pas dans le déterminisme phénotypique. Etudier la réponse des animaux à différents facteurs environnementaux en fonction de leur potentiel de croissance permettrait donc d'évaluer la part de génétique impliquée dans cette réponse. Plusieurs méthodologies peuvent être utilisées pour déterminer si l'interaction entre les facteurs génétiques et environnementaux intervient dans l'expression du phénotype.

Une approche génétique consiste à estimer les paramètres génétiques (héritabilité et corrélations génétiques) du poids vif, de la consommation alimentaire et de l'IC des animaux placés dans chacune des conditions environnementales. La comparaison des résultats obtenus dans chacune des conditions environnementales permettra alors de déterminer si les phénotypes mesurés varient en fonction de l'interaction génétique environnement. Cependant une telle étude demande un dispositif complexe, comprenant un nombre important d'animaux dont le pedigree est connu (au minimum 600 animaux pour chaque condition environnementale). De plus, les phénotypes d'intérêt (poids vif, consommation alimentaire) doivent être mesurés de façon individuelle, ce qui implique actuellement d'élever les animaux en cages individuelles. D'un point de vue expérimental, un tel dispositif est très difficile à mettre en place et très coûteux, car les installations expérimentales disposant de cages individuelles conformes aux normes européennes de bien être ne permettent d'élever simultanément qu'un nombre très limité d'animaux, impliquant alors d'autres facteurs de variations potentiels, tel qu'un effet série (ou lot) qui devrait être intégré dans les analyses.

Une approche phénotypique consiste à comparer la réponse de plusieurs lignées aux différents niveaux du facteur environnemental étudié. Ce dispositif, bien que plus simple à

mettre en place nécessite de multiplier le nombre d'animaux nécessaires par le nombre de lignées utilisées pour étudier l'impact d'un facteur environnemental. Cela engendre un surcoût important et pose la question éthique de la multiplication du nombre d'animaux sacrifiés. De plus cela permet uniquement de mettre en évidence l'existence d'une interaction entre lignée et facteur environnemental.

Dans le cadre des travaux présentés dans ce manuscrit, nous avons opté pour une autre approche : utiliser un indicateur du potentiel de croissance. L'interaction entre cet indicateur et l'environnement (densité, aliment) a alors été étudié pour plusieurs phénotypes d'intérêt (poids en fin d'élevage, GMQ). L'indicateur utilisé était un critère mesurable précocement sur chacun des animaux, et permettant une prédiction de la croissance des animaux en fin d'élevage. Comme traité dans le paragraphe suivant, ce critère est en partie contrôlé par la génétique, mais également en partie par l'environnement d'élevage. Cette approche de l'estimation de l'impact de la génétique sur les réponses des animaux est donc soumise à un biais. Cependant elle permet de ne pas multiplier le nombre d'animaux étudiés.

2.2. Validation du poids à 9-10j comme prédicteur du poids en fin d'élevage

Le poids à 9-10 jours a été utilisé comme prédicteur du potentiel de croissance dans les expériences 2 et 3. En effet, le poids à l'éclosion est un mauvais prédicteur des performances ultérieures (Molenaar, et al., 2008) car il dépend fortement de l'âge des reproducteurs (Almeida, et al., 2006; Yilmaz-Dikmen and Sahan, 2009) mais aussi du poids du résidu du sac vitellin (Wolanski, et al., 2007). En revanche, à 10 jours d'âge, le sac vitellin représente moins de 1 % du poids de l'animal (Huang, et al., 2008) et les effets des parentaux sont nettement réduits. Cependant des facteurs indépendants de la génétique peuvent modifier le poids à 9-10j des animaux, comme par exemple le temps entre éclosion et première alimentation (Noy and Sklan, 1999; Suzuki, et al., 2008).

Le poids à 9-10j s'est révélé un très bon prédicteur du poids en fin d'élevage. En effet, la corrélation positive observée entre ces deux données est hautement significative ($p < 0.0001$ et $R^2 = 0,54$ et $0,61$ pour l'expérience 2 et 3 respectivement).

2.3. Impact du potentiel de croissance sur la réponse des animaux aux phytobiotiques

Dans l'expérience 2, les phytobiotiques n'ont pas eu d'effet sur le poids ni le gain de poids des animaux, et aucune interaction n'a été observée entre traitement alimentaire et poids à 9j sur ces paramètres. En revanche, lors de l'expérience 3, lorsque les animaux étaient placés à 12 animaux/m², une interaction entre poids à 10j et traitement alimentaire sur le GMQ de la période 32-39j et sur le poids à 39j a été observée. Cela s'est traduit par le fait que le traitement Exp1 était le plus efficace sur les animaux petits, que les deux traitements expérimentaux étaient équivalents sur les moyens et que le traitement Exp2 était le plus efficace sur les gros. Ces résultats montrent que les deux traitements expérimentaux utilisés au cours de ces travaux ne sont pas efficaces sur les mêmes populations d'animaux, et ce en fonction d'un prédicteur de leur potentiel de croissance.

Cela pourrait s'expliquer par le fait que les animaux ayant un faible potentiel de croissance peuvent différer de ceux ayant un fort potentiel par une physiologie digestive moins efficace, des villosités intestinales moins développées (Smith, et al., 1990), des sécrétions enzymatiques différentes (Nitsan, et al., 1991), ainsi que par un microbiote digestif différent. En effet, celui-ci est affecté par la génétique de l'hôte (Zoetendal, et al., 2001a) et dépend de l'environnement que constitue le tractus digestif, lui-même modifié par la physiologie digestive. Les animaux ayant un fort potentiel de croissance doivent subir un stress oxydatif plus fort du fait de leur croissance rapide (Nain, et al., 2008). Ainsi le mélange EXVa commun aux deux traitements et contenant des molécules favorisant notamment les sécrétions digestives (Platel and Srinivasan, 2004) pourrait être suffisant pour améliorer les performances de croissance des petits animaux dont la croissance est limitée par leur physiologie digestive. En revanche, dans le cas de ces animaux, l'utilisation du mélange EXVb, présent uniquement dans le traitement Exp2, et contenant des molécules immuno-modulatrices (Deyama, et al., 2001; Heitzman, et al., 2005) pourrait se faire au détriment de leur croissance. Ce même mélange contenant des molécules antioxydantes (Araujo and Leon, 2001; Deyama, et al., 2001; Nassiri-Asl and Hosseinzadeh, 2009), pourrait être bénéfique aux gros animaux souffrant d'un fort stress oxydatif. Le tableau 26 récapitule des hypothèses tirées de ces observations.

Cela suggère que comme montré pour les AFC en comparant leurs effets sur plusieurs lignées (Pietrzak, et al., 2006), il existe une interaction entre facteurs génétiques et efficacité

des phytobiotiques. Ces résultats sont, à notre connaissance, les premiers disponibles sur le sujet. Il serait donc intéressant de comparer l'efficacité de ces composés sur les deux grands types de lignées utilisées en élevage industriel français (lignée à croissance rapide et à croissance lente), ce qui permettrait de confirmer les présents résultats.

Tableau 26 : Schéma récapitulatif des hypothèses concernant l'effet du potentiel de croissance sur l'efficacité des phytobiotiques

		Potentiel de croissance			
		Faible		Fort	
	Capacité digestive	Faible → facteur limitant principal de la croissance		Fort → facteur limitant secondaire de la croissance	
Animal	Microbiote digestif	Non optimal ?		Optimal ?	
	Statut oxydant	Faible stress oxydatif		Fort stress oxydatif → facteur limitant principal de la croissance	
Traitement alimentaire		Exp1	Exp2	Exp1	Exp2
	Démarrage	Pas de phytobiotiques	Modification négative du métabolisme via l'immunité	Pas de phytobiotiques	Diminution du stress oxydatif (facteur limitant principal)
	Croissance		Stimulation de la digestion ou modification positive du microbiote (facteur limitant principal)		Action sur le second facteur limitant (la capacité digestive)
Phase de croissance	Finition	Stimulation de la digestion ou modification positive du microbiote (facteur limitant principal)	Stimulation de la digestion ou modification positive du microbiote (facteur limitant principal)	Pas d'amélioration possible sans suppression du facteur limitant principal	
	Retrait				
Effet sur la croissance		Amélioration très forte	Amélioration forte	Aucun	Amélioration

Résumé

Ces travaux nous ont permis de confirmer l'existence de facteurs liés aux conditions d'élevage ou à la génétique des animaux, modulant l'efficacité des phytobiotiques comme facteurs de croissance. Ainsi, la densité d'élevage, les conditions post-éclosion et le potentiel de croissance des animaux modifient l'efficacité de ces additifs. Les phytobiotiques semblent avoir un effet bénéfique sur la croissance des animaux quand ceux-ci sont placés dans des conditions défavorables à leur croissance. Ces résultats s'expliquent par le fait que la croissance des animaux n'est pas limitée uniquement par leur environnement mais également par leurs limites physiologiques. Ainsi, si l'environnement permet déjà aux animaux d'avoir une croissance proche de leurs limites physiologiques, l'utilisation d'additifs facteurs de croissance se révélera inutile. De plus, les différents phytobiotiques utilisés n'améliorent pas de la même façon les performances de croissance d'animaux ayant des potentiels de croissance différents. Les facteurs limitant la croissance de ces animaux ne sont probablement pas les mêmes, ce qui explique que des phytobiotiques ayant des activités différentes les affectent différemment. L'existence de facteurs environnementaux et génétiques modulant l'efficacité des phytobiotiques explique en partie la grande variabilité d'efficacité de ces composés rapportée dans la littérature. En effet, les conditions d'élevage et les souches d'animaux pour lesquelles un même phytobiotique est étudié différent d'une étude à l'autre.

Chapitre 4 – Quels peuvent être les mécanismes par lesquels les phytobiotiques utilisés ont amélioré la croissance des animaux ?

I. Action sur le microbiote digestif

Les mécanismes d'actions par lesquels les phytobiotiques permettent une amélioration des performances de croissance des volailles sont mal connus (Brenes and Roura, 2010). Cependant, le mécanisme d'action le plus souvent proposé pour expliquer l'effet positif des antibiotiques facteurs de croissance sur la croissance des animaux est une action sur leur microbiote digestif (Dibner and Richards, 2005; Thomke and Elwinger, 1998). Or tout comme les antibiotiques facteurs de croissance, les phytobiotiques présentent *in vitro* une activité inhibitrice de nombreuses espèces bactériennes présentes dans le tractus digestif (Ceylan and Fung, 2004; Chao, et al., 2000; Cowan, 1999; Smith-Palmer, et al., 1998). Au cours de ce travail nous avons donc voulu déterminer, d'une part si les phytobiotiques peuvent modifier le microbiote digestif, et d'autre part si ces modifications peuvent être à l'origine de leur activité sur la croissance des animaux.

1.1. Impact des phytobiotiques sur le microbiote digestif

Les performances de croissance et le microbiote digestif ont été étudiés chez des animaux recevant ou non des phytobiotiques lors de l'expérience 3. Le microbiote des contenus digestif de ces animaux a été étudié par deux approches moléculaires, une approche qualitative globale (TTGE) et une approche quantitative des groupes majoritaires (PCR en temps réel). L'approche quantitative a été effectuée au niveau des groupes majoritaires car les phytobiotiques du mélange EXVa, commun aux deux aliments expérimentaux, présentent des activités antibactériennes *in vitro* vis-à-vis de nombreuses bactéries (Ceylan and Fung, 2004; Chao, et al., 2000; Cowan, 1999; Smith-Palmer, et al., 1998), suggérant qu'ils puissent entraîner *in vivo* des modifications du microbiote digestif.

Lorsque les animaux ont été élevés à la densité de 12 animaux/m², leurs performances de croissance ont été améliorées de la même façon par les traitements Exp1 et Exp2. Dans ces

conditions une modification du microbiote a pu être observée avec les deux traitements. Le traitement Exp1 a principalement modifié le microbiote des caeca et le traitement Exp2 celui des caeca mais aussi du jabot. Lorsque la densité d'élevage était de 17 animaux/m², les performances de croissance ont été améliorées de façon plus importante avec le traitement Exp2 qu'avec le traitement Exp1. Le microbiote des animaux ayant reçu les traitements expérimentaux a été principalement modifié dans l'iléon et les caeca.

1.2. Les modifications du microbiote digestif peuvent-elles être responsables de l'amélioration de la croissance ?

Pour comprendre si le microbiote digestif est impliqué dans les modifications de performances de croissance de l'hôte suite à l'ingestion des phytobiotiques, la première étape devait être une approche descriptive de la composition et des modifications du microbiote. Ce travail nous a permis de mettre en évidence une modification du microbiote digestif des animaux ayant reçu un aliment contenant des phytobiotiques (EXVa ou EXVa + EXVb) par rapport à ceux ayant reçu un aliment témoin, accompagnée dans certaines conditions d'élevage d'une amélioration de la croissance. Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle les phytobiotiques utilisés, en plus d'améliorer les performances de croissance, modifient le microbiote digestif des animaux. Cependant, ces résultats ne sont pas suffisants pour prouver que l'amélioration des performances de croissances est due aux modifications du microbiote digestif. En effet, les fonctions d'un écosystème ne peuvent pas directement être déduites de l'identité phylogénétique des espèces qui le composent (variation du génome au sein d'une espèce, influence de l'environnement sur les fonctions exprimées, redondance fonctionnelle entre espèces,...). On ne peut donc pas établir de lien direct entre les modifications phylogénétiques observées dans le microbiote des animaux ayant reçu les phytobiotiques, et l'amélioration des performances de croissance observée chez ces mêmes animaux.

En revanche, une approche fonctionnelle du microbiote permettrait de déterminer si les modifications observées ont donné lieu à des modifications du microbiote ayant un impact sur l'hôte. Pour répondre à cette question, le suivi de métabolites bactériens à effet bénéfique ou néfaste sur la croissance de l'hôte en fonction du traitement alimentaire pourrait être envisagé. Une mesure des acides gras volatils dans les caeca serait par exemple intéressante. En effet, ces molécules peuvent avoir un rôle non négligeable dans le métabolisme énergétique du poulet, et leur augmentation pourrait donc être favorable à la croissance de

l'hôte. De la même façon, le suivi de l'expression des gènes codants différentes enzymes impliquées dans des fonctions métaboliques importantes par rapport à l'hôte permettrait d'étudier si les phytobiotiques entraînent des modifications fonctionnelles du microbiote digestif favorables à l'hôte.

Par ailleurs, comme illustré par la figure 32, l'effet positif des phytobiotiques, parallèlement à des modifications du microbiote, peut s'expliquer par plusieurs mécanismes. Les phytobiotiques peuvent agir directement sur le microbiote grâce à leurs propriétés antibactériennes (Ceylan and Fung, 2004; Cowan, 1999), ou indirectement en agissant sur les animaux. Il peuvent agir sur leur physiologie digestive (Platel and Srinivasan, 2004), leur statut oxydant (Deyama, et al., 2001; Goñi, et al., 2007; Gowda, et al., 2009; Jeon, et al., 2001; Valerio Jr and Gonzales, 2005) ou leur immunité (Deyama, et al., 2001; Epstein, et al., 2010; Valerio Jr and Gonzales, 2005), l'ensemble de ces mécanismes pouvant d'ailleurs coexister. De plus, du fait des interactions entre l'hôte et les microorganismes, une modification du microbiote peut entraîner des modifications physiologiques chez l'hôte et vice-versa. L'effet des phytobiotiques sur la croissance peut alors aussi bien s'expliquer par un effet positif direct du microbiote (diminution de la concurrence hôte-bactérie pour les nutriments, production plus importante d'acide gras volatils, diminution de métabolites bactériens néfastes...), par un effet sur l'hôte indépendant du microbiote (stimulation des sécrétions digestives, diminution du stress oxydatif, diminution de l'inflammation...), par un effet indirect du microbiote à travers son action sur la physiologie de l'animal ou inversement par un effet indirect de la physiologie de l'animal de par l'action sur le microbiote, ou par tout ou partie de ces mécanismes.

Pour établir un lien causal entre ingestion des phytobiotiques, modification du microbiote et amélioration de la croissance des animaux, il pourrait être intéressant de vérifier, en culture continue dans des fermenteurs permettant de simuler un tractus digestif, si dans ces conditions, les phytobiotiques ont toujours un impact sur la composition du microbiote. Dans ce cas, l'impact observé serait un impact direct des phytobiotiques sur le microbiote. Cependant, pour être envisageable, ce type d'approche nécessite de mieux connaître le devenir des phytobiotiques dans le tractus digestif pour savoir quels métabolites sont présents dans quels organes. En parallèle, la comparaison de l'effet de phytobiotiques sur la croissance d'animaux axéniques et conventionnels serait intéressante. En effet, une absence d'effet sur les animaux axéniques renforcerait l'hypothèse selon laquelle l'action des phytobiotiques sur l'hôte est liée au microbiote digestif, bien que la physiologie digestive

d'animaux axéniques et conventionnels ne soit pas identique. La principale difficulté pour mettre en place cette méthode est qu'il faut disposer d'un effectif d'animaux suffisamment important pour mettre en évidence un effet faible des phytobiotiques sur la croissance, et que ces effectifs peuvent être difficiles à atteindre dans des conditions axéniques.

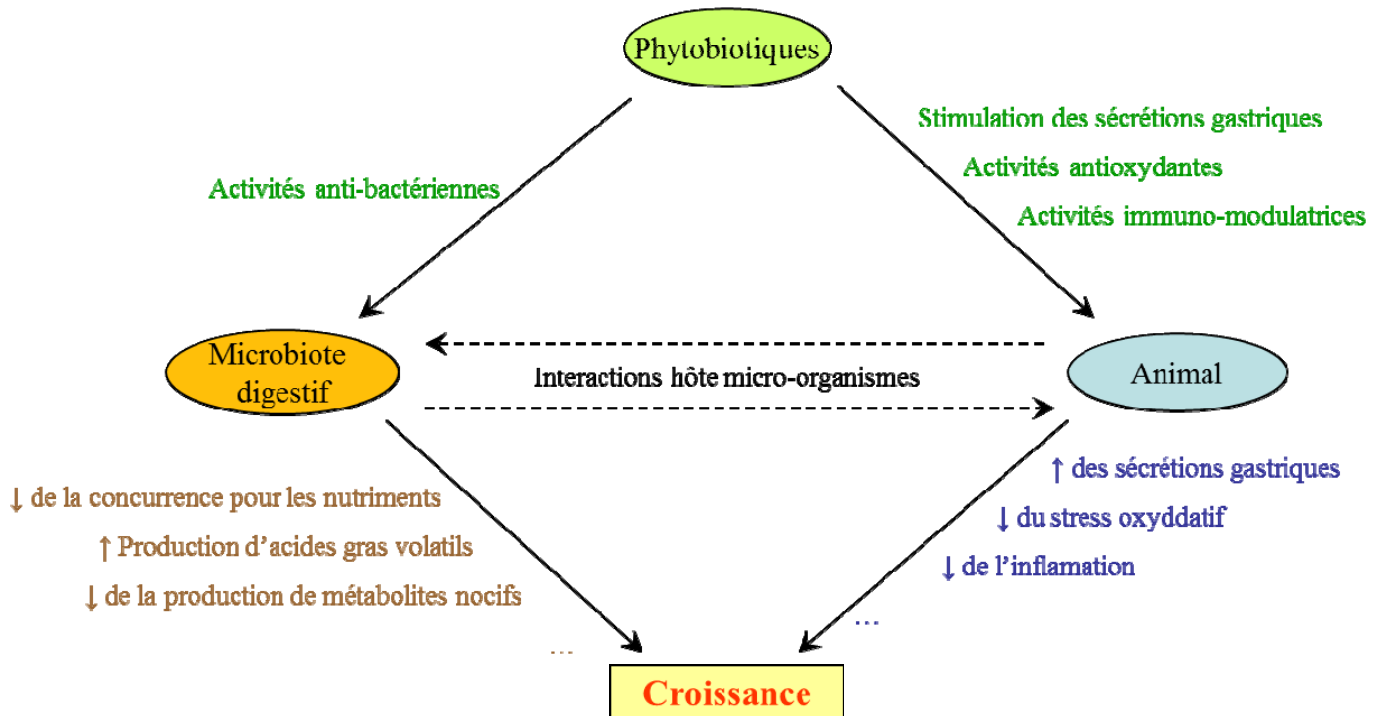


Figure 32 : Schéma récapitulatif des hypothèses concernant les modes d'actions par lesquels les phytobiotiques modulent la croissance du poulet

Les activités directes des phytobiotiques sur l'animal ou son microbiote sont décrites en vert et représentées par des flèches pleines. Leurs activités indirectes sont représentées par des flèches discontinues. Les mécanismes d'action expliquant directement l'amélioration de croissance des animaux sont décrits en marron, s'ils sont liés au microbiote, et en bleu s'ils sont liés à la physiologie de l'animal et sont représentés par des flèches pleines. Les mécanismes indirects sont représentés par des flèches discontinues.

II. Les autres mécanismes

Dans l'étude bibliographique, nous avons évoqué que du fait des nombreuses activités biologiques portées par les molécules constituant les phytobiotiques, de nombreuses hypothèses existent quant à leur mode d'action (modification du microbiote digestif, stimulation de la digestion, modification du comportement alimentaire, amélioration du statut oxydatif, modulation de l'immunité,...).

Sans pouvoir exclure aucun de ces mécanismes, nos résultats suggèrent que certains d'entre eux ont vraisemblablement été impliqués : une modification du microbiote comme évoqué dans le paragraphe précédent, mais également une modification du comportement alimentaire et une amélioration du statut oxydatif.

2.1. Modification du comportement alimentaire

Lors de l'expérience 2, l'amélioration de la croissance était notamment liée à une ingestion plus importante chez les animaux ayant reçu un aliment contenant le mélange de phytobiotiques EXVa que chez les animaux ayant reçu l'aliment témoin. Cela dénote d'une modification du comportement alimentaire des animaux.

2.1.1. Préférence alimentaire

La plus forte consommation des aliments expérimentaux peut dénoter d'une préférence alimentaire pour cet aliment. Le poulet fait appel à différents sens pour choisir son aliment : vision, olfaction, toucher, gout (Bouvarel et al., 2010). Or l'inclusion de phytobiotiques dans l'aliment pourrait en avoir modifié les propriétés visuelles et sensorielles. En effet, les phytobiotiques contiennent de nombreux composés volatils qui se caractérisent par une odeur et un gout marqué. Ils contiennent également des pigments, qui modifient la couleur de l'aliment. Ainsi l'appétence de l'aliment contenant EXVa pourrait être plus importante que celle de l'aliment témoin. Une caractérisation sensorielle de ces deux aliments couplée à des tests de choix permettrait de valider ces hypothèses.

2.1.2. Régulation de l'ingestion

La plus forte consommation de l'aliment expérimental contenant EXVa pourrait également être liée à des modifications physiologique ayant entraîné une modification de la régulation de l'ingestion. La régulation de l'ingestion est complexe et dépend de signaux agissant à court ou long terme (Bouvarel et al., 2010). A long terme, elle est contrôlée au niveau central par un grand nombre d'hormones et est régulée par de nombreux facteurs comme la teneur énergétique de l'aliment, sa composition nutritionnelle, la température ressentie par l'animal ou son statut immunitaire. A plus court terme, l'initiation et l'arrêt des repas est contrôlée par le taux de remplissage du tractus digestif qui dépend de la distension de l'appareil digestif et de la vitesse de passage du bol alimentaire. Des peptides servant de signaux de satiété sont également synthétisé en lien avec la présence d'aliment dans le tractus.

Ces peptides contrôlent également la motilité intestinale et les sécrétions digestives. Or il a été montré notamment chez le rat que certains des composants de EXVa, et plus particulièrement les extraits d'ail, réduisent le temps de transit digestif et augmentent les sécrétions digestives (Platel et Srinivasan, 2004). Ainsi, l'ingestion de ces molécules pourrait entraîner une augmentation de la consommation alimentaire en permettant une réduction plus rapide du taux de remplissage du tractus digestif. Des études complémentaires concernant le temps de transit des digesta, associé à des dosages des hormones régulatrices de l'ingestion pourraient permettre de confirmer ces hypothèses.

2.2. Amélioration du statut oxydatif

Les animaux aux plus forts potentiels de croissance présentaient une croissance plus importante quand ils étaient nourris avec le traitement alimentaire Exp2, contenant le mélange EXVb riche en molécules antioxydantes (Araujo and Leon, 2001; Deyama, et al., 2001; Nassiri-Asl and Hosseinzadeh, 2009), qu'avec le traitement alimentaire Exp1. Or les animaux aux plus forts potentiels de croissance sont ceux les plus susceptibles de subir un stress oxydatif du fait de leur croissance rapide (Nain, et al., 2008). Le mélange EXVb était distribué aux animaux pendant leurs 10 premiers jours de vie, période durant laquelle la vitesse de croissance est la plus forte. Ainsi, ces résultats suggèrent qu'une amélioration du statut oxydatif de ces animaux ait pu avoir lieu dans leur phase de vie précoce, et que cette amélioration ait pu favoriser leur croissance ultérieure. Des analyses complémentaires du statut oxydant des animaux en fonction du traitement alimentaire et de leur potentiel de croissance permettraient de vérifier cette hypothèse.

2.3. Stimulation de la digestion

Comme évoqué dans l'étude bibliographique, plusieurs travaux suggèrent que les phytobiotiques sont capables de stimuler la digestion et / ou d'améliorer le métabolisme des nutriments (Platel et Srinivasan, 2004 ; Cao et al., 2010). Il pourrait donc être intéressant de poursuivre les travaux dans cette direction, et ce d'autant plus que les phytobiotiques utilisés ont permis, dans certaines conditions, une amélioration des performances de croissance et plus particulièrement de l'IC. Les coefficients d'utilisation digestive ainsi que l'étude du niveau de sécrétion des principales enzymes digestives pourraient donc être conduits en fonction du traitement alimentaire.

Résumé

L'étude des performances de croissance et du microbiote digestif d'animaux ayant reçu un traitement témoin ou l'un des deux traitements expérimentaux contenant des phytobiotiques a permis de mettre en évidence que l'amélioration des performances de croissance par ces derniers est accompagnée de modifications du microbiote digestif. Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle l'amélioration des performances de croissance par les extraits végétaux serait liée, du moins en partie, à des modifications du microbiote digestif. Cependant des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer si les modifications du microbiote sont réellement une des causes de l'augmentation de la croissance des poulets ou si elles en sont la conséquence. De plus d'autres mécanismes pourraient intervenir dans l'amélioration des performances de croissance, et en particulier une modification du comportement alimentaire, du statut oxydatif des animaux et une stimulation de leur digestion. Des études supplémentaires seront nécessaires pour confirmer ou infirmer ces résultats.

Conclusion

Nous avons pour objectif de connaître l'impact, chez le poulet, des conditions d'élevage sur l'efficacité des phytobiotiques utilisés et d'évaluer le rôle de ces conditions d'élevage dans la variabilité d'efficacité des phytobiotiques rapportée par la littérature. Nous voulions par ailleurs comprendre par quels mécanismes les phytobiotiques utilisés modifiaient les performances zootechnique des animaux, et en particulier si une action sur le microbiote digestif pouvait être impliquée. Cela a nécessité d'analyser préalablement ce microbiote afin d'approfondir notre connaissance de son évolution spatiale et temporelle.

D'un point de vue méthodologique, nos travaux sur le microbiote digestif ont permis de mettre en évidence son évolution temporelle et spatiale, que ce soit le long du tractus digestif, ou au sein de chaque organe étudié (selon un axe lumen-mucus). Ces travaux ont également permis de valider plusieurs méthodes d'analyse de profils TTGE pour mettre en évidence ses variations. Concernant l'analyse des résultats zootechniques, nos résultats ont permis de valider l'utilisation du poids des animaux à 9j comme prédicteur du poids en fin d'élevage. Cet outil permet d'estimer les variations de réponse d'une population à un facteur d'élevage sans avoir à multiplier le nombre d'animaux utilisés.

D'un point de vue cognitif, nos résultats ont permis de mettre en évidence que l'amélioration des performances de croissance observée chez les animaux ayant ingéré les phytobiotiques pourrait être due à plusieurs mécanismes tels qu'une modification de leur comportement alimentaire ou de leur microbiote digestif. Les résultats de ce travail montrent également que le potentiel de croissance des animaux joue un rôle majeur dans leur réponse aux phytobiotiques et suggèrent que ces différences de réponses sont liées à la nature du facteur limitant la croissance des animaux. Celle des animaux à faible potentiel pourrait principalement être limitée par leur physiologie digestive, et ainsi être améliorée par le mélange EXVa contenant des molécules capables notamment de stimuler la digestion. La croissance des animaux à fort potentiel pourrait quant à elle être principalement limitée par le stress oxydatif engendré par la forte croissance. Le mélange EXVb qui contient de nombreuses molécules antioxydantes pourrait alors limiter ce stress.

D'un point de vue pratique, nous avons pu mettre en évidence un rôle important des conditions d'élevage sur l'efficacité des phytobiotiques utilisés. Ils n'apportent pas de bénéfice à la croissance des animaux si cette dernière est déjà proche de leur limite physiologique, et au contraire peuvent être bénéfiques quand la croissance des animaux est

limitée par des facteurs environnementaux. Ces résultats, mis en évidence de manière nette en comparant les résultats des essais 2 et 3, qui différaient par les conditions post-éclosion, mais également par le lieu d'élevage des animaux, mériteraient d'être confirmés lors d'une expérience testant ces différents facteurs au cours d'un même essai. Si ces résultats étaient confirmés, ces phytobiotiques pourraient alors être utilisés soit comme un moyen pour améliorer les performances d'animaux présentant de manière précoce un défaut de croissance, soit de manière systématique pour prévenir un défaut de croissance ou diminuer l'hétérogénéité des lots. Cependant le rapport coût bénéfice reste à évaluer car l'utilisation de phytobiotiques représente un surcoût important pour la fabrication de l'aliment pouvant aller de 3 à 25 €/tonne (Huyghebaert et al, 2011) pour un prix d'aliment oscillant entre 250 et 300 €/tonne, soit une augmentation du coût de fabrication de 1 à 10%.

Au cours de ce travail nous avons été confrontés à la double difficulté de ne pas connaître quel était le devenir exact de chacun des composés des phytobiotiques ingérés par les animaux et de ne pas pouvoir réattribuer à chacun de ces composés les effets observés sur l'animal et son microbiote, du fait du peu de données disponibles chez le poulet et de la complexité des mélanges utilisés. En effet, le devenir après ingestion des principaux phytobiotiques utilisés chez les volailles, notamment ceux étudiés dans ces travaux, n'est pas connu chez l'oiseau. Les seules données disponibles ont été établies chez des mammifères monogastriques (homme, rat, porc...) et restent à l'heure actuelle parcellaires et limitées à certaines molécules. Or, d'importantes différences peuvent apparaître entre espèces concernant la pharmacocinétique de ce type de molécules. De la même façon, la pharmacodynamique de nombreux constituants minoritaires des phytobiotiques n'est pas connue.

Pour le développement des connaissances concernant les modes d'action de ces produits, des études de leurs pharmacocinétiques réalisées chez le poulet à partir de molécules isolées seraient nécessaires. Cela permettrait d'une part de connaître la localisation de ces molécules dans l'organisme (localisation dans le tractus digestif, dans les organes, dans le système circulatoire...) et donc leurs lieux d'action potentielle, et d'autre part de caractériser leurs métabolites. Ces informations pourraient donner des indications importantes quant à leurs mécanismes d'action possibles. En fonction de ces résultats, des études larges sur l'activité de ces molécules sur différents marqueurs biologiques de l'hôte (au niveau du système digestif, immunitaire,...) permettraient de comprendre les modes d'action de ces

différentes molécules utilisées séparément. L'étape préalable à la compréhension des mécanismes d'action des phytobiotiques et donc à l'optimisation de leur composition serait donc l'étude de leur pharmacocinétique puis de leur pharmacodynamique chez l'espèce ciblée. Cependant chaque phytobiotique naturel est composé de nombreuses molécules susceptibles d'interagir entre elles (synergies, antagonismes, ...). Ces interactions restent à l'heure actuelle mal connues et doivent être étudiées car elles conditionnent l'action du mélange de molécules utilisé. La seconde étape sur le chemin de la prédiction des effets d'un phytobiotique naturel sur l'animal serait donc d'étudier les effets de mélanges simples de molécules de composition connue précisément, afin de caractériser les interactions susceptibles d'avoir lieu entre les différents constituants d'un phytobiotique naturel lors de son administration à des poulets de chair.

Par ailleurs, nous avons pu mettre en évidence que les conditions d'élevage ainsi que la génétique des animaux influencent fortement leurs réponses aux phytobiotiques. Or, à l'heure actuelle, les effets et les mécanismes d'action de ces molécules sont étudiés dans une grande gamme de conditions. La mise en place de protocoles standardisés ou de normes pourraient faciliter la transposition des résultats d'une étude à l'autre et faciliter l'accroissement des connaissances sur le sujet.

Bibliographie

- Anonymous. WHO monographs on selected medicinal plants *World Health Organization Library Cataloguing in Publication Data* **1**. 1999.
- Anonymous. WHO monographs on selected medicinal plants *World Health Organization Library Cataloguing in Publication Data* **2**. 2002.
- Anonymous. *Eleutherococcus senticosus*. *Alternative Medicine Review*. 2006. **11**: 151-155.
- Abdullah Abdullah Y., Mahmoud Kamel Z., Nusairat Basheer M. & Qudsieh Rasha I. Small intestinal histology, production parameters, and meat quality as influenced by dietary supplementation of garlic (*Allium sativum*) in broiler chicks. *Italian Journal of Animal Science*. 2010. **9**: 414-419.
- Acamovic T. & Brooker J.D. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2005. **64**: 403-412.
- AFNOR. AFNOR NF T75-006, février 1998, Matières premières aromatiques d'origine naturelle - Vocabulaire. 1998.
- Ahmadian A., Ehn M. & Hober S. Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta*. 2006. **363**: 83-94.
- Ajuyah A., Balnave D. & Annison E.F. Determination of apparent and true dietary fatty acid digestibilities and metabolisable energy using ileal digesta and excreta from broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*. 1996. **62**: 131-139.
- Akester A.R., Anderson R.S., Hill K.J. & Osbaldiston G.W. A radiographic study of urine flow in the domestic fowl. *British Poultry Science*. 1967. **29**: 169-173.
- Al Homidan A. & Robertson J.F. Effect of litter type and stocking density on ammonia, dust concentrations and broiler performance. *British Poultry Science*. 2003. **44**: S7-S8.
- Alcicek A., Bozkurt M. & Cabuk M. The effect of an essential oil combination derived from selected herbs growing wild in Turkey on broiler performance. *South African Journal of Animal Science*. 2003. **33**: 89-94.
- Alleman, F., C. Litaise, et al.. Are essentials oils efficient in broilers ? A meta analysis. XIIIth European Poultry Conference. 2010. Tours, France: p 419
- Ali M.N., Qota E.M.A. & Hassan R.A. Recovery from adverse effects of heat stress on slow-growing chicks using natural antioxidants without or with sulphate. *International Journal of Poultry science*. 2010. **9**: 109-117.
- Al-Kassie G.A.M. Influence of two plant extracts derived from thyme and cinnamon on broiler performance. *Pakistan Veterinary Journal*. 2009. **29**: 169-173.

- Allen A. & Flemström G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2005. **288**: 1-19.
- Allen P.C., Lydon J. & Danforth H.D. Effects of components of *Artemisia annua* on coccidia infections in chickens. *Poultry Science*. 1997. **76**: 1156-1163.
- Almeida J.G., Dahlke F., Maiorka A., Faria Filho D.E. & Oelke C.A. Effect of broiler breeder age on hatching time, chick permanence time in hatcher and chick weight. *Archives of Veterinary Science*. 2006. **11**: 45-49.
- Al-Sultan S.I. The effect of *Curcuma longa* (Turmeric) on overall performance of broiler chickens. *International Journal of Poultry science*. 2003. **2**: 351-353.
- Amagase H. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *The Journal of Nutrition*. 2006. **136**: 716-725.
- Amaral S., Mira L., Nogueira J.M.F., da Silva A.P. & Florencio M.H. Plant extracts with anti-inflammatory properties-A new approach for characterization of their bioactive compounds and establishment of structure-antioxidant activity relationships. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2009. **17**: 1876-1883.
- Amerah A.M., Péron A., Zaefarian F. & Ravindran V. Influence of whole wheat inclusion and a blend of essential oils on the performance, nutrient utilisation, digestive tract development and ileal microbiota profile of broiler chickens. *British Poultry Science*. 2011. **52**: 124-132.
- Anderson K.L. & Lebepe-Mazur S. Comparison of rapid methods for the extraction of bacterial DNA from colonic and caecal lumen contents of the pig. *Journal of Applied Microbiology*. 2003. **94**: 988-993.
- Annisson E.F., Hill K.J. & Kenworthy R. Volatile fatty acids in the digestive tract of the fowl. *British Journal of Nutrition*. 1968. **22**: 207--216.
- Ao T., Cantor A.H., Pescatore A.J. & Pierce J.L. In vitro evaluation of feed-grade activity at pH levels simulating various parts of the avian digestive tract *Animal Feed Science and Technology*. 2008. **140**: 462-468.
- Apajalahti J., Kettunen A. & Graham H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World's Poultry Science Journal*. 2004. **60**: 223-232.
- Araujo C.A.C. & Leon L.L. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2001. **96**: 723-728.

- Asakura H., Tajima O., Watarai M., Shirahata T., Kurazono H. & Makino S. Effects of rearing conditions on the colonization of *Salmonella enteritidis* in the cecum of chicks. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2001. **63**.
- Ashayerizadeh O., Dastar B., Shargh M.S., Ashayerizadeh A., Rahmatnejad E. & Hossaini S.M.R. Use of garlic (*Allium sativum*), black cumin seeds (*Nigella sativa* L.) and wild mint (*Mentha longifolia*) in broiler chickens diets. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2009. **8**: 1860-1863.
- Atuma C., Strugala V., Allen A. & Holm L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *American Journal of Physiology. Liver Physiology*. 2001. **280**.
- Aura A.M. Microbial metabolism of dietary phenolic compounds. *Phytochemistry Reviews*. 2008. **7**: 407-429.
- Aureli P., Costantini A. & Zolea S. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 1992. **55**: 344-348.
- Ross PM3 broiler performance objectives (05/05/2010).
- Awaad M.H.H., Abdel-Alim G.A., Sayed K.S.S., Ahmed K.A., Nada A.A., Metwalli A.S.Z. & Alkhalaf A.N. Immunostimulant Effects of Essential Oils of Peppermint and Eucalyptus in Chickens. *Pakistan Veterinary Journal*. 2010. **30**: 61-66.
- Aydin R., Karaman M., Cicek T. & Yardibi H. Black Cumin (*Nigella sativa* L.) Supplementation into the Diet of the Laying Hen Positively Influences Egg Yield Parameters, Shell Quality, and Decreases Egg Cholesterol. *Poultry Science*. 2008. **87**: 2590-2595.
- Bäckhed F., Ley R.E., Sonnenburg J.L., Peterson D.A. & Gordon J.I. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005. **307**: 1915-1920.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. & Idaomar M. Biological effects of essential oils - a review. *Food and chemical toxicology*. 2008. **46**: 446-475.
- Bampidis V.A., Christodoulou V., Florou-Paneri P., Christaki P., Chatzopoulou P.S., Tsiligilanni T. & Spais A.B. Effect of dietary dried oregano leaves on growth performance, carcass characteristics and serum cholesterol of female early maturing turkeys. *British Poultry Science*. 2005. **46**: 591-601.
- Banhazi T.M., Seedorf J., Laffrique M. & Rutley D.L. Identification of the risk factors for high airborne particle concentrations in broiler buildings using statistical modelling. *Biosystems Engineering*. 2008. **101**: 100-110.

- Barbosa T. & Rescigno M. Host-bacteria interactions in the intestine: homeostasis to chronic inflammation. *Systems Biology and Medecine*. 2010. **2**: 80-97.
- Barreto M.S.R., Menten J.F.M., Racanicci A.M.C., Pereira P.W.Z. & Rizzo P.V. Plant extracts used as growth promoters in broilers. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 2008. **10**: 109-115.
- Bartosch S., Fite A., Macfarlane G.T. & McMurdo M.E.T. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004. **70**: 3575-3581.
- Baseri H., Haghghi-Asl A. & Lotfollahi M.N. Effects of Operating Parameters on the Cinnamaldehyde Content of Extracted Essential Oil Using Various Methods. *Chemical Engineering & Technology*. 2010. **33**: 267-274.
- Basmacioglu H., Tokusoglu O. & Ergul M. The effect of oregano and rosemary essential oils or alpha-tocopheryl acetate on performance and lipid oxidation of meat enriched with n-3 PUFA's in broilers. *South African Journal of Animal Science*. 2004. **34**: 197-210.
- Batal A.B. & Parsons C.M. Effect of fasting versus feeding oasis after hatching on nutrient utilization in chicks. *Poultry Science*. 2002. **81**: 853-859.
- Baurhoo B., Letellier A., Zhao X. & Ruiz-Feria C.A. Cecal populations of lactobacilli and bifidobacteria and Escherichia coli populations after in vivo Escherichia coli challenge in birds fed diets with purified lignin or mannanoligosaccharides. *Poultry Science*. 2007. **86**: 2509-2516.
- Baydar N.G., Özkan G. & Sagcıç O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape(*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control*. 2003. **15**: 335-339.
- Benavente-Garcia O. & Castillo J. Update on uses and properties of Citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008. **56**: 6185-6205.
- Berrang M.E., Cox N.A., Frank J.F. & Buhr R.J. Bacterial penetration of the eggshell and shell membranes of the chicken hatching egg: A review. *Journal of Applied Poultry Research*. 1999. **8**: 499-504.
- Besnard P., Niot I., Bernard A. & Carlier H. Cellular and molecular aspects of fat metabolism in the small intestine. *Proceedings of the Nutrition Society*. 1996. **55**: 19-37.
- Bessei W. Welfare of broilers: a review. *World's Poultry Science Journal*. 2006. **62**: 455-465.

- Biggs P. & Parsons C.M. The Effects of Several Organic Acids on Growth Performance, Nutrient Digestibilities, and Cecal Microbial Populations in Young Chicks. *Poultry Science*. 2008. **87**: 2581-2589.
- Bjerrum L., Engberg R.M., Leser T.D., Jensen B.B., Finster K. & Pedersen K. Microbial Community Composition of the Ileum and Cecum of Broiler Chickens as Revealed by Molecular and Culture-Based Techniques. *Poultry Science*. 2006. **85**: 1151-1164.
- Bollard J.E., Vanderwee M.A., Smith G.W., Tasmanjones C., Gavin J.B. & Lee S.P. Location of Bacteria in the Mid-Colon of the Rat. *Applied and Environmental Microbiology*. 1986. **51**: 604-608.
- Botsoglou E., Govaris A., Christaki E. & Botsoglou N. Effect of dietary olive leaves and/or alpha-tocopheryl acetate supplementation on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast fillets during refrigerated storage. *Food Chemistry*. 2010. **121**: 17-22.
- Botsoglou N.A., Fletouris D.J., Florou-Paneria P., Christaki F. & Spais A.B. Inhibition of lipid oxidation in long-term frozen stored chicken meat by dietary oregano essential oil and alpha-tocopheryl acetate supplementation. *Food Research International*. 2003. **36**: 207-213.
- Bouvarel I., Tesseraud S. & Letterier C. L'ingestion chez le poulet de chair : n'oublions pas les régulations à court terme. *INRA Productions Animales*. 2010. **23**: 391-404.
- Bozkurt M., Alcicek A., Cabuk M., Kucukyilmaz K. & Catli A.U. Effect of an herbal essential oil mixture on growth, laying traits, and egg hatching characteristics of broiler breeders. *Poultry Science*. 2009. **88**: 2368-2374.
- Bravo, D. and C. Ionescu 2008. "Meta-analysis of the effect of a mixture of carvacrol, cinnamaldehyde and capsicum oleoresin in broilers." *Poultry Science*. 2008. 87 suppl: 75-75.
- Bravo D., Utterback P. & Parsons C.M. Evaluation of a mixture of carvacrol, cinnamaldehyde, and capsicum oleoresin for improving growth performance and metabolizable energy in broiler chicks fed corn and soybean meal. *Journal of Applied Poultry Research*. 2011. **20**: 115-120.
- Brenes A. & Roura E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology*. 2010. **158**: 1-14.
- Brenes A., Viveros A., Goni I., Centeno C., Sayago-Ayerdy S.G., Arija I. & Saura-Calixto F. Effect of grape pomace concentrate and vitamin E on digestibility of polyphenols and antioxidant activity in chickens. *Poultry Science*. 2008. **87**: 307-316.

- Buck J.D., Immerseel F.V., Haesebrouck F. & Ducatelle R. Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by Salmonella. *Journal of Applied Microbiology*. 2004. **97**: 233-245.
- Buijs S., Keeling L.J., Vangestel C., Baert J., Vangeyte J. & Tuytens F.A.M. Resting or hiding? Why broiler chickens stay near walls and how density affects this. *Applied Animal Behaviour Science*. 2010. **124**: 97-103.
- Burkholder K.M., Thompson K.L., Einstein M.E., Applegate T.J. & Patterson J.A. Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to Salmonella Enteritidis colonization in broilers. *Poultry Science*. 2008. **87**: 1734-1741.
- Cabuk M., Bozkurt M., Alcicek A., Akbas Y. & Kucukyilmaz K. Effect of a herbal essential oil mixture on growth and internal organ weight of broilers from young and old breeder flocks. *South African Journal of Animal Science*. 2006. **36**: 135-141.
- Callaway T.R., Dowd S.E., Wolcott R.D., Sun Y., McReynolds J.L., Edrington T.S., Byrd J.A., Anderson R.C., Krueger N. & Nisbet D.J. Evaluation of the bacterial diversity in cecal contents of laying hens fed various molting diets by using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing. *Poultry Science*. 2009. **88**: 298-302.
- Cankar K., Stebih D., Dreo T., Zel J. & Gruden K. Critical points of DNA quantification by real-time PCR - effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnology*. 2006. **6**: 37-52.
- Cao P.H., Li F.D., Li Y.F., Ru Y.J., Peron A., Schulze H. & Bento H. Effect of essential oils and feed enzymes on performance and nutrient utilization in broilers fed a corn/soy-based diet. *International Journal of Poultry science*. 2006. **9**: 749-755.
- Carey C.M., Kirk J.L., Ojha S. & Kostrzynska M. Current and future uses of real-time polymerase chain reaction and microarrays in the study of intestinal microbiota, and probiotic use and effectiveness. *Canadian Journal of Microbiology*. 2007. **53**: 537-550.
- Casewell M., Friis C., Marco E., McMullin P. & Phillips I. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003. **52**: 159-161.
- Castanon J.I.R. History of the use of antibiotic as growth promoters in european poultry feeds. *Poultry Science*. 2007. **86**: 2466-2471.

- Castillo M., Martin-Orue S.M., Roca M., Manzanilla E.G., Badiola I., Perez J.F. & Gasa J. The response of gastrointestinal microbiota to avilamycin, butyrate, and plant extracts in early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*. 2006. **84**: 2725-2734.
- Cavia-Saiz M., Busto M.D., Pilar-Izquierdo M.C., Ortega N., Perez-Mateos M. & Muniz P. Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2010. **90**: 1238-1244.
- Cazarolli L.H., Zanatta L., Alberton E.H., Figueiredo M., Folador P., Damazio R.G., Pizzolatti M.G. & Silva F. Flavonoids: Prospective Drug Candidates. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2008. **8**: 1429-1440.
- Ceylan E. & Fung D.Y.C. Antimicrobial activity of spices. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. 2004. **12**: 1-55.
- Champ M., Szylit O. & Gallant D.J. The influence of microflora on the breakdown of maize strach granules in the digestive-tract of chicken. *Poultry Science*. 1981. **60**: 179-187.
- Champ M., Szylit O., Raibaud P. & Aitabdelkader N. Amylase production by 3 *Lactobacillus* strains isolated from chicken crop. *Journal of Applied Bacteriology*. 1983. **55**: 487-493.
- Chang S.T., Chen P.F. & Chang S.H. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osopholeum*. *Ethnopharmacology*. 2001. **7**: 123-127.
- Chao S.C., Young D.G. & Oberg C.J. Screening for Inhibitory Activity of Essential Oils on Selected Bacteria, Fungi and Viruses *Journal of Essential Oil Research*. 2000. **12**: 639-649.
- Chaves A.V., He M.L., Yang W.Z., Hristov A.N., McAllister T.A. & Benchaar C. Effects of essential oils on proteolytic, deaminative and methanogenic activities of mixed ruminal bacteria. *Canadian Journal of Animal Science*. 2008. **88**: 117-122.
- Chowdhury S.R., Chowdhury S.D. & Smith T.K. Effects of dietary garlic on cholesterol metabolism in laying hens. *Poultry Science*. 2002. **81**: 1856-1862.
- Chowdhury S.R., King D.E., Willing B.P., Band M.R., Beever J.E., Lane A.B., Looor J.J., Marini J.C., Rund L.A., Schook L.B., Van Kessel A.G. & Gaskins H.R. Transcriptome profiling of the small intestinal epithelium in germfree versus conventional piglets. *BCM Genomics*. 2007. **8**: 215.
- Chu S., Takana S., Kaunitz J.D. & Montrose M.H. Dynamic regulation of gastric surface pH by luminal pH. *Journal of Clinical Investigation*. 1999. **103**: 605-612.

- Ciftci M., Dalkilic B., Cerci I.H., Guler T., Ertas O.N. & Arslan O. Influence of dietary cinnamon oil supplementation on performance and carcass characteristics in broilers. *Journal of Applied Animal Research*. 2009. **36**: 125-128.
- Cimanga K., Kambu K., Tona L., Apers S., De Bruyne T., Hermans N., Totté J., Pieters L. & Vlietinck A.J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002. **79**: 213-220.
- Clench M.H. & Mathias J.R. The avian caecum: a review. *Wilson Bulletin*. 1995. **107**: -.
- Coates M.E., Fuller R., Harrison G.F., Lev M. & Suffolk S.F. A comparison of the growth of chicks in the Gustafsonn germ-free apparatus and in a conventional environment, with and without dietary supplements of penicillin. *British Journal of Nutrition*. 1963. **17**: 141-150.
- Collado M.C. & Sanz Y. Characterization of the gastrointestinal mucosa-associated microbiota of pigs and chickens using culture-based and molecular methodologies. *Journal of Food Protection*. 2007. **70**: 2799-2804.
- Collins S.M. & Bercik P. The relationship between intestinal microbiota and the central nervous system in normal gastrointestinal function and disease. *Gastroenterology*. 2009. **136**: 2003-2014.
- Corfield A.P., Wagner S.A., Clamp J.R., Kriaris M.S. & Hoskins L.C. Mucin degradation in the human colon: production of sialidase, sialate O-acetyltransferase, N-acetylneuraminidase, arylesterase, and glycosulfatase activities by strain of fecal bacteria. *Infection and Immunity*. 1992. **60**: 3971-3978.
- Costa E., Puhl N.J., Selinger B. & Inglis D. Characterization of mucosa-associated bacterial communities of the mouse intestine by terminal restriction fragment length polymorphism: Utility of sampling strategies and methods to reduce single-stranded DNA artifacts. *Journal of Microbiological Methods*. 2009. **78**: 175-180.
- Cowan M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999. **12**: 564-582.
- Cowieson A.J. Strategic selection of exogenous enzymes for corn/soy-based poultry diets. *Journal of Poultry Science*. 2010. **47**: 1-7.
- Craig W.J. Health-promoting properties of common herbs. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1999. **70**: 491S-499S.

- Cross D.E., Mcdevitt R.M., Hillman K. & Acamovic T. The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. *British Poultry Science*. 2007. **48**: 496-506.
- Curtis T.P. & Sloan W.T. Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Current Opinion in Microbiology*. 2004. **7**: 221-226.
- da Silva R.R., de Oliveira T.T., Nagem T.J., Pinto A.S., Albino L.F., de Almeida M.R., de Moraes G.H. & Pinto J.G. Hypocholesterolemic effect of naringin and rutin flavonoids. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*. 2001. **51**: 258-264.
- Dahiya J.P., Wilkie D.C., Van Kessel A.G. & Drew M.D. Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. *Animal Feed Science and Technology*. 2006. **129**: 60-88.
- Danicke S., Vahjen W., Simon O. & Jeroch H. Effects of dietary fat type and xylanase supplementation to rye-based broiler diets on selected bacterial groups adhering to the intestinal epithelium, on transit time of feed, and on nutrient digestibility. *Poultry Science*. 1999. **78**: 1292-1299.
- Davydov M. & Krikorian A.D. *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim. (Araliaceae) as an adaptogen: a closer look. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000. **72**: 345-393.
- Dawson W.R. & Whittow G.C. Regulation of body temperature. In: *Sturkie's avian physiology* (ed. by Whittow GC), 2000.
- De Oliveira J.E., Scott T.A., van der Vossen J.M.B.M., Ouwens A.M.T., Hangoor E. & Montijn R.C. Establishing beneficial bacteria in the gut of chickens prior to hatching. *Beneficial Microbes Conference*. 2010. Noordwijkerhout, The Netherlands.
- Demir E., Sarica E., Ozcan M.A. & Suicmez M. The use of natural feed additives as alternative to an antibiotic growth promoter in broiler diets. *Archiv fur Geflugelkunde*. 2005. **69**: 110-116.
- Denbow D.M. Gastrointestinal anatomy and physiology. In: *Sturkie's Avian Physiology* (ed. by Whittow GC), 1999.
- Denli M., Okan F. & Uluocak A.N. Effect of dietary supplementation of herb essential oils on the growth performance, carcass and intestinal characteristics of quail (*Coturnix coturnix japonica*). *South African Journal of Animal Science*. 2004. **34**: 174-179.

- Deplancke B. & Gaskins H.R. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2001. **73**: 1131S-1141S.
- Deyama T., Nishibe S. & Nakazawa Y. Constituents and pharmacological effects of Eucommia and Siberian ginseng. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2001. **22**: 1057-1070.
- Dho-Moulin M. & Fairbrother J.M. Avian pathogenic Escherichia coli (APEC). *Veterinary Research*. 1999. **30**: 299-316.
- Diarra M.S., Silversides F.G., Diarrassouba F., Pritchard J., Masson L., Brousseau R., Bonnet C., Delaquis P., Bach S., Skura B.J. & Topp E. Impact of feed supplementation with antimicrobial agents on growth performance of broiler chickens, *Clostridium perfringens* and Enterococcus counts, and antibiotic resistance phenotypes and distribution of antimicrobial resistance determinants in *Escherichia coli* Isolate. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007. **73**: 6566-6576.
- Dibner J. Organic acids: can they replace antibiotic growth promoters? *Feed International*. 2004. **25**: 14-16.
- Dibner J.J. & Richards J.D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry Science*. 2005. **84**: 634-643.
- Dibner J.J., Richards J.D. & Knight C.D. Microbial imprinting in gut development and health. *Journal of Applied Poultry Research*. 2008. **17**: 174-188.
- Dieumou F.E., Tegua A., Kuate J.R., Tamokou J.D., Fonge N.B. & Dongmo M.C. Effects of ginger (*Zingiber officinale*) and garlic (*Allium sativum*) essential oils on growth performance and gut microbial population of broiler chickens. *Livestock research for rural development*. 2009. **21**: 131.
- Dorman H.J.D. & Deans S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 2000. **88**: 308-316.
- Dozier W., Thaxton J., Purswell J.L., Olanrewaju H.A., Branton S. & Roush W. Stocking density effects on male broilers grown to 1.8 kilograms of body weight. *Poultry Science*. 2006. **85**: 344-351.
- Dozier W.A., Thaxton J.P., Branton S.L., Morgan G.W., Miles D.M., Roush W.B., Lott B.D. & Vizzier-Thaxton Y. Stocking density effects on growth performance and processing yields of heavy broilers. *Poultry Science*. 2005. **84**: 1332-1338.
- Duerkop B.A., Vaishnav S. & Hooper L.V. Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosa surface. *Immunity*. 2009. **31**: 368-376.

- Duke G.E., Evanson O.A. & Huberty B.J. Electrical potential changes and contractile activity of the distal cecum of turkeys. *Poultry Science*. 1980. **59**: 1925-1934.
- Edelman S., Westerlund-Wikström B., Leskelä S., Kettunen H., Rautonen N., Apajalahti J. & Korhonen T.K. In vitro adhesion specificity of indigenous Lactobacilli within the avian intestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002. **68**: 5155-5159.
- EFSA. Technical report of EFSA : Report for 2009 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. 2009.
- El-Ghousein S.S. & Al-Beitawi N.A. The effect of feeding of crushed thyme (*Thymus vulgaris* L) on growth, blood constituents, gastrointestinal tract and carcass characteristics of broiler chickens. *Journal of Poultry Science*. 2009. **46**: 100-104.
- El-Motaal A.M.A., Ahmed A.M.H., Bahakaim A.S.A. & Fathi M.M. Productive performance and immunocompetence of commercial laying hens given diets supplemented with Eucalyptus. *International Journal of Poultry science*. 2008. **7**: 445-449.
- Engberg R.M., Hedemann M.S. & Jensen B.B. The influence of grinding and pelleting of feed on the microbial composition and activity in the digestive tract of broiler chickens. *British Poultry Science*. 2002. **43**: 569-579.
- Engberg R.M., Hedemann M.S., Steinfeldt S. & Jensen B.B. Influence of whole wheat and xylanase on broiler performance and microbial composition and activity in the digestive tract *Poultry Science*. 2004. **83**: 925-938.
- Epstein J., Sanderson I.R. & MacDonald T.T. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *British Journal of Nutrition*. 2010. **103**: 1545-1557.
- Estevez I. Density allowances for broilers: where to set the limits? *Poultry Science*. 2007. **86**: 1265-1272.
- European Commission. Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the council of the 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. 2003.
- European Commission. Council directive 2007/43/EC of 28 June 2007 laying down minimum rules for the protection of chickens kept for meat production. 2007.
- European Commission. Directive 2010/63/UE du parlement européen et du conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. 2010. <http://www.bacterio.cict.fr>. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire

- Fakhry S., Manzo N., D'Apuzzo E., Pietrini L., Sorrentini I., Ricca E., De Felice M. & Baccigalupi L. Characterization of intestinal bacteria tightly bound to the human ileal epithelium. *Research in Microbiology*. 2009. **160**: 817-823.
- Fang J., Yan F.Y., Kong X.F., Ruan Z., Liu Z.Q., Huang R.L., Li T.J., Geng M.M., Yang F., Zhang Y.Z., Li P., Gong J., Wu G.Y., Fan M.Z., Liu Y.L., Hou Y.Q. & Yin Y.L. Dietary supplementation with *Acanthopanax senticosus* extract enhances gut health in weanling piglets. *Livestock Science*. 2009. **123**: 268-275.
- Farner D.S. The hydrogen ion concentration in avian digestive tracts. *Poultry Science*. 1942. **21**: 445-450.
- FDA. Environmental assesment for Clinacox™ Type A Medicated Article for Chicken and Turkey (Diclazuril), NADA number 140-951. 1996.
- Florou-Paneri P., Giannenas I., Christaki E., Govaris A. & Bostoglou N.A. Performance of chicken and oxydative stability of the produced meat as affected by supplementation with oregano, vitamin C, vitamin E and thei combinations. *Archiv fuer Gefluegelkunde*. 2006. **70**: 232-240.
- Fonty G. & Chaucheyras-Durand F. Ecologie microbienne digestive et écologie générale, taxonomie et systèmes de classification des Procaryotes, notion d'espèce. In: *Les écosystèmes digestifs* (ed. by Lavoisier), 2007. pp. 1-33.
- Fonty G. & Chaucheyras-Durand F. Facteurs influençant la structure de l'écosystème microbien du tube digestif. In: *Les écosystèmes digestifs* (ed. by Lavoisier), 2007. pp. 235-273.
- Fonty G. & Chaucheyras-Durand F. Interactions entre l'hôte et sa microflore digestive. In: *Les écosystèmes digestifs* (ed. by Lavoisier), 2007. pp. 195-233.
- Fonty G. & Chaucheyras-Durand F. Niches écologiques potentielles des principales espèces microbinnes, capacités métaboliques. In: *Les écosystèmes digestifs* (ed. by Lavoisier), 2007. pp. 157-195.
- Fonty G. & Chaucheyras-Durand F. Techniques d'étude de la microflore digestive. In: *Les écosystèmes digestifs* (ed. by Lavoisier), 2007. pp. 33-70.
- Forbes M. & Park J.T. Growth of germ-free and conventional chicks: effect of diet, dietary penicillin and bacterial environment. *The Journal of Nutrition*. 1959. **67**: 69-84.
- Forder R.E.A., Howarth G.S., Tivey D.R. & Hughes R.J. Bacterial modulation of small intestinal goblet cells and mucin composition during early posthatch development of Poultry. *Poultry Science*. 2007. **86**: 2396-2403.

- Fotea L., Costachescu E., Hoa G. & Leonte D. The effect of oregano essential oil (*Origanum vulgare* L) on broiler performance. *Seria Zootehnie*. 2010. **53**: 491-494.
- Francis G., Kerem Z., Makkar H.P.S. & Becker K. The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition*. 2002. **88**: 587-605.
- Franco R.M., Oliveira L.A.T.D. & J.C.A.D.P C. Probióticos – revisão. *Higiene Alimentar*. 2006. **20**: 22-33.
- Fries R., Akcan M., Bandick N. & Kobe A. Microflora of two different types of poultry litter. *British Poultry Science*. 2005. **46**: 668-672.
- Fromin N., Hamelin J., Tarnawski S., Roesti D., Jourdain-Miserez K., Forestier N., Teyssier-Cuvelle S., Gillet F., Aragno M. & Rossi P. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology*. 2002. **4**: 634-643.
- Fulefi T. & Ricardo da Silva J.M. Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in ontario. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997. **45**: 1156-1160.
- Fuller R. & Brooker B.E. Lactobacilli which attach to the crop epithelium of the fowl. *The American Journal of Microbiology*. 1974. **27**: 1305-1312.
- Fuller R. & Turvey A. Bacteria associated with the intestinal wall of the fowl (*Gallus domesticus*). *Journal of Applied Bacteriology*. 1971. **34**: 617-622.
- Furet J.P., Firmesse O., Gourmelon M., Bridonneau C., Tap J., Mondot S., Dore J. & Corthier G. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiology Ecology*. 2009. **68**: 351-362.
- Furuse M., Mabayo T. & Okumura J.I. The role of gustation in oil preference in chicken. *Japanese Poultry Science*. 1996. **33**: 256-260.
- Furuse M. & Okumura J. Nutritional and physiological characteristics in germ-free chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology A Comparative Physiology*. 1994. **109**: 547-556.
- Gabriel I., Christensen H., Badiola I., Francesh M. & Pissavin C. Effects of alternative to AGP on the digestive flora using fingerprint methods (RFLP, CE-SSCP and TTGE). *European Project, Specific Targeted Research Project. PoultryFlorGut 2005-2008. Control of the intestinal flora ecology in poultry for ensuring the products safety for human consumers. Deliverable D4.9., Rapport public, 113 p.* 2008.

- Gabriel I., Leconte M., Guillon J., Rideaud P., Moreau-Vauzelle C. & Dupont C. Individual variability in the digestive flora of the broiler chicken analysed by molecular fingerprint. *16th European Symposium on Poultry Nutrition*. 2007: 305-308. Strasbourg, France.
- Gabriel I., Leconte M., Guillon J., Rideaud P., Moreau-Vauzelle C. & Dupont C. Variabilité individuelle de la flore digestive du poulet observée par empreinte moléculaire. *Septièmes Journées de la Recherche Avicole*. 2007. Tours, France.
- Gabriel I., Lessire M., Juin H., Burstin J., Duc G., Quillien L., Thibault J.N., Leconte M., Hallouis J.M., Ganier P., Mézière N. & Séve B. Variation in seed protein digestion of different pea (*Pisum sativum* L.) genotypes by cecectomized broiler chickens. 1. Endogenous amino acid losses, true digestibility and in vitro hydrolysis of proteins. *Livestock Science*. 2008. **113**: 251-261.
- Gabriel I., Lessire M., Mallet S. & Guillot J.F. Microflora of the digestive tract: critical factors and consequences for poultry. *World's Poultry Science Journal*. 2006. **62**: 499-511.
- Gabriel I., Mallet S. & Sibille P. La microflore digestive des volailles: facteurs de variation et conséquences pour l'animal. *INRA Productions Animales*. 2005. **18**: 309-322.
- Gabriel I., Pissavin C., Williams J., Mallet S., Beven V., Burel C., Leconte M., Rideaud P., Moreau-Vauzelle C., Dupont C., Fravallo P. & Lessire M. The effects of fructo-oligosaccharides or whole wheat on the digestive bacterial community of broiler chickens using fingerprint methods. *6th INRA-RRI Symposium on Gut Microbiome*. 2008: pp. 81-82. Clermont-Ferrand, France.
- Garcia V., Catala-Gregori P., Hernandez F., Megias M.D. & Madrid J. Effect of formic acid and plant extracts on growth, nutrient digestibility, intestine mucosa morphology, and meat yield of broilers. *Journal of Applied Poultry Research*. 2007. **16**: 555-562.
- Gautam R. & Jachak S.M. Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Medicinal Research Reviews*. 2009. **29**: 767-820.
- Geier M.S., Torok V.A., Allison G.E., Ophel-Keller K. & Hughes R.J. Indigestible carbohydrates alter the intestinal microbiota but do not influence the performance of broiler chickens. *Journal of Applied Microbiology*. 2009. **106**: 1540-1548.
- Gérard P., Béguet F., Lepercq P., Rigottier-Gois L., Rochet V., Andrieux C. & Juste C. Gnotobiotic rats harboring human intestinal microbiota as a model for studying

- cholesterol-to-coprostanol conversion. *FEMS Microbiology Ecology*. 2004. **47**: 337-343.
- Gérard P., Brézillon C., Quéré F., Salmon A. & Rabot S. Characterization of cecal microbiota and response to an orally administered *Lactobacillus* probiotic strain in the broiler chicken. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2008. **14**: 115-122.
- Ghazalah A.A. & Ali A.M. Rosemary leaves as a dietary supplement for growth in broiler chickens. *International Journal of Poultry science*. 2008. **7**: 234-239.
- Giger-Reverdin S., Duvaux-Ponter C., Sauvant D., Martin O., do Prado I.N. & Muller R. Intrinsic buffering capacity of feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology*. 2002. **96**: 83-102.
- Gilbert E.R., Li H., Emmerson D.A., Webb K.E. & Wong E.A. Dietary protein composition influences abundance of peptide and amino acid transporter messenger ribonucleic acid in the small intestine of 2 lines of broiler chicks. *Poultry Science*. 2010. **89**: 1663-1676.
- Gilbert E.R., Li H., Ernmersonj D.A., Webb K.E. & Wong E.A. Developmental regulation of nutrient transporter and enzyme mRNA abundance in the small intestine of broilers. *Poultry Science*. 2007. **86**: 1739-1753.
- Godon J.J., Zumstein E., Dabert P., Habouzit F. & Moletta R. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997. **63**: 2802-2813.
- Golian A. & Maurice D.V. Dietary poultry fat and gastrointestinal transit-time of feed and fat utilization in broiler-chickens. *Poultry Science*. 1992. **71**: 1357-1363.
- Gomez G. & Celii A. The peripheral olfactory system of the domestic chicken: Physiology and development. *Brain Research Bulletin*. 2008. **76**: 208-216.
- Goncalves C., Dinis T. & Batista M.T. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. *Phytochemistry*. 2005. **66**: 89-98.
- Gong J., Forster R.J., Yu H., Chambers J.R., Sabour P.M., Wheatcroft R. & Chen S. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. *FEMS Microbiology Letters*. 2002. **208**: 1-7.
- Gong J., Si W., Forster R.J., Huang R., Yu H., Yin Y., Yang C. & Han Y. 16S rRNA gene based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the

- chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. *FEMS Microbiology Ecology*. 2007. **59**: 147-157.
- Gong J., Yu H., Liu T., Gill J.J., Chambers J.R., Wheatcroft R. & Sabour P.M. Effects of zinc bacitracin, bird age and access to range on bacterial microbiota in the ileum and caeca of broiler chickens. *Journal of Applied Microbiology*. 2008. **104**: 1372-1382.
- Gong J.H., Forster R.J., Yu H., Chambers J.R., Wheatcroft R., Sabour P.M. & Chen S. Molecular analysis of bacterial populations in the ileum of broiler chickens and comparison with bacteria in the cecum. *FEMS Microbiology Ecology*. 2002. **41**: 171-179.
- Goñi I. Indigestible components of grape seeds modify cecal enzyme activity in rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2004. **48**: 369-373.
- Goñi I., Brenes A., Centeno C., Viveros A., Saura-Calixto F., Rebolé A., Arijia I. & Estevez R. Effect of dietary grape pomace and vitamin E on growth performance, nutrient digestibility, and susceptibility to meat lipid oxidation in chickens. *Poultry Science*. 2007. **86**: 508-516.
- Gonzales-Alvarado J.M., Jiménez-Moreno E., Valencia D.G., Lazaro R. & Mateos G.G. Effects of fiber source and heat processing of the cereal on the development and pH of the gastrointestinal tract of broilers fed diet based on corn or rice. *Poultry Science*. 2008. **87**: 1779-1795.
- Gonzalez-Esquerria R. & Leeson S. Physiological and metabolic responses of broilers to heat stress - implication for protein and amino acids nutrition. *World's Poultry Science Journal*. 2006. **62**: 282-295.
- Gowda N.K.S., Ledoux D.R., Rottinghaus G.E., Bermudez A.J. & Chen Y.C. Antioxidant efficacy of curcuminoids from turmeric (*Curcuma longa* L.) powder in broiler chickens fed diets containing aflatoxin B-1. *British Journal of Nutrition*. 2009. **102**: 1629-1634.
- Griffin S.G., Wyllie S.G., Markham J.L. & Leach D.N. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*. 1999. **14**: 322-332.
- Guan L.L., Hagen K.E., Tannock G.W., Korver D.R., Fasenko G.M. & Allison G.E. Detection and identification of *Lactobacillus* species in crops of broilers of different ages by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and amplified ribosomal

- DNA restriction analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003. **69**: 6750-6757.
- Guardia S., Furet J.-P., Recoquillay F., Juin H., Lessire M., Leconte M., Rideaud P., Moreau-Vauzelle C., Dupont C., Guillot J.F. & Gabriel I. A comparison of two methods to extract bacterial DNA of the digestive tract. *6th International Symposium of Anaerobic Microbiology, Liblice, Czech Republic*. 2009.
- Guardia S., Konsack B., Combes S., Levenez F., Guillot J.F., Moreau-Vauzelle C., Lessire M., Juin H. & Gabriel I. Effect of stocking density on the growth performance and digestive microbiota of broilers chickens. *Poultry Science*. 2011a. **90**: 1878-1889.
- Guardia S., Konsack B., Combes S., Levenez F., Cauquil L., Guillot J.F., Moreau-Vauzelle C., Lessire M., Juin H. & Gabriel I. Effect of a natural phytobiotic blend and stocking density on growth performance and digestive microbiota of broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*. 2011b. *In prep*.
- Guardia S., Recoquillay F., Juin H., Lessire M., Leconte M., Guillot J.F. & Gabriel I. Effet de l'utilisation de combinaisons d'extraits végétaux naturels dans l'alimentation du poulet de chair selon la densité d'élevage sur les performances de croissance. *8èmes Journées de la Recherche Avicole*. 2009: 307-311. St Malo, France.
- Güler T., Erats O.N., Ciftci M. & Dalkilic B. The effect of coriander seed (*Coriandrum sativum L.*) as diet ingredient on the performance of Japanese quail. *South African Journal of Animal Science*. 2005. **35**: 260-266.
- Harborne J.B. Twenty-five years of chemical ecology. *Natural Product Reports*. 2001. **18**: 361-379.
- Harkey M.R., Henderson G.L., Gershwin M.E., Stern J.S. & Hackman R.M. Variability in commercial ginseng products: an analysis of 25 preparations. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2001. **73**: 1101-1106.
- Harrow S.A., Ravindran V., Butler R.C., Marshall J.W. & Tannock G.W. Real-time quantitative PCR measurement of ileal *Lactobacillus salivarius* populations from broiler chickens to determine the influence of farming practices. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007. **73**: 7123-7127.
- Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products*. 1995. **59**: 205-215.
- Hatcher H., Planalp R., Cho J., Tortia F.M. & Torti S.V. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008. **65**: 1631-1652.

- He G.L., Shankar R.A., Chzhan M., Samouilov A., Kuppusamy P. & Zweier J.L. Noninvasive measurement of anatomic structure and intraluminal oxygenation in the gastrointestinal tract of living mice with spatial and spectral EPR imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999. **96**: 4586-4591.
- Heilig H.G.H.J., Zoetendal E.G., Vaughan E.E., Marteau P., Akkermans A.D.L. & de Vos W.M. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002. **68**: 114-123.
- Heitzman M.E., Neto C.C., Winiarz E., Vaisberg A.J. & Hammond G.B. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry*. 2005. **66**: 5-29.
- Hermans P.G. & Morgan K.L. Prevalence and associated risk factors of necrotic enteritis on broiler farms in the United Kingdom; a cross-sectional survey. *Avian Pathology*. 2007. **36**: 43-51.
- Hernandes R., Cazetta J.O. & de Moraes V.M.B. Nitrogenous and glycidic fractions and ammonia released by broiler litter in different stocking densities and periods of breeding. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science*. 2002. **31**: 1795-1802.
- Hernández F., Madrid J., García V., Orengo J. & Megías M.D. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poultry Science*. 2004. **83**: 168-174.
- Herpol C. Influence de l'âge sur le pH dans le tube digestif de *Gallus domesticus*. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*. 1966. **6**: 495.
- Hildebrand H., Malmborg P., Askling J., Ekblom A. & Montgomery S.M. Early-life exposures associated with antibiotic use and risk of subsequent Crohn's disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2008. **43**: 961-966.
- Hillman K. Bacteriological aspects of the use of antibiotics and their alternatives in the feed of non-ruminants animals. In: *Recent developments in Non-Ruminants nutrition* (ed. by press Nu), 2006. pp. 395-422.
- Hodges R.D. The digestive System. In: *The histology of the fowl* (ed. by Press A), 1974. pp. 35-108.

- Hooper L.V. Do symbiotic bacteria subvert host immunity? *Nature Reviews Microbiology*. 2009. **7**: 367-374.
- Hooper L.V. & Macpherson A.J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology*. 2010. **10**: 159-169.
- Hounsome N., Hounsome B., Tomos D. & Edwards-Jones G. Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *Journal of Food Science*. 2008. **73**: R48-R65.
- Huang J.X., Luo X.G., Lu L. & Liu B. Effects of age and strain on yolk sac utilization and leptin levels in newly hatched broilers. *Poultry Science*. 2008. **87**: 2647-2652.
- Hume M.E., Clemente-Hernandez S. & Oviedo-Rondon E.O. Effects of feed additives and mixed *Eimeria* species infection on intestinal microbial ecology of broilers. *Poultry Science*. 2006. **85**: 2106-2111.
- Hume M.E., Kubena L.F., Edrington T.S., Donskey C.J., Moore R.W., Ricke S.C. & Nisbet D.J. Poultry digestive microflora biodiversity as indicated by denaturing gradient gel electrophoresis. *Poultry Science*. 2003. **82**: 1100-1107.
- Humphrey B.D. & Klasing K.C. Modulation of nutrient metabolism and homeostasis by the immune system. *World's Poultry Science Journal*. 2004. **60**: 90-100.
- Huws S.A., Edwards J.E., Kim E.J. & Scollan N.D. Specificity and sensitivity of eubacterial primers utilized for molecular profiling of bacteria within complex microbial ecosystems. *Journal of Microbiological Methods*. 2007. **70**: 565-569.
- Huyghebaert G., Ducatelle R. & Van Immerseel F. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *The Veterinary Journal*. 2011. **187**: 182-188.
- Iji P.A., Saki A. & Tivey D.R. Body and intestinal growth of broiler chicks on a commercial starter diet. 2. Development and characteristics of intestinal enzymes. *British Poultry Science*. 2001. **42**: 514-522.
- Imondi A.R. & Bird F.H. The turnover of intestinal epithelium in the chick. *Poultry Science*. 1966. **45**: 142-147.
- Iqbal M.F. & Zhu W.Y. Bioactivation of flavonoid diglycosides by chicken cecal bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 2009. **295**: 30-41.
- Iqbal M.F. & Zhu W.Y. Characterization of newly isolated *Lactobacillus delbrueckii*-like strain MF-07 isolated from chicken and its role in isoflavone biotransformation. *FEMS Microbiology Letters*. 2009. **291**: 180-187.

- Jacobs D.M., Gaudier E., van Duynhoven J. & Vaughan E.E. Non-digestible food ingredients, colonic microbiota and the impact on gut health and immunity: A role for metabolomics. *Current Drug Metabolism*. 2009. **10**: 41-54.
- Jamroz D., Orda J., Kamel C., Wiliczekiewicz A., Wertelecki T. & Skorupinska J. The influence of phytogetic extracts on performance, nutrient digestibility, carcass characteristics, and gut microbial status in broiler chickens. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 2003. **12**: 583-596.
- Jamroz D., Wertelecki T., Houszka M. & Kamel C. Influence of diet type on the inclusion of plant origin active substances on morphological and histochemical characteristics of the stomach and jejunum walls in chicken. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2005. **90**: 255-268.
- Jamroz D., Wertelecki T., Wiliczekiewicz A., Orda J. & Skorupinska J. Dynamics of yolk sac resorption and post-hatching development of the gastrointestinal tract in chickens, ducks and geese. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2004. **88**: 239-250.
- Jang I.S., Ko Y.H., Kang S.Y. & Lee C.Y. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*. 2007. **134**: 304-315.
- Jayalakshmi T., Kumararaj R., Sivakumar T., Vanan T.T. & Thiagarajan D. Influence of stocking densities on litter moisture, microbial load, air ammonia concentration and broiler performance. *Tamilnadu Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2009. **5**: 80-86.
- Jayaprakasha G.K., Jagan L., Rao M. & Sakariah K.K. Chemistry and biological activities of *C-longa*. *Trends in Food Science & Technology*. 2005. **16**: 533-548.
- Jeon S.M., Bok S.M., Jang M.K., Le M.K., Nam K.T., Park Y.B., Rhee S.J. & Choi M.S. Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high cholesterol-fed rabbits. *Life Sciences*. 2001. **69**: 2855-2866.
- Jeroch H., Kozlowski K., Jeroch J., Lipinski K., Zdunczyk Z. & Jankowski J. Efficacy of the phytogetic (Papaveraceae) additive Sangrovit (R) in growing monogastric animals. *Zuchtungskunde*. 2009. **81**: 279-293.
- Jez C., Beaumont C., Magdelaine P. & Paillard S. (2009) Prospective : la filière avicole française à l'horizon 2025. In: *Rapport du groupe de travail Prospective avicole*. INRA - ITAVI.

- Jiménez-Moreno E., Gonzales-Alvarado J.M., de Coca-Sinova A., Lazaro R. & Mateos G.G. Effects of source of fibre on the development and pH of the gastrointestinal tract of broilers. *Animal Feed Science and Technology*. 2009. **154**: 93-101.
- Jimenezramsey L.M., Rogler J.C., Housley T.L., Butler L.G. & Elkin R.G. Absorption and distribution of C-14-labeled condensed tannins and related sorghum phenolics in chickens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1994. **42**: 963-967.
- Jin S.H., Corless A. & Sell J.L. Digestive system development in post-hatch poultry. *World's Poultry Science Journal*. 1998. **54**: 335-345.
- Johansen C.H., Bjerrum L. & Pedersen K. Impact of salinomycin on the intestinal microflora of broiler chickens. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2007. **49**: 30.
- Johansson M.E.V., Phillipson M., Petersson J., Velcich A., Holm L. & Hansson G.C. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008. **105**: 15064-15069.
- John L.J., Fromm M. & Schulzke J.D. Epithelial barriers in intestinal inflammation. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2011. **15**: 1255-1270.
- Jones R.B. & Roper T.J. Olfaction in the domestic fowl: A critical review. *Physiology & Behavior*. 1997. **62**: 1009-1018.
- Jorge M.A., Baiao N.C., Oliveira R.L.D. & Resende J.S.D. Stocking density effect on escherichia-coli populations in the litter and internal organs of broilers. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*. 1988. **40**: 53-64.
- Jouany J.P. & Morgavi D.P. Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal*. 2007. **1**: 1443-1466.
- Jozefiak D., Rutkowski A. & Martin S.A. Carbohydrate fermentation in the avian ceca: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 2004. **113**: 1-15.
- Jurani M., Lamosova D., Macajova M., Kostal L., Joubert E. & Greksak M. Effect of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) on Japanese quail growth, egg production and plasma metabolites. *British Poultry Science*. 2008. **49**: 55-64.
- Kan C.A. & Meijer G.A.L. The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. *Feed Safety*. 2007. **133**: 84-108.
- Kanagawa T. Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2003. **4**.

- Kanno S.I., Shouji A., Tomizawa A., Hiura T., Osanai Y., Ujibe M., Obara Y., Nakahata N. & Ishikawa M. Inhibitory effect of naringin on lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxin shock in mice and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *Life Science*. 2006. **78**: 673-681.
- Karadas F., Grammenidis E., Surai P.F., Acamovic T. & Sparks C. Effects of carotenoids from lucerne, marigold and tomato on egg yolk pigmentation and carotenoid composition. *British Poultry Science*. 2006. **47**: 561-566.
- Karlen Y., McNair A., Perseguers S., Mazza C. & Mermod N. Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics*. 2007. **8**.
- Katschinski M. Nutritional implications of cephalic phase gastrointestinal responses. *Appetite*. 2000. **34**: 189-196.
- Kim T. & Mundt E. Metagenomic analysis of intestinal microbiomes in chickens. *Methods in Molecular Biology*. 2011. **733**: 185-194.
- Kirchgessner M., Eder K., Muller H.L. & Jamroz D. The energetic value of non-starch-polysaccharides for poultry. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition-Zeitschrift Fur Tierphysiologie Tierernahrung Und Futtermittelkunde*. 1999. **81**: 51-55.
- Kirkpinar F., Unli H.B. & Ozdemir G. Effects of oregano and garlic essential oils on performance, carcass, organ and blood characteristics and intestinal microflora of broilers. *Livestock Science*. 2010. **137**: 619.
- Kizerwetter-Swida M. & Binek M. Bacterial microflora of the chicken embryos and newly hatched chicken. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 2008. **17**: 224-232.
- Klasing K.C. Anatomy and physiology of the digestive system. In: *Comparative avian nutrition* (ed. by Klasing KC), 1998.
- Klasing K.C. Digestion of food. In: *Comparative avian nutrition* (ed. by Klasing KC), 1998.
- Klasing K.C., Johnstone B.J. & Benson B.N. Implications of an immune response on growth and nutrient requirements of chicks. In: *Recent advances in animal nutrition - 1991*. (1991. pp. 135-146.
- Klein G., Pack A., Bonaparte C. & Reuter G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 1998. **41**: 103-125.
- Knarreborg A., Simon M.A., Engberg R.M., Borg Jensen B. & Gerald W.T. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the

- ileum of broiler chickens at various ages. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002. **68**: 5918-5924.
- Kohlert C., Schindler G., Marz R.W., Abel G., Rinkhaus B., Derendorf H., Grafe E.U. & Veit M. Systemic availability and pharmacokinetics of thymol in humans. *Journal of Clinical Pharmacology*. 2002. **42**: 731-737.
- Kohlert C., van Rensen I., März R., Schindler G., Graefe E.U. & Veit M. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans *Planta Medica*. 2000. **66**: 495-505.
- Konjufca V.H., Pesti G.M. & Bakalli R.I. Modulation of cholesterol levels in broiler meat by dietary garlic and copper. *Poultry Science*. 1997. **76**: 1264-1271.
- Konsak B., Guardia S., Leconte M., Moreau-Vauzelle C., Dupont C., Mignon-Grasteau S. & Gabriel I. Comparison of the digestive microbiota between two divergent lines of chickens selected based on digestive capacity. *7th International Symposium of Anaerobic Microbiology*. 2011: 17. Smolenice, Slovakia.
- Koppel C., Martens F., Schirop T. & Ibe K. Hemoperfusion in Acute Camphor Poisoning. *Intensive Care Medicine*. 1988. **14**: 431-433.
- Kristensen H.H. & Wathes C.M. Ammonia and poultry welfare : a review. *World's Poultry Science Journal*. 2000. **56**: 235-245.
- Krogdahl A. Digestion and absorption of lipids in poultry. *Journal of Nutrition*. 1985. **115**: 675-685.
- Krogdahl A. & Sell J.L. Influence of age on lipase, amylase, and protease activities in pancreatic tissue and intestinal contents of young turkeys. *Poultry Science*. 1989. **68**: 1561-1568.
- Kumar K., Gupta S.C., Chander Y. & Singh A.K. Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment. *Advances in Agronomy*. 2005. **87**: 1-54.
- Kumar S., Sharadamma K.C. & Radhakrishna P.M. Effects of a garlic active based growth promoter on growth performance and specific pathogenic intestinal microbial counts of broiler chicks. *International Journal of Poultry science*. 2010. **9**: 244-246.
- La Ragione R.M., Narbad A., Gasson M.J. & Woodward M.J. In vivo characterization of *Lactobacillus johnsonii* FI9785 for use as a defined competitive exclusion agent against bacterial pathogens in poultry. *Letters in Applied Microbiology*. 2004. **38**: 197-205.

- Lai H.T.L., Nieuwland M.G.B., Kemp B., Aarnink A.J.A. & Parmentier H.K. Effects of dust and airborne dust components on antibody responses, body weight gain, and heart morphology of broilers. *Poultry Science*. 2009. **88**: 1838-1849.
- Lan P.T.N., Hayashi H., Sakamoto M. & Benno Y. Phylogenetic analysis of cecal microbiota in chicken by the use of 16S rDNA clone libraries. *Microbiology and Immunology*. 2002. **46**: 371-382.
- Langeroudi A.G., Kiaei S.M.M., Modirsanei M., Mansouri B. & Estabragh A.S. Comparison of chemical and biological growth promoter with two herbal natural feed additives on broiler chicks performance. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2008. **7**: 570-574.
- Langhout D.J., Schutte J.B., van Leeuwen P., Wiebenga J. & Tamminga S. Effect of dietary high- and low-methylated citrus pectin on the activity of the ileal microflora and morphology of the small intestinal wall of broiler chicks. *British Poultry Science*. 1999. **40**: 340-347.
- Lecuelle S., Bouvarel I., Chagneau A.M., Laviron F., Lescoat P., Leterrier C. Early visual experience of food does not appear to reduce subsequent feed neophobia in turkeys. *Poultry Science*. 2011. **90**: 1-9.
- Lee K.W., Everts H. & Beynen A.C. Essential oils in broiler nutrition. *International Journal of Poultry science*. 2004. **3**: 738-752.
- Lee K.W., Everts H., Kappert H.J., Frehner M., Losa R. & Beynen A.C. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. *British Poultry Science*. 2003. **44**: 450-457.
- Lee S.H., Lillehoj H.S., Jang S.I., Kim D.K., Ionescu C. & Bravo D. Effect of dietary curcuma, capsicum, and lentinus on enhancing local immunity against *Eimeria acervulina* Infection. *Journal of Poultry Science*. 2010. **47**: 89-95.
- Lee Z.M.P., Bussema 3dr C. & Schmidt T.M. rrnDB: documenting the number of rRNA and tRNA genes in bacteria and archaea. *Nucleic Acids Research*. 2009. **37**: D489-D493.
- Lewis M.R., Rose S.P., Mackenzie A.P. & Tucker L.A. Effects of dietary inclusion of plant extracts on the growth performance of male broiler chickens. *British Poultry Science*. 2003. **44**: S43-S44.
- Li M., Gong J., Cottrill M., Yu H., de Langes C., Burton J. & Topp E. Evaluation of QIAamp® DNA Stool Mini Kit for ecological studies of gut microbiota. *Journal of Microbiological Methods*. 2003. **54**: 13-20.

- Liévin-Le Moal V. & Servin A.L. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006. **19**: 315-337.
- Lillie R.J., Sizemore J.R. & Bird H.R. Environment and stimulation of growth of chicks by antibiotic. *Poultry Science*. 1953. **32**: 466-475.
- Lipthay J.R.d., Enzinger C., Johnsen K., Aamand J. & Srensen S.J. Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis. *Enzymes in the environment: activity, ecology and applications. Second International Conference, Prague, Czech Republic, July 2003* . 2004: 1607-1614.
- Loizzo M.R., Tundis R., Menichini F., Saab A.M., Statti G.A. & Menichini F. Antiproliferative effects of essential oils and their major constituents in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells. *Cell Proliferation*. 2008. **41**: 1002–1012
- Louis P. & O'Byrne C.P. Life in the gut: microbial responses to stress in the gastrointestinal tract. *Science Progress*. 2010. **93**: 7-36.
- Lu J., Idris U., Harmon B., Hofacre C., Maurer J.J. & Lee M.D. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003. **69**: 6816-6824.
- Ludwig W. & Schleifer K.H. How quantitative is quantitative PCR with respect to cell counts? *Systematic and Applied Microbiology*. 2000. **23**: 556-562.
- Ludwig W., Strunk O., Westram R., Richter L., Meier H., Yadhukumar, Buchner A., Lai T., Steppi S., Jobb G., Forster W., Brettske I., Gerber S., Ginhart A.W., Gross O., Grumann S., Hermann S., Jost R., König A., Liss T., Lussmann R., May M., Nonhoff B., Reichel B., Strehlow R., Stamatakis A., Stuckmann N., Vilbig A., Lenke M., Ludwig T., Bode A. & Schleifer K.H. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research*. 2004. **32**: 1363-1371.
- Lumpkins B.S., Batal A.B. & Lee M. The effect of gender on the bacterial community in the gastrointestinal tract of broilers. *Poultry Science*. 2008. **87**: 964-967.
- Lumpkins B.S., Batal A.B. & Lee M.D. Evaluation of the bacterial community and intestinal development of different genetic lines of chickens. *Poultry Science*. 2010. **89**: 1614-1621.

- Luna A., Labaque M.C., Zygadlo J.A. & Marin R.H. Effects of thymol and carvacrol feed supplementation on lipid oxidation in broiler meat. *Poultry Science*. 2010. **89**: 366-370.
- Ma D., Shan A. & Li Q. Effect of traditional Chinese medical herbs on growth and immunization of chickens. *Acta Zoonutrimenta Sinica* 2004. **16**: 36-49.
- Ma Y.L., Guo T., Xu Z.R., You P. & Ma J.F. Effect of *Lactobacillus* isolates on the adhesion of pathogens to chicken intestinal mucus in vitro. *Letters in Applied Microbiology*. 2006. **42**: 369-374.
- Mahmood S., Mushtaq-Ul-Hassan M., Alam M. & Ahmad F. Comparative efficacy of *Nigella sativa* and *Allium sativum* as growth promoters in broilers. *International Journal of Agriculture and Biology*. 2009. **11**: 775-778.
- Malayoglu H.B., Baysal S., Misirlioglu Z., Polat M., Yilmaz H. & Turan N. Effects of oregano essential oil with or without feed enzymes on growth performance, digestive enzyme, nutrient digestibility, lipid metabolism and immune response of broilers fed on wheat-soybean meal diets. *British Poultry Science*. 2010. **51**: 67-80.
- Malone G.W., Chaloupka G.W. & Saylor W.W. Influence of litter type and size on broiler performance .1. factors affecting litter consumption. *Poultry Science*. 1983. **62**: 1741-1746.
- Manzanilla E.G., Perez J.F., Martin M., Kamel C., Baucells F. & Gasa J. Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*. 2004. **82**: 3210-3218.
- Marieb E.N. *Anatomie et physiologie humaine*. 1999. 1194.
- Marteyn B., West N.P., Browning D.F., Cole J.A., Shaw J.G., Palm F., Mounier J., Prevost M.C., Sansonetti P. & Tang C.M. Modulation of *Shigella* virulence in response to available oxygen in vivo. *Nature*. 2010. **465**: 355-U113.
- Massias B., Arturo-Schaan M., Elie A.M., Bebin K., Hocde V., Denayrolles M. & Urdaci M.C. Effects of non-antibiotic additives on the microbial equilibrium of broiler chicken intestine. *Reproduction, Nutrition, Development*. 2006. **46**: s105.
- Mathlouthi, N., T. Bouzaïenne, Oueslati, I., Recoquillay, F., Hamdi, M., Bergaoui, R. (2009). Effet de deux préparations d'huiles essentielles sur la croissance des bactéries in vitro et les performances du poulet de chair. 8ème journée de la recherche avicole, St Malo.
- Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J., Miyamoto Y., Takada T., Matsumoto K., Oyaizu H. & Tanaka R. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the

- detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002. **68**: 5445-5451.
- Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J., Takada T. & Tanaka R. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004. **70**: 7220-7228.
- McLean J.A., Savory C.J. & Sparks N.H.C. Welfare of male and female broiler chickens in relation to stocking density, as indicated by performance, health and behaviour. *Animal Welfare*. 2002. **11**: 55-73.
- McWhorter T.J., Caviedes-Vidal E. & Karasov W.H. The integration of digestion and osmoregulation in the avian gut. *Biological Reviews*. 2009. **84**: 533-565.
- Mead G.C. Microbes of the avian cecum: types present and substrates utilized. *Journal of Experimental Zoology. Supplement*. 1989. **3**: 48-54.
- Michelland R.J. *Caractérisation moléculaire des procaryotes et facteurs de variation des écosystèmes digestifs chez deux mammifères herbivores : approche comparée vache/lapin*. Sciences Ecologiques, Vétérinaires Agronomiques et Bioingénieries. Université de Toulouse. 2009.
- Michelland R.J., Combes S. & Cauquil L. (2010) OligoSpecificitySystem. (ed. by package R).
- Michelland R.J., Dejean S., Combes S., Fortun-Lamothe L. & Cauquil L. StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Molecular Ecology Resources*. 2009. **9**: 1359-1363.
- Michelland R.J., Monteils V., Zened A., Combes S., Cauquil L., Gidenne T., Hamelin J. & Fortun-Lamothe L. Spatial and temporal variation of the bacterial community in the bovine digestive tract. *Journal of Applied Microbiology*. 2009. **107**: 1364-5072.
- Michiels J., Missotten J., Dierick N., Fremaut D., Maene P. & De Smet S. In vitro degradation and in vivo passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2008. **88**: 2371-2381.
- Michiels J., Missotten J., Fremaut D., De Smet S. & Dierick N. In vitro characterisation of the antimicrobial activity of selected essential oil components and binary combinations against the pig gut flora. *Animal Feed Science and Technology*. 2009. **151**: 111-127.
- Mikulski D., Zdunczyk Z., Jankowski J. & Juskiewicz J. Effects of organic acids or natural plant extracts added to diets for turkeys on growth performance, gastrointestinal tract

- metabolism and carcass characteristics. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 2008. **17**: 233-246.
- Minekus M., Smeets-Peeters M., Bernalier A., Marol-Bonnin S., Havenaar R., Marteau P., Alric M., Fonty G. & Veld J. A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999. **53**: 108-114.
- Mitchell M.A. & Moreto M. Absorptive function of the small intestine: adaptations meeting demand. In: *Avian gut function in health and disease* (ed. by Perry GC), 2006. pp. 46-65.
- Molenaar R., Reijrink I.A.M., Meijerhof R. & Van Den Brand H. Relationship between hatchling length and weight on later productive performance in broilers. *World's Poultry Science Journal*. 2008. **64**: 599-603.
- Molly K., Woestyne M.V. & Verstraete W. Development of a 5-step multichamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1993. **39**: 254-258.
- Monteiro L., Gras N., Vidal R., Cabrita J. & Megraud F. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human feces by PCR: DNA stability and removal of inhibitors. *Journal of Microbiological Methods*. 2001. **45**: 89-94.
- Morales S.E. & W.E. H. Empirical testing of 16S rRNA gene PCR primer pairs reveals variance in target specificity and efficacy not suggested by in silico analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009. **75**: 2677-2683.
- Moran Jr. E.T. Anatomy, microbes, and fiber: small versus large intestine. *Journal of Applied Poultry Research*. 2006. **15**: 154-160.
- Moreira J., Mendes A.A., Roca R.O., Garcia E.A., Naas I.A., Garcia R.G. & Paz I.C.L.A. Effect of stocking density on the performance, carcass yield and meat quality of broilers of different commercial strains. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2004. **33**: 1506-1519.
- Morita H., Kuwahara T., Ohshima K., Sasamoto H., Itoh K., Hattori M., Hayashi T. & Takami H. An improved DNA isolation method for metagenomic analysis of the microbial flora of the human intestine. *Microbes and Environments*. 2007. **22**: 214-222.
- Mulder I.E., Schmidt B., Stokes C.R., Lewis M., Bailey M., Aminov R.I., Prosser J.I., Gill B.P., Pluske J.R., Mayer C.D., Musk C.C. & Kelly D. Environmentally-acquired

- bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. *BMC Biology*. 2009. **7**: 79.
- Muyzer G. & Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*. 1998. **73**: 127-141.
- Naganawa R., Iwata N., Ishikawa K., Fukuda H., Fujino T. & Suzuki A. Inhibition of microbial growth by ajoene, a sulfur-containing compound derived from garlic. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996. **62**: 4238-4242.
- Naidoo V., McGaw L.J., Bisschop S.P.R., Duncan N. & Eloff J.N. The value of plant extracts with antioxidant activity in attenuating coccidiosis in broiler chickens. *Veterinary Parasitology*. 2008. **153**: 214-219.
- Nain S., Ling B., Bandy B., Alcorn J., Wojnarowicz C., Laarveld B. & Olkowski A.A. The role of oxidative stress in the development of congestive heart failure in a chicken genotype selected for rapid growth. *Avian Pathology*. 2008. **37**: 367-373.
- Najafi P. & Torki M. Performance, blood metabolites and immunocompetence of broiler chicks fed diets included essential oils of medicinal herbs. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2010. **9**: 1164-1168.
- Nassiri-Asl M. & Hosseinzadeh H. Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (Grape) and its bioactive compounds. *Phytotherapy Research*. 2009. **23**: 1197-1204.
- Neish A.S. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*. 2009. **136**: 65-80.
- Niewold T.A. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. *Poultry Science*. 2007. **86**: 605-609.
- Nitsan Z., Dunnington E.A. & Siegel P.B. Organ growth and digestive enzyme levels to fifteen days of age in lines of chickens differing in body weight. *Poultry Science*. 1991. **70**: 2040-2048.
- Nordgard L., Traavik T. & Nielsen K.M. Nucleic acid isolation from ecological samples - Vertebrate gut flora. In: *Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data, Part B* (2005). pp. 38-48.
- Nordskog A.W. & Johnson E.L. Breed differences in response to feeding antibiotic. *Poultry Science*. 1953. **32**: 1046-1051.

- Noy Y., Geyra A. & Sklan D. The effect of early feeding on growth and small intestinal development in the posthatch poult. *Poultry Science*. 2001. **80**: 912-919.
- Noy Y. & Sklan D. Different types of early feeding and performance in chicks and poults. *Journal of Applied Poultry Research*. 1999. **8**: 16-24.
- Noy Y., Uni Z. & Sklan D. Routes of yolk utilisation in the newly-hatched chick. *British Poultry Science*. 1996. **37**: 987-995.
- Nübel U., Engelen B., Felske A., Snaidr J., Wieshuber A., Amann R.I., Ludwig W. & Backhaus H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*. 1996. **178**: 5636-5643.
- Ohene-Adjei S., Chaves A.V., McAllister T.A., Benchaar C., Teather R.M. & Forster R.J. Evidence of increased diversity of methanogenic archaea with plant extract supplementation. *Microbial Ecology*. 2007. **56**: 234-242.
- Olsen K.N., Henriksen M., Bisgaard M., Nielsen O.L. & Christensen H. Investigation of chicken intestinal bacterial communities by 16S rRNA targeted fluorescence in situ hybridization. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*. 2008. **94**: 423-437.
- Onbasilar E.E., Poyraz O., Erdem E. & Ozturk H. Influence of lighting periods and stocking densities on performance, carcass characteristics and some stress parameters in broilers. *Archiv fur Geflugelkunde*. 2008. **72**: 193-201.
- Orban J.I., Patterson J.A., Sutton A.L. & Richards G.N. Effect of sucrose thermal oligosaccharide caramel, dietary vitamin-mineral level, and brooding temperature on growth and intestinal bacterial populations of broiler chickens. *Poultry Science*. 1997. **76**: 482-490.
- Osman M., Yakout H.M., Motawe H.F. & El-Arab W.F.E. Productive, physiological, immunological and economical effects of supplementing natural feed additives to broiler diets. *Egyptian Poultry Science Journal*. 2010. **30**: 25-53.
- Ouhida I., Pérez J.F., Piedrafita J. & Gasa J. The effects of sepiolite in broiler chicken diets of high, medium and low viscosity. Productive performance and nutritive value. *Animal Feed Science and Technology*. 2000. **85**: 183-194.
- Palander S., Nasi M. & Palander P. Digestibility and energy value of cereal-based diets in relation to digesta viscosity and retention time in turkeys and chickens at different

- ages estimated with different markers. *Archives of Animal Nutrition*. 2010. **64**: 238-253.
- Pandit V.A. & Shelef L.A. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L). . *Food Microbiology*. 1994. **11**: 57-63.
- Pang Y. & Applegate T.J. Effects of dietary copper supplementation and copper source on digesta pH, calcium, inc, and copper complex size in the gastrointestinal tract of the broiler chicken. *Poultry Science*. 2007. **86**: 531-537.
- Patterson J.A. & Burkholder K.M. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science*. 2003. **82**: 627-631.
- Pedroso A.A., Maurer J.J., Dlugolenski D. & Lee M.D. Embryonic chicks may possess an intestinal bacterial community within the egg. *Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology*. 2008. **108**: 409.
- Pedroso A.A., Menten J.F.M. & Lambais M.R. The structure of bacterial community in the intestines of newly hatched chicks. *Journal of Applied Poultry Research* 2005. **14**: 232-237.
- Pesti G.M. & Howarth B. Effects of population density on the growth, organ weights, and plasma corticosterone of young broiler chicks. *Poultry Science*. 1983. **62**: 1080-1083.
- Pietrzak D., Mroczek J., Lesnik E. & Swierczewska E. Quality of meat and fat from three breeding lines of chickens served feed with or without antibiotic growth stimulator. *Medycyna Weterynaryjna*. 2006. **62**: 917-921.
- Pissavin C., Gabriel I., Burel C., Mallet S., Maurice R., Lessire M. & Fravalo P. Development of a molecular technique to study the equilibrium of poultry gut microbiota. *Reproduction Nutrition Development*. 2006. **46**: S26.
- Platel K. & Srinivasan K. Influence of dietary spices and their active principles on pancreatic digestive enzymes in albino rats. *Nahrung*. 2000. **44**: S42-S46.
- Platel K. & Srinivasan K. A study of the digestive stimulant action of select spices in experimental rats. *Journal of Food Science and Technology*. 2001. **38**: 358-361.
- Platel K. & Srinivasan K. Digestive stimulant action of spices : A myth or reality? *Indian Journal of Medical Research*. 2004. **119**: 167-179.
- Podolsky D.K. Oligosaccharide structures of human colonic mucin. *Journal of Biological Chemistry*. 1985. **260**: 8262-8271.
- Podolsky D.K. Oligosaccharides structures of isolated human colonic mucin species. *Journal of Biological Chemistry*. 1985. **260**: 5510-5515.

- Poitras E. & Houde A. PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*. 2002. **2**: 2-11.
- Postollec G., Maurice R., Huonnic D., Boilletot E., Michel V. & Burel C. Effet des conditions d'ambiance et de l'apport d'additifs de type prébiotiques sur les performances de croissance et l'état sanitaire de dindons mâles. *Septièmes Journées de la Recherche Avicole*. 2007: 197-201. TOURS, France.
- Potterat O. Antioxidants and free radical scavengers of natural origin. *Current Organic Chemistry*. 1997. **1**: 415-440.
- Proietti P.C., Bosco A.d., Hilbert F., Franciosini M.P. & Castellini C. Evaluation of intestinal bacterial flora of conventional and organic broilers using culture-based methods. *Italian Journal of Animal Science*. 2009. **8**: 51-63.
- Pruesse E., Quast C., Knittel K., Fuchs B.M., Ludwig W.G., Peplies J. & Glockner F.O. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*. 2007. **35**: 7188-7196.
- Pubols M.H. Ratio of digestive enzymes in the chick pancreas. *Poultry Science*. 1991. **70**: 337-342.
- Putskam M., Vizzier-Thaxton Y., Dozier W., Thaxton J., Roush W., Branton S., Morgan G., Miles D. & Lott B. Evaluation of stocking density on intestinal microflora of broilers. *Poultry Science*. 2005. **84**: 108-108.
- Qu A., Brulc J.M., K. Wilson M.K., Law B.F., Theoret J.R., Joens L.A., Konkel M.E., Angly F., Dinsdale E.A., Edwards R.A., Nelson K.E. & White B.A. Comparative metagenomics reveals host specific metavirulomes and horizontal gene transfer elements in the chicken cecum microbiome. *PLoS One*. 2008. **3**: 1-19.
- Radstrom P., Knutsson R., Wolffs P., Lovenklev M. & Lofstrom C. Pre-PCR processing - Strategies to generate PCR-compatible samples. *Molecular Biotechnology*. 2004. **26**: 133-146.
- Radwan N.L., Hassan R.A., Qota E.M. & Fayek H.M. Effect of natural antioxidant on oxidative stability of eggs and productive and reproductive performance of laying hens. *International Journal of Poultry science*. 2008. **7**: 134-150.
- Raper G. Increased interest for plant extracts. *Feed Mix*. 2008. **15**.
- Rastogi R., Wu M., DasGupta I. & Fox G.E. Visualization of ribosomal RNA operon copy number distribution. *BMC Microbiology*. 2009. **9**: 208.

- Ravindran V., Thomas D.V. & Morel P.C.H. Performance and welfare of broilers as affected by stocking density and zinc bacitracin supplementation. *Animal Science Journal*. 2006. **77**: 110-116.
- Rechner A.R., Smith M.A., Kuhnle G., Gibson G.R., Debnam E.S., Srai S.K.S., Moore K.P. & Rice-Evans C.A. Colonic metabolism of dietary polyphenols: Influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004. **36**: 212-225.
- Ricard F.H. Influence de la densité d'élevage sur la croissance et les caractéristiques de carcasse de poulets élevés au sol. *Annales de Zootechnie*. 1988. **37**: 87-98.
- Ridlon J.M., Kang D.J. & Hylemon P.B. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of Lipid Research*. 2006. **47**: 241-259.
- Rinttila T., Kassinen A., Malinen E., Krogus L. & Palva A. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*. 2004. **97**: 1166-1177.
- Robinson P.H., Wiseman J., Udèn P. & Mateos G. Some experimental design and statistical criteria for analysis of studies in manuscripts for analysis of studies in manuscripts submitted for consideration for publication. *Animal Feed Science and Technology*. 2006. **129**: 1-11 (editorial).
- Roh C., Villatte F., Kim B.G. & Schmid R.D. Comparative study of methods for extraction and purification of environmental DNA from soil and sludge samples. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2006. **134**: 97-112.
- Romier B., Schneider Y.J., Larondelle Y. & During A. Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. *Nutrition Reviews*. 2009. **67**: 363-378.
- Rosario C.C., Tellez G.I., Lopez C.C., Mateo J.V.F., Anderson R.C. & Eslava C.C. Bacterial isolation rate from fertile eggs, and neonatal broilers with yolk sac infection. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*. 2004. **46**: 12-16.
- Ross Z.M., O'Gara E.A., Hill D.J., Sleightholme H.V. & Malsin D.J. Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001. **67**: 475-480.
- Rothenbuhler E. & Kinsella J.E. The Ph-Stat method for assessing protein digestibility - an evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1985. **33**: 433-438.

- Rougière N. *Etude compare des paramètres digestifs des poulets issus des lignées génétiques D+ et D- sélectionnées pour une efficacité digestive divergente*. Université François Rabelais. 2010.
- Rudi K. & Jakobsen K.S. Overview of DNA purification for nucleic acid-based diagnostics from environmental and clinical samples. *Methods in Molecular Biology*. 2006. **345**: 23-35.
- Rutledge R.G. & Côté C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Research*. 2003. **31**: e93.
- Sacranie A., Iji P.A., Mikkelsen L.L. & Choct M. Occurrence of reverse peristalsis in broiler chickens. *19th Australian Poultry Science Symposium*,. 2007: 161-164. Sydney, New South Wales, Australia.
- Saengkerdsub S., Anderson R.C., Wilkinson H.H., Kim W.K., Nisbet D.J. & Ricke S.C. Identification and quantification of methanogenic Archaea in adult chicken caeca. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007. **73**: 353-356.
- Sandoval M., Okuhama N.N., Zhang X.J., Condezo L.A., Lao J., Angeles F.M., Musah R.A., Bobrowski P. & Miller M.J.S. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. *Phytomedicine*. 2002. **9**: 325-337.
- Santini M.P., Renz D. & W. D. A comparison of methods to extract pure DNA from mammalian intestinal contents and from feces. *Gene Function and Disease*. 2001. **1**: 51-57.
- Sarica S., Ciftci A., Demir E., Kilinc K. & Yildirim Y. Use of an antibiotic growth promoter and two herbal natural feed additives with and without exogenous enzymes in wheat based broiler diets. *South African Journal of Animal Science*. 2005. **35**: 61-72.
- Sauter E.A., Petersen C.F., Steele E.E., Parkinson J.F., Dixon J.E. & Stroh R.C. The airborne microflora of poultry houses. *Poultry Science*. 1981. **60**: 569-574.
- Savory C.J. & Knox A.I. Chemical composition of caecal contents in the fowl in relation to dietary fiber level and time of day. *Comparative biochemistry and Physiology –A Physiology*. 1991. **100**: 739-743.
- Sayago-Ayerdi S.G., Brenes A., Viveros A. & Goni I. Antioxidative effect of dietary grape pomace concentrate on lipid oxidation of chilled and long-term frozen stored chicken patties. *Meat Science*. 2009. **83**: 528-533.

- Schober E. & Kurmayer R. Evaluation of different DNA sampling techniques for the application of the real-time PCR method for the quantification of cyanobacteria in water. *Letters in Applied Microbiology*. 2006. **42**: 412-417.
- Schroeter J. & Klaenhammer T. Genomics of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 2009. **292**: 1-6.
- Schwab W., Davidovich-Rikanati R. & Lewinsohn E. Biosynthesis of plant-derived flavour compounds. *The Plant Journal*. 2008. **54**: 712-732.
- Scupham A.J. Succession in the intestinal microbiota of preadolescent turkeys. *FEMS Microbiology Ecology*. 2007. **60**: 136-147.
- Scupham A.J., Jones J.A. & Wesley I.V. Comparison of DNA extraction methods for analysis of turkey cecal microbiota. *Journal of Applied Microbiology*. 2007. **102**: 401-409.
- Seksik P., Rigottier-Gois L., Gramet G., Sutren M., Pochart P., Marteau P., Jian R. & Doré J. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*. 2003. **52**: 237-242.
- Selma M.V., Espin J.C. & Tomas-Barberan F.A. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009. **57**: 6485-6501.
- Serrano J., Puupponen-Pimia R., Dauer A., Aura A.M. & Saura-Calixto F. Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2009. **53**: S310-S329.
- Shakouri M.D., Iji P.A., Mikkelsen L.L. & Cowieson A.J. Intestinal function and gut microflora of broiler chickens as influenced by cereal grains and microbial enzyme supplementation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2009. **93**: 647-658.
- Shane S.M. Campylobacter infection of commercial poultry. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*. 2000. **19**: 376-395.
- Sharma R., Fernandez F., Hinton M. & Schumacher U. The influence of diet on the mucin carbohydrates in the chick intestinal tract. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1997. **53**: 935-942.
- Sharma R.A., Steward W.P. & Gescher A.J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin. *Advances in experimental Medicine and Biology*. 2007. **595**: 453-470.

- Shires A., Thompson J.R., Turner B.V., Kennedy P.M. & Goh Y.K. Rate of passage of corn-canola meal and corn-soyabean meal diets through the gastrointestinal tract of broiler and white legorn chickens. *Poultry Science*. 1987. **66**: 289-298.
- Si W., Gong J., Tsao R., Zhou T., Yu H., Poppe C., Johnson R. & Du Z. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 2006. **100**: 296-305.
- Siegel H.S. Stress, strains and resistance. *British Poultry Science*. 1995. **36**: 3-22.
- Silvestre A.J.D., Cavaliero J.A.S., B. D., Filliatre C. & Bourgeois G. Analysis of the variation of oil composition of *Eucalyptus globulus* Labill. from Portugal using multivariate statistical analysis. *Industrial Crops and Products*. 1997. **6**: 27-33.
- Simon O., Jadamus A. & Vahjen W. Probiotic feed additives - effectiveness and expected modes of action. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 2001. **10**: 51-67.
- Simsek U.G., Dalkilic B., Ciftci M. & Yuce A. The influences of different stocking densities on some welfare indicators, lipid peroxidation (MDA) and antioxidant enzyme activities (GSH, GSH-Px, CAT) in broiler chickens. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2009. **8**: 1568-1572.
- Sklan D., Dubrov D., Eisner U. & Hurwitz S. ⁵¹Cr-EDTA, ⁹¹Y and ¹⁴¹Ce as nonabsorbed reference substances in the gastrointestinal tract of the chicken. *The Journal of Nutrition*. 1975. **105**: 1549-1552.
- Sklan D., Meir D. & Noy Y. Chick small intestine brush border contains lipase and phospholipase activity. *British Poultry Science*. 1999. **40**: 392-396.
- Skomorucha I., Muchacka R., Sosnowka-Czajka E. & Herbut E. Response of broiler chickens from three genetic groups to different stocking densities. *Annals of Animal Science*. 2009. **9**: 175-184.
- Smet K., Raes K., Huyghebaert G., Haak L., Arnouts S. & De Smet S. Lipid and protein oxidation of broiler meat as influenced by dietary natural antioxidant supplementation. *Poultry Science*. 2008. **87**: 1682-1688.
- Smirnov A., Perez R., Amit-Romach E., Sklan D. & Uni Z. Mucin dynamics and microbial populations in chicken small intestine are changed by dietary probiotic and antibiotic growth promoter supplementation. *The Journal of Nutrition*. 2005. **135**: 187-192.
- Smith C.J. & Osborn A.M. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*. 2009. **67**: 6-20.

- Smith H.W. The development of the flora of the alimentary tract in young animals. *Journal of Pathology and Bacteriology*. 1965. **90**: 495-513.
- Smith H.W. Observation of the flora of the alimentary tract of animals and factors affecting its composition. *Journal of Pathology and Bacteriology*. 1965. **89**: 95-122.
- Smith M.W., Mitchell M.A. & Peacock M.A. Effects of genetic selection on growth rate and intestinal structure in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology A Comparative Physiology*. 1990. **97A**: 57-63.
- Smith-Palmer A., Stewart J. & Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*. 1998. **26**: 118-122.
- Smsek U.G., Cftc M., Dalklc B., Guler T. & Ertas O.N. The effects of dietary antibiotic and anise oil supplementation on body weight, carcass characteristics and organoleptic analysis of meat in broilers. *Revue De Medecine Veterinaire*. 2007. **158**: 514-518.
- Spelman K., Burns J.J., Nichols D., Winters N., Ottersberg S. & Tenborg M. Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators. *Alternative Medicine Review*. 2006. **11**: 128-150.
- Stewart J.A., Chadwick V.S. & Murray A. Investigations into the influence of host genetics on the predominant eubacteria in the faecal microflora of children. *Journal of Medical Microbiology*. 2005. **54**: 1239-1242.
- Suau A., Bonnet R., Sutren M., Godon J.J., Gibson G.R., Collins M.D. & Doré J. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999. **65**: 4799-4807.
- Suzuki M.T., Taylor L.T. & DeLong E.F. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assay. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000. **66**: 4605-4614.
- Suzuki T., Noguchi J., Kitamura M. & Fujisaki H. Effects of a newly developed early post-hatch feed for poultry hatchlings on the performance of poultry. *Journal of Poultry Science*. 2008. **45**: 39-45.
- Svihus B. (2010) The effect of feeding pattern and diet composition on efficacy of exogenous enzymes. In: *XIIIth European Poultry Conference*, p. 232. Worlds Poultry Science Journal, Tours, France.

- Szylit O., Champ M., Aitabdelkader N. & Raibaud P. Role of 5 Lactobacillus strains on carbohydrate degradation in monoxenic chickens. *Reproduction Nutrition Development*. 1980. **20**: 1701-1706.
- Takada M., Agata I., Sakamoto M., Yagi N. & Hayashi N. On the metabolic detoxication of thymol in rabbit and man. *The Journal of toxicological sciences*. 1979. **4**: 341-350.
- Tannock G.W., Dashkevich M.P. & Feighner S.D. Lactobacilli and bile salt hydrolase in the murine intestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989. **55**: 1848-1851.
- Tarrago J. & Puchal F. Effect of strain, sex and stocking rate on the performance and carcass yield of caged broilers. *British Poultry Science*. 1977. **18**: 95-99.
- Tassou C.C., Drosinos E.H. & Nychas G.J.E. Effect of essential oil from mint (*Menta piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 degrees and 10 degrees. *Journal of Applied Bacteriology*. 1995. **7**: 593-600.
- Teff K. Nutritional implications of the cephalic-phase reflexes: endocrine responses. *Appetite*. 2000. **34**: 206-213.
- Thieme R. & Ladbrook S. Can the sensory quality of chicken meat be improved? *International Poultry Production*. 2010. **18**: 21.
- Thomke S. & Elwinger K. Growth promotants in feeding pigs and poultry. I. Growth and feed efficiency responses to antibiotic growth promotants. *Annales de Zootechnie*. 1998. **47**: 85-97.
- Thomke S. & Elwinger K. Growth promotants in feeding pigs and poultry. II. Mode of action of antibiotic growth promotants. *Annales de Zootechnie*. 1998. **47**: 153-167.
- Thompson K., Burkholder K., Patterson J. & Applegate T.J. Microbial ecology shifts in the ileum of broilers during feed withdrawal and dietary manipulations. *Poultry Science*. 2008. **87**: 1624-1632.
- Tichopad A., Dilger M., Schwarz G. & Pfaffl M.W. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Research*. 2003. **31**: e122.
- Toghyani M., Toghyani M., Gheisari A., Ghalamkari G. & Eghbalsaied S. Evaluation of cinnamon and garlic as antibiotic growth promoter substitutions on performance, immune responses, serum biochemical and haematological parameters in broiler chicks. *Journal of Livestock Science*. 2011. **138**: 167-173.
- Toivanen P., Vaahtovuori J. & Eerola E. Influence of Major Histocompatibility Complex on bacterial composition of fecal flora *Infection and Immunity*. 2001. **69**: 2372-2377.

- Torok V.A., Hughes R.J., Ophel-Keller K., Ali M. & MacAlpine R. Influence of different litter materials on cecal microbiota colonization in broiler chickens. *Poultry Science*. 2009. **88**: 2474-2481.
- Torok V.A., Ophel-Keller K. & Hughes R.J. Relationship between gut microbial species and energy metabolism in broiler chickens. *Zootechnica International*. 2009. **5**: 30-33.
- Torok V.A., Ophel-Keller K., Hughes R.J., Forder R., Ali M. & Macalpine R. Environment and age: impact on poultry gut microflora. *Proceedings of the 19th Australian Poultry Science Symposium, Sydney, New South Wales, Australia, 12-14 February 2007*. 2007: 149-152.
- Toutain P.L., Ferran A. & Bousquet-Melou A. Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2010. **199**: 19-48.
- Uni Z., Platin R. & Sklan D. Cell proliferation in chicken intestinal epithelium occurs both in the crypts and along the villus. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*. 1998. **168**: 241-247.
- Vahjen W., Glaser K., Schafer K. & Simon O. Influence of xylanase-supplemented feed on the development of selected bacterial groups in the intestinal tract of broiler chicks. *Journal of Agricultural Science*. 1998. **130**: 489-500.
- Valerio Jr L.G. & Gonzales G.F. Toxicological aspects of the south american herbs cat's claw (*Uncaria tomentosa*) and Maca (*Lepidium meyenii*). *Toxicological Reviews*. 2005. **24**: 11-35.
- Van der Kils J.D., Verstegen M.W.A. & De Wit W. Absorption of minerals and retention time of dry matter in the gastrointestinal tract of broilers. *Poultry Science*. 1990. **69**: 2185-2194.
- van der Wielen P.W.J.J., Keuzenkamp D.A., Lipman L.J.A., van Knapen F. & Biesterveld S. Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth. *Microbial Ecology*. 2002. **44**: 286-293.
- Vélez M.P., De Keersmaecker S.C.J. & Vanderleyden J. Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiology Letters*. 2007. **276**: 140-148.
- Velisek J., Kubec R. & Davidek J. Chemical composition and classification of culinary and pharmaceutical garlic-based products. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*. 1997. **204**: 161-164.
- Vidotto M.C., Navarro H.R. & Gaziri L.C.J. Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*. 1997. **59**: 79-87.

- von Persson S. & Svensson S.A. Die durchgangszeit des futters durch den verdauungstraktus von kuken. *Archiv fuer Gefluegelkunde*. 1960. **24**: 407-416.
- Walle T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical biology and Medecine*. 2004. **36**: 829-837.
- Walter J., Hertel C., Tannock G.W., Lis C.M., Munro K. & Hammes W.P. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis *Applied and Environmental Microbiology*. 2001. **67**: 2578-2585.
- Wanapat M., Khejornsart P., Pakdee P. & Wanapat S. Effect of supplementation of garlic powder on rumen ecology and digestibility of nutrients in ruminants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2008. **88**: 2231-2237.
- Wang L., Piao X.L., Kim S.W., Piao X.S., Shen Y.B. & Lee H.S. Effects of Forsythia suspensa extract on growth performance, nutrient digestibility, and antioxidant activities in broiler chickens under high ambient temperature. *Poultry Science*. 2008. **87**: 1287-1294.
- Wang L.J. & Weller C.L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*. 2006. **17**: 300-312.
- Wang M.L., Suo X., Gu J.H., Zhang W.W., Fang Q. & Wang X. Influence of grape seed proanthocyanidin extract in broiler chickens: effect on chicken coccidiosis and antioxidant status. *Poultry Science*. 2008. **87**: 2273-2280.
- Wathes C.M. Aerial emissions from poultry production. *World's Poultry Science Journal*. 1998. **54**: 241-251.
- Wei A. & Shibamoto T. Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007. **55**: 1737-1742.
- Wei S., Cressman M., Lilburn M., Morrison M. & Yu Z. Towards a Complete View of the Bacterial Diversity in Poultry Intestinal Microbiota. *Microbial Ecology*. 2009. **57**: 583-583.
- Weiss C., Conte A., Milandrib C., Scortichini G., Semprini P., Usberti R. & Migliorati G. Veterinary drugs residue monitoring in Italian poultry: Current strategies and possible developments. *Food Control*. 2007. **18**: 1068-1076.
- Westendarp H. Saponins in nutrition of swine, poultry and ruminants. *Deutsche Tierarztliche Wochenschrift*. 2005. **112**: 65-70.

- Westendarp H. Einsatz und Wirkung phytogener Futterzusatzstoffe beim Geflügel. *Übersichten zur Tierernährung*. 2006. **34**: 1-26.
- Weurding R.E., Veldman A., Veen W.A.G., van der Aar P.J. & Verstegen M.W.A. Starch digestion rate in the small intestine of broiler chickens differs among feedstuffs. *The Journal of Nutrition*. 2001. **131**: 2329-2335.
- Wilson I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997. **63**: 3741-3751.
- Windisch W.M., Schedle K., Plitzner C. & Kroismayr A. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *Journal of Animal Science*. 2008. **86**: E140-148.
- Wink M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry (Elsevier)*. 2003. **64**: 3-19.
- Wink M. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multi-component mixtures in phytotherapy. *Current Drug Metabolism*. 2008. **9**: 996-1009.
- Wintzingerode F.V., Göbel U.B. & Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*. 1997. **21**.
- Wise M.G. & Siragusa G.R. Quantitative analysis of the intestinal bacterial community in one- to three-week-old commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic-free vegetable-based diets. *Journal of Applied Microbiology*. 2007. **102**: 1138-1149.
- Wolanski N.J., Renema R.A., Robinson F.E., Carney V.L. & Fancher B.I. Relationships among egg characteristics, chick measurements, and early growth traits in ten broiler breeder strains. *Poultry Science*. 2007. **86**: 1784-1792.
- Wood J.D. Neuropathophysiology of functional gastrointestinal disorders. *World Journal of Gastroenterology*. 2007. **13**: 1313-1332.
- Wu L., Wang X., Xu W., Farzaneh F. & Xu R. The structure and pharmacological functions of coumarins and their derivatives. *Current Medicinal Chemistry*. 2009. **16**: 4236-4260.
- Xia E.Q., Deng G.F., Guo Y.J. & Li H.B. Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010. **11**: 622-646.
- Yalcin S., Onbasilar I., Sehu A. & Yalcin S. The effects of dietary garlic powder on the performance, egg traits and blood serum cholesterol of laying quails. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2007. **20**: 944-947.

- Yamauchi K.E. Review on chicken intestinal villus histological alterations related with intestinal function. *Journal of Poultry Science*. 2002. **39**: 229-242.
- Yang Y., Iji P.A. & Choct M. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. *World's Poultry Science Journal*. 2009. **65**: 97-114.
- Yarru L.P., Settivari R.S., Gowda N.K.S., Antoniou E., Ledoux D.R. & Rottinghaus G.E. Effects of turmeric (*Curcuma longa*) on the expression of hepatic genes associated with biotransformation, antioxidant, and immune systems in broiler chicks fed aflatoxin. *Poultry Science*. 2009. **88**: 2620-2627.
- Yilmaz-Dikmen B. & Sahan U. The relationship among age, yolk fatty acids content, and incubation results of broiler breeders. *Poultry Science*. 2009. **88**: 185-190.
- Yin Y.S., Lei F., Zhu L.Y., Li S.J., Wu Z.W., Zhang R.F., Gao G.F., Zhu B.L. & Wang X. Exposure of different bacterial inocula to newborn chicken affects gut microbiota development and ileum gene expression. *ISME Journal*. 2010. **4**: 367-376.
- Yu Z. & Morrison M. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004. **70**: 4800-4806.
- Zhang W. & Aggrey S.E. Genetic variation in feed utilization efficiency of meat-type chickens. *World's Poultry Science Journal*. 2003. **59**: 328-339.
- Zhou H., Gong J., Brisbin J.T., Yu H., Sanei B., Sabour P. & Sharif S. Appropriate chicken sample size for identifying the composition of broiler intestinal microbiota affected by dietary antibiotics, using the Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis technique. *Poultry Science*. 2007. **86**: 2541-2549.
- Zhu X.Y. & Joerger R.D. Composition of microbiota in content and mucus from caeca of broiler chickens as measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific, 16S rRNA-targeted oligonucleotides probes. *Poultry Science*. 2003. **82**: 1242-1249.
- Zhu X.Y., Zhong T.Y., Pandya Y. & Joerger R.D. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002. **68**: 124-137.
- Zoetendal E.G., Akkermans A.D.L., Akkermans-van vliet W.M., de Visser J.A.G.M. & de Vos W.M. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2001. **13**: 129-134.

Zoetendal E.G., Akkermans A.D.L. & De Vos W.M. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S RNA from human faecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998. **64**: 3854-3859.

Zoetendal E.G., Ben-Amor K., Akkermans A.D.L., Abee T. & de Vos W.M. DNA isolation Protocols affect the detection limit of PCR approaches of bacteria in samples from the human gastrointestinal tract. *Systematic and Applied Microbiology*. 2001.**24**: 405-410.

Annexes

Annexe 1 : Effet du traitement Exp1 sur l'abondance des bactéries dans les contenus digestifs du jabot à 6 semaines

		All bacteria		<i>Lactobacillus</i> group		Enterobacteriaceae family		<i>Bacteroides</i> group		<i>C.leptum</i> group		<i>C.coccoides</i> group	
		Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence
P value	Diet (D)	0.64		0.74		0.26		0.96		0.45		0.32	
	Sd	0.66		0.73		0.63		0.36		0.36		0.28	
	D x Sd	0.69		0.90		0.04		0.34		0.82		0.77	
Low ² Sd	Control diet	11.94	4	11.43	4	9.06	4	6.08	3	8.17	4	9.41	4
	Exp ⁴ diet	11.85	4	11.38	4	8.36	4	6.58	4	7.92	4	9.11	4
High ³ Sd	Control diet	11.85	4	11.37	4	8.70	4	5.98	3	7.88	4	9.09	4
	Exp ⁴ diet	11.84	4	11.35	4	8.92	4	5.42	3(2) ⁵	7.74	4	8.93	4
	SEM	0.100		0.122		0.203		0.655		0.252		0.221	
Diet	Control diet	11.84	8	11.40	8			6.03	6	8.03	8	9.25	8
	Exp ⁴ diet	11.89	8	11.63	8			6.08	7(6) ⁵	7.83	8	9.02	8
	SEM	0.067		0.081				0.453		0.171		0.153	
Stocking density (Sd)	Low Sd ²	11.89	8	11.41	8			6.33	7	8.05	8	9.26	8
	High Sd ³	11.85	8	11.36	8			5.74	6(5) ⁵	7.81	8	9.01	8
	SEM	0.067		0.081				0.438		0.170		0.152	

na: not applicable

nd: not detected

For each dietary treatment and stocking density n=4 pools of 5 birds

¹Expressed as Log10 copies number of 16S rDNA per 1g of fresh digestive content; in the case where incidence was <100%, the mean was calculated considering that the amount of DNA in the undetected samples was at the theoretical detection limit (i.e. 1 gene copy in the PCR reaction)

²Low density: 12 birds /m²

³High density: 17 birds /m²

⁴Exp diet: control diet with the PHY phytobiotic blend (1 kg/t) from d22 to d39

⁵In parenthesis the number of actual samples used for the calculation due to missing data

Annexe 2 : Effet du traitement Exp1 sur l'abondance des bactéries dans les contenus digestifs de l'iléon à 6 semaines

		All bacteria		<i>Lactobacillus</i> group		Enterobacteriaceae family		<i>Bacteroides</i> group		<i>C.leptum</i> group		<i>C.coccoides</i> group	
		Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence
P value	Diet (D)	0.37		0.12		0.35		na		0.58		0.20	4(3) ²
	Sd	0.51		0.83		0.47		na		0.51		0.57	4
	D x Sd	0.60		0.81		0.38		na		0.77		0.44	
Low ² Sd	Control diet	11.24	4	11.15	4	9.34	4	5.18	2	7.03	4	9.09	4(3) ⁵
	Exp ⁴ diet	11.73	4	10.87	4	9.32	4	4.75	2(1) ⁵	6.51	4	8.16	4
High ³ Sd	Control diet	11.29	4	11.24	4	9.82	4	nd	0	6.44	4	8.49	4(3) ⁵
	Exp ⁴ diet	11.16	4	10.87	4	9.28	4	4.15	2(1) ⁵	6.28	4	8.25	4
	SEM	0.347		0.193		0.287		0.705		0.600		0.426	
Diet	Control diet	11.27	8	11.20	8	9.58	8			6.74	8	8.79	8(6) ⁵
	Exp ⁴ diet	10.94	8	10.87	8	9.30	8			6.40	8	8.21	8
	SEM	0.234		0.127		0.198				0.402		0.287	
Stocking density (Sd)	Low Sd ²									6.772			8(7) ⁵
	High Sd ³	10.99	8	11.01	8	9.33	8				8	8.56	
	SEM	11.24	8	11.06	8	9.55	8			6.362	8	8.36	8(7) ⁵
	SEM	0.238		0.141		0.201				0.399		0.307	

na: not applicable

nd: not detected

For each dietary treatment and stocking density n=4 pools of 5 birds

¹Expressed as Log10 copies number of 16S rDNA per 1g of fresh digestive content; in the case where incidence was <100%, the mean was calculated considering that the amount of DNA in the undetected samples was at the theoretical detection limit (i.e. 1 gene copy in the PCR reaction)

²Low density: 12 birds /m²

³High density: 17 birds /m²

⁴Exp diet: control diet with the PHY phytobiotic blend (1 kg/t) from d22 to d39

⁵In parenthesis the number of actual samples used for the calculation due to missing data

Annexe 3 : Effet du traitement Exp1 sur l'abondance des bactéries dans les contenus digestifs des caeca à 6 semaines

		All bacteria		<i>Lactobacillus</i> group		Enterobacteriaceae family		<i>Bacteroides</i> group		<i>C.leptum</i> group		<i>C.coccoides</i> group	
		Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence
P value	Diet (D)	0.40		0.79		0.21		0.34		0.69		0.52	
	Sd	0.50		0.68		0.57		0.59		0.73		0.41	
	D x Sd	0.88		0.64		0.86		0.97		0.50		0.80	
Low ² Sd	Control diet	12.55	4	11.01	4	9.89	4	9.77	4(3) ⁵	10.70	4	11.58	4
	Exp ⁴ diet	12.68	4	11.17	4	10.15	4	9.96	4	10.87	4	11.71	4
High ³ Sd	Control diet	12.65	4	11.21	4	9.82	4	9.88	4	10.86	4	11.74	4
	Exp ⁴ diet	12.75	4	11.16	4	10.02	4	10.05	4	10.82	4	11.79	4
	SEM	0.127		0.213		0.170		0.174		0.155		0.143	
Diet	Control diet	12.60	8	11.11	8	9.86	8	9.83	8(7) ⁵	10.78	8	11.66	8
	Exp ⁴ diet	12.71	8	11.17	8	10.08	8	10.01	8	10.84	8	11.75	8
	SEM	0.085		0.142		0.113		0.115		0.329		0.097	
Stocking density (Sd)	Low Sd ²									10.78			
	High Sd ³	12.61	8	11.10	8	10.02	8	9.88	8(7) ⁵		8	11.63	8
	SEM	12.70	8	11.18	8	9.92	8	9.97	8	10.84	8	11.77	8
	SEM	0.086		0.141		0.119		0.373		0.104		0.095	

na: not applicable

nd: not detected

For each dietary treatment and stocking density n=4 pools of 5 birds

¹Expressed as Log10 copies number of 16S rDNA per 1g of fresh digestive content; in the case where incidence was <100%, the mean was calculated considering that the amount of DNA in the undetected samples was at the theoretical detection limit (i.e. 1 gene copy in the PCR reaction)

²Low density: 12 birds /m²

³High density: 17 birds /m²

⁴Exp diet: control diet with the PHY phytobiotic blend (1 kg/t) from d22 to d39

⁵In parenthesis the number of actual samples used for the calculation due to missing data

Annexe 4 : Effet du traitement Exp1 sur l'abondance des bactéries dans les contenus digestifs du jabot à 3 semaines

		All bacteria		<i>Lactobacillus</i> group		Enterobacteriaceae family		<i>Bacteroides</i> group		<i>C.leptum</i> group		<i>C.coccoides</i> group	
		Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence
P value	Diet (D)	0.21		0.23		0.71		0.78		0.39		0.47	
	Sd	0.07		0.02		0.13		0.76		0.39		0.50	
	D x Sd	0.85		0.58		0.99		0.26		0.32		0.36	
Diet	Control diet	11.74	8	11.20	8	8.94	8	7.28	7	8.46	8	9.57	8
	Exp ⁴ diet	11.59	8	11.02	8	8.87	8	7.06	8	8.12	8	9.33	8
	SEM	0.083		0.120		0.130		0.516		0.264		0.230	
Stocking density (Sd)	Low Sd ²	11.78	8	11.30	8	8.75	8	7.05	7	8.13	8	9.57	8
	High Sd ³	11.56	8	10.92	8	9.06	8	7.29	8	8.46	8	9.33	8
	SEM	0.077		0.103		0.123		0.617		0.261		0.226	

na: not applicable

nd: not detected

For each dietary treatment and stocking density n=4 pools of 5 birds

¹Expressed as Log10 copies number of 16S rDNA per 1g of fresh digestive content; in the case where incidence was <100%, the mean was calculated considering that the amount of DNA in the undetected samples was at the theoretical detection limit (i.e. 1 gene copy in the PCR reaction)

²Low density: 12 birds /m²

³High density: 17 birds /m²

⁴Exp diet: control diet with the PHY phytobiotic blend (1 kg/t) from d22 to d39

⁵In parenthesis the number of actual samples used for the calculation due to missing data

Annexe 5 : Effet du traitement Exp1 sur l'abondance des bactéries dans les contenus digestifs de l'iléon à 3 semaines

		All bacteria		<i>Lactobacillus</i> group		Enterobacteriaceae family		<i>Bacteroides</i> group		<i>C.leptum</i> group		<i>C.coccoides</i> group	
		Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence
P value	Diet (D)	0.97		0.44		0.41		0.26		0.60		0.44	
	Sd	0.88		0.61		0.15		0.99		0.35		0.48	
	D x Sd	0.78		0.60		0.19		0.99		0.76		0.88	
Diet	Control diet	10.73	8	10.76	8	8.91	8	6.15	7	7.84	8	9.57	8(6)
	Exp ⁴ diet	10.74	8	10.54	8	8.71	8	6.85	8	7.64	8	9.29	8
	SEM	0.223		0.187		0.179		0.354		0.257		0.259	
Stocking density (Sd)	Low Sd ²	10.76	8	10.72	8	8.63	8	6.50	7	7.55	8	9.31	8(7)
	High Sd ³	10.71	8	10.58	8	8.99	8	6.50	8	7.92	8	9.55	8(7)
	SEM	0.223		0.183		0.167		0.417		0.251		0.262	

na: not applicable

nd: not detected

For each dietary treatment and stocking density n=4 pools of 5 birds

¹Expressed as Log10 copies number of 16S rDNA per 1g of fresh digestive content; in the case where incidence was <100%, the mean was calculated considering that the amount of DNA in the undetected samples was at the theoretical detection limit (i.e. 1 gene copy in the PCR reaction)

²Low density: 12 birds /m²

³High density: 17 birds /m²

⁴Exp diet: control diet with the PHY phytobiotic blend (1 kg/t) from d22 to d39

⁵In parenthesis the number of actual samples used for the calculation due to missing data

Annexe 6 : Effet du traitement Exp1 sur l'abondance des bactéries dans les contenus digestifs des caeca à 3 semaines

		All bacteria		<i>Lactobacillus</i> group		Enterobacteriaceae family		<i>Bacteroides</i> group		<i>C.leptum</i> group		<i>C.coccoides</i> group	
		Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence
P value	Diet (D)	0.41		0.93		0.01		0.50		0.01		0.67	
	Sd	0.19		0.68		0.42		0.65		0.38		0.17	
	D x Sd	0.19		0.82		<0.01		0.07		0.88		0.92	
Low ² Sd	Control diet					10.27 ^a	4						
	Exp ⁴ diet					10.22 ^a	4						
High ³ Sd	Control diet					9.65 ^b	4						
	Exp ⁴ diet					10.58 ^a	3						
	SEM					0.487							
Diet	Control diet	12.77	8	11.04	8	9.96 ^b	8	10.27	8	10.91 ^a	8	11.82	8
	Exp ⁴ diet	12.71	8	11.05	8	10.40 ^a	7	10.33	8	10.70 ^b	8	11.80	8
	SEM	0.055		0.105		0.138		0.061		0.047		0.056	
Stocking density (Sd)	Low Sd ²	12.77	8	11.01	8	10.25	8	10.32	8	10.84	8	11.75	8
	High Sd ³	12.69	8	11.08	8	10.12	7	10.28	8	10.77	8	11.86	8
	SEM	0.053		0.106		0.156		0.060		0.060		0.050	

na: not applicable

nd: not detected

For each dietary treatment and stocking density n=4 pools of 5 birds

¹Expressed as Log10 copies number of 16S rDNA per 1g of fresh digestive content; in the case where incidence was <100%, the mean was calculated considering that the amount of DNA in the undetected samples was at the theoretical detection limit (i.e. 1 gene copy in the PCR reaction)

²Low density: 12 birds /m²

³High density: 17 birds /m²

⁴Exp diet: control diet with the PHY phytobiotic blend (1 kg/t) from d22 to d39

⁵In parenthesis the number of actual samples used for the calculation due to missing data

Annexe 7 : Effet du traitement Exp1 sur l'abondance des bactéries dans les contenus digestifs du jabot à 6 semaines

		All bacteria		<i>Lactobacillus</i> group		Enterobacteriaceae family		<i>Bacteroides</i> group		<i>C.leptum</i> group		<i>C.coccoides</i> group	
		Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence
P value	Diet (D)	0.24		0.55		0.16		0.09		0.31		0.18	
	Sd	0.45		0.78		0.12		0.50		0.52		0.34	
	D x Sd	0.97		0.92		0.89		0.63		0.56		0.57	
Diet	Control diet	11.89	8	11.40	8	8.88	8	6.03	6	8.03	8	9.25	8
	Exp ⁴ diet	11.76	8	11.31	8	8.58	8	5.11	6	7.78	8	8.96	8
	SEM	0.072		0.095		0.141		0.485		0.156		0.139	
Stocking density (Sd)	Low Sd ²	11.87	8	11.38	8	8.99	8	5.63		7.98	8	9.21	8
	High Sd ³	11.79	8	11.34	8	8.56	8	5.51		7.83	8	9.01	8
	SEM	0.071		0.098		0.131		0.514		0.157		0.143	

na: not applicable

nd: not detected

For each dietary treatment and stocking density n=4 pools of 5 birds

¹Expressed as Log10 copies number of 16S rDNA per 1g of fresh digestive content; in the case where incidence was <100%, the mean was calculated considering that the amount of DNA in the undetected samples was at the theoretical detection limit (i.e. 1 gene copy in the PCR reaction)

²Low density: 12 birds /m²

³High density: 17 birds /m²

⁴Exp diet: control diet with the PHY phytobiotic blend (1 kg/t) from d22 to d39

⁵In parenthesis the number of actual samples used for the calculation due to missing data

Annexe 8 : Effet du traitement Exp1 sur l'abondance des bactéries dans les contenus digestifs de l'iléon à 6 semaines

		All bacteria		<i>Lactobacillus</i> group		Enterobacteriaceae family		<i>Bacteroides</i> group		<i>C.leptum</i> group		<i>C.coccoides</i> group	
		Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence
P value	Diet (D)	0.24		0.52		0.59		0.65		0.31		0.16	
	Sd	0.15		0.12		0.25		0.48		0.78		0.40	
	D x Sd	0.20		0.28		0.39		0.22		0.14		0.14	
Diet	Control diet	11.27	8	11.20	8	9.58	8	4.53	6	6.74	8	8.79	8 (6) ⁵
	Exp ⁴ diet	10.96	8	11.09	8	9.46	7	4.83	5	7.07	8	8.41	8(7)
	SEM	0.187		0.120		0.156		0.453		0.223		0.179	
Stocking density (Sd)	Low Sd ²	10.92	8	11.01	8	9.38	8	4.91	3	6.94	8	8.66	8(7)
	High Sd ³	11.30	8	11.28	8	9.65	7	4.45	8	6.86	8	8.50	8(6)
	SEM	0.182		0.111		0.147		0.442		0.231		0.166	

na: not applicable

nd: not detected

For each dietary treatment and stocking density n=4 pools of 5 birds

¹Expressed as Log10 copies number of 16S rDNA per 1g of fresh digestive content; in the case where incidence was <100%, the mean was calculated considering that the amount of DNA in the undetected samples was at the theoretical detection limit (i.e. 1 gene copy in the PCR reaction)

²Low density: 12 birds /m²

³High density: 17 birds /m²

⁴Exp diet: control diet with the PHY phytobiotic blend (1 kg/t) from d22 to d39

⁵In parenthesis the number of actual samples used for the calculation due to missing data

Annexe 9 : Effet du traitement Exp1 sur l'abondance des bactéries dans les contenus digestifs des caeca à 6 semaines

		All bacteria		<i>Lactobacillus</i> group		Enterobacteriaceae family		<i>Bacteroides</i> group		<i>C.leptum</i> group		<i>C.coccoides</i> group	
		Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence	Mean ¹	Incidence
P value	Diet (D)	0.37		0.89		0.16		0.64		0.36		0.38	
	Sd	0.99		0.76		0.34		0.64		0.89		0.78	
	D x Sd	0.33		0.52		0.63		0.29		0.33		0.29	
Diet	Control diet	12.60	8	11.11	8	9.86	8	9.83	8(7) ⁵	10.78	8	11.66	8
	Exp ⁴ diet	12.70	8	11.14	8	10.06	8	9.91	8	10.92	8	11.76	8
	SEM	0.074		0.132		0.093		0.118		0.097		0.077	
Stocking density (Sd)	Low Sd ²	12.65	8	11.09	8	10.03	8	9.93	8(7) ⁵	10.84	8	11.69	8
	High Sd ³	12.65	8	11.15	8	9.89	8	9.83	8	10.86	8	11.73	8
	SEM	0.076		0.128		0.098		0.117		0.097		0.080	

na: not applicable

nd: not detected

For each dietary treatment and stocking density n=4 pools of 5 birds

¹Expressed as Log10 copies number of 16S rDNA per 1g of fresh digestive content; in the case where incidence was <100%, the mean was calculated considering that the amount of DNA in the undetected samples was at the theoretical detection limit (i.e. 1 gene copy in the PCR reaction)

²Low density: 12 birds /m²

³High density: 17 birds /m²

⁴Exp diet: control diet with the PHY phytobiotic blend (1 kg/t) from d22 to d39

⁵In parenthesis the number of actual samples used for the calculation due to missing data

Effets de Phytobiotiques sur les Performances de Croissance et l'Equilibre du Microbiote Digestif du Poulet de Chair

Résumé

Suite à l'interdiction de l'utilisation des antibiotiques facteurs de croissances dans l'alimentation animale en 2006, des méthodes alternatives sont proposées aux éleveurs, notamment les phytobiotiques. Cependant, l'efficacité de ces molécules, telle que décrite dans la littérature, est variable, et leur modes d'action est mal connu. Nous avons pu mettre en évidence un effet important des conditions d'élevage dans la réponse des poulets aux deux modèles de phytobiotiques étudiés. Ils améliorent les performances zootechniques des animaux placés dans des conditions défavorables à leur croissance. Dans des conditions très dégradées, l'utilisation couplée de phytobiotiques portant des activités biologiques variées s'est avéré plus efficace. De plus, les modèles étudiés comprenant de nombreuses molécules exerçant une activité antibactérienne *in vitro*, nous avons étudié *in vivo* la réponse du microbiote digestif à leur ingestion par l'animal. Des modifications du microbiote digestif ont été observées et pourraient en partie expliquer l'amélioration de leur croissance.

Mots-clefs : Poulet, Phytobiotique, Conditions d'élevage, Croissance, Microbiote digestif

Résumé en anglais

The banning of antibiotic growth promoters for livestock feeding led to the development of several alternatives, including phytobiotics. However, their efficiency as growth promoters is inconstant between scientific studies and their mechanisms of action are poorly known. In the present work, the rearing conditions strongly affect the efficiency of two phytobiotics models. They improved the chickens' growth performance when the rearing conditions were unfavorable to the growth. When strongly deteriorated, the combination of phytobiotics showing various biological activities was more efficient. As the phytobiotics used in the present study contains numerous molecules with an *in vitro* antibacterial activity, the impact of those phytobiotics on chickens' digestive microbiota was studied *in vivo*. Changes in chickens' digestive microbiota were observed which could partly explain the chickens' growth improvement.

Keywords: Chicken, Phytobiotic, Rearing condition, Growth, Digestive microbiota