

Effet d'une supplémentation alimentaire en glutamine et en arginine sur la croissance, quelques paramètres de la flore iléale et caecale et la santé intestinale chez le lapereau, sevré précocement et atteint par le syndrome de l'EEL.

S. CHAMORRO¹, R. CARABAÑO¹, I. BADIOLA², J. GARCÍA¹, J.C. DE BLAS¹

¹ Universidad Politécnica de Madrid. Dpto Producción Animal, 28040. Madrid, Espagne

² CreSA (UAB-IRTA). Campus de Bellaterra. Barcelona, Espagne

Résumé L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet d'un apport alimentaire de L-glutamine (1%) ou de L-glutamine + arginine (1 + 0.5%) sur la microflore iléale et caecale et sur la croissance et la mortalité du lapereau, sevré à 25 jours. La mortalité des animaux est élevée en raison d'une épidémie d'Entéropathie Epizootique du Lapin (EEL): un traitement antibiotique a donc été appliqué de 25 à 56 jours d'âge, pour les 3 groupes (Témoin, Glu et Glu+Arg). L'addition d'un 1% de glutamine n'améliore pas la croissance, mais cela réduit la mortalité par EEL (31,9 vs 20% entre 25 et 56j), et cela limite la présence de *Clostridies spp.* et *perfringens.*, de *Campylobacter spp.* et d'*Helicobacter spp.*. L'addition de 0.5% d'arginine n'améliore aucun des paramètres précédents.

Summary : Effect of the dietary supplementation of glutamine and arginine on the intestinal health, ileal and caecal microbiota and fattening performance in weaned rabbit affected by ERE. The aim of this work was to study the effect of a supplementation of L-glutamine (1%) or L-glutamine + arginine (1+ 0.5%) on the ileal and caecal microbiota and fattening performances in rabbits weaned at 25 days. The mortality rate was high because of Epizootic Rabbit Enteropathy (ERE) and animals were supplemented from 25 to 56 days of age in every treatments (control, Glu and Glu+Arg). The supplementation with 1% of glutamine did not affect the growth performance however, it reduced the mortality caused by ERE (39.1 vs 20% from 25 to 56 days of age), modified the intestinal microbiota and limited the presence of *Clostridium spp.* and *perfringens.*, *Campylobacter spp.* and *Helicobacter spp.* The additional supplementation with 0.5% of arginine did not improve any of those results.

Introduction

L'alimentation pourrait avoir un effet favorable sur la morphologie de la muqueuse, sa fonctionnalité et la réponse immunitaire du lapin, et pourrait réduire l'incidence de Entéropathie Epizootique du Lapin (EEL) (Gómez-Conde *et al.*, 2004, 2006 et 2007). Certains acides aminés, comme la glutamine et l'arginine, semblent jouer un rôle fondamental pour maintenir les mécanismes de barrière intestinale (Wu, 1998). Des travaux réalisés sur le porcelet autour du sevrage montrent que la supplémentation avec un 1% de glutamine prévient l'atrophie de villosités du jéjunum (Wu *et al.*, 1996), et normalise la fonctionnalité des lymphocytes (Yoo *et al.*, 1997). L'arginine semble aussi être indispensable pour l'activation immunitaire (Kim *et al.*, 2004). Chez le lapereau, un premier essai (Chamorro *et al.*, 2007b) montre que l'addition alimentaire de glutamine et d'arginine n'affecterait ni la morphologie ni la fonctionnalité du jéjunum, bien que cela réduit la mortalité par EEL, ainsi que les lésions intestinales par coccidioses. Cependant, ce dernier effet n'explique pas totalement la réduction de mortalité observée, car la présence de coccidies aggrave les symptômes d'EEL (Coudert *et al.*, 2000) mais n'est pas l'agent pathogène responsable. Une réduction de la mortalité par EEL a été aussi obtenue avec une réduction de flux iléal azoté, obtenu par une réduction du niveau de protéines ou par l'utilisation de source protéiques très digestibles (Gutiérrez *et al.*, 2003 ;

Chamorro *et al.*, 2007a). Un flux iléal azoté élevé dans la partie distale de l'intestin grêle modifierait la microflore intestinale, et augmenterait la présence de certaines bactéries protéolytiques, telles que *Clostridium perfringens* (Chamorro *et al.*, 2007a). Par conséquent, l'objectif de cet essai est d'étudier l'effet d'un apport alimentaire de glutamine et d'arginine sur la microflore intestinale, la croissance et la santé digestive chez le lapereau sevré précocement.

1. Matériel et méthodes

1.1. Aliments

Un aliment témoin a été formulé pour répondre aux besoins nutritionnels de lapins en croissance selon De Blas et Mateos (1998). Deux autres régimes ont été formulés à partir du témoin en ajoutant par dilution 1% de L-glutamine (régime Glu) et 1% de L-glutamine plus 0.5% d'arginine (régime Glu+Arg). Les aliments ont été granulés et distribués aux animaux *ad libitum* jusqu'à 39 jours d'âge, puis ils ont reçu un aliment commercial jusqu'à 56 jours d'âge, sans restriction d'accès à l'eau pendant toute la durée de l'expérience. La composition et les analyses chimiques des aliments figurent dans le tableau 1.

1.2. Animaux

Un total de 402 lapins sevrés à 25 jours d'âge, et issus de femelles croisées Néo Zélandais x Californien (originaire de l'Universidad Politécnica Valencia) ont été utilisés dans cet essai. Trois cent cinquante sept lapins (119 par régime) ont été utilisés pour étudier la

Tableau 1. Composition et analyses chimiques des régimes expérimentaux, distribués de 25 à 39j. d'âge.

| | Témoin | Glu | Glu+Arg |
|-------------------------------------|--------|------|---------|
| <i>Ingrédients</i> | | | |
| Blé tendre | 25,0 | | |
| Tourteau de tournesol 36 | 10,0 | | |
| Luzerne | 34,0 | | |
| Saindoux | 2,00 | | |
| NaCl | 0,50 | | |
| Vitamin/Mineral premix ¹ | 0,50 | | |
| DL Methionine | 0,15 | | |
| L-Lysine | 0,35 | | |
| L-Treonine | 0,15 | | |
| L-Glutamine | 0,00 | 1,00 | 1.00 |
| Arginine | 0,00 | 0,00 | 0.50 |
| <i>Nutriments (g/kg MS)</i> | | | |
| Matière sèche | 909 | 920 | 914 |
| Amidon | 230 | 229 | 222 |
| NDF | 330 | 336 | 332 |
| ADF | 178 | 182 | 182 |
| ADL | 45,7 | 45,2 | 45,1 |
| PB | 175 | 187 | 197 |
| Acide glutamique | 30,8 | 42,7 | 41,6 |
| Arginine | 1,01 | 1,01 | 1,42 |

¹Fourni par Trouw Nutrition International

mortalité pendant tout la période d'engraissement (25 à 56 j. d'âge). Deux autres groupes d'animaux ont été utilisés pour mesurer les performances de croissance (34 par régime expérimental) et la composition microbienne iléale et cœcale par RFLP (15 par régime, avec un poids au sevrage de 485 ± 78 g).

La mortalité a été contrôlée une fois par jour. Sur tout animal mort une autopsie a été réalisée afin de décrire les lésions macroscopiques. A cause de la haute mortalité par EEL enregistré dans notre ferme expérimentale, tous les animaux ont été supplémentés avec un antibiotique (100 mg/kg de apramycine sulfate et 120 mg/kg de tylosine, pour l'effet de cette médication voir Chamorro *et al.*, 2007a,) dans l'eau de boisson pendant tout l'essai (de 25 à 56 jours d'âge).

L'essai a été entièrement mené en cages individuelles de 280 mm x 440 mm x 290 mm. Les systèmes de chauffage et de ventilation ont permis de maintenir une température à l'intérieur du bâtiment comprise entre 18 et 24 °C.

1.3. Données enregistrées

Après le sevrage tous les animaux ont été allotés au hasard pour chaque régime expérimental. Pour l'essai de mortalité et de performances de croissance, les animaux ont été nourris avec les régimes expérimentaux pendant les deux premières semaines après le sevrage (jusqu'à 39 jours d'âge), puis ils ont reçu un aliment commercial (CUNIUNIC®, NANTA, S.A : 170 g Protéine brute, 144 g d'amidon et 373 g de NDF par kilogramme) jusqu'à la fin de la période d'engraissement à 56 jours d'âge.

Pour mesurer la composition microbienne iléale et

cœcale par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), après un une période d'adaptation à l'aliment de 10 jours, les animaux ont été abattus par dislocation des vertèbres cervicales à l'âge de 35 jours à un poids de 860 ± 119 g. Un gramme de contenu iléal et cœcal ont été prélevé puis stockés à 4°C dans des tubes stériles contenant 3 ml d'éthanol à 98%. Ils ont ensuite été analysés par RFLP selon la procédure décrite par Chamorro *et al.* (2007a). La présence ou absence des bandes obtenues par RFLP compatibles avec une espèce ou genre bactérien a été déterminé pour chaque animal, et le pourcentage d'animaux par groupe qui présentaient ces profils a été défini comme la fréquence de profil compatible.

Pour les comparaison des bandes et la construction des dendrogrammes, des matrices de similarité basées sur les distances de Manhattan (Kaufmann and Rousseeuw, 1990) qui considèrent la taille et l'intensité des bandes générées.

1.4. Analyses statistiques

Les performances de croissance ont été analysées pour les animaux qui finissaient l'essai, suivant un plan complètement randomisé en utilisant le régime expérimental et la portée comme effets fixes et le poids au sevrage comme covariable avec la procédure GLM de SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Les comparaisons de moyennes ont été faites par contrastes orthogonaux : contraste 1 = Témoin vs Glu + (Glu+Arg) et contraste 2 = Glu vs Glu+Arg. Pour les données de mortalité et de fréquence de profil compatible, les comparaisons de moyennes ont été faites, deux à deux, sur la base de test de Chi deux.

2. Résultats

Les animaux morts pendant l'essai ont montré des lésions macroscopiques caractéristiques d'EEL : dilatation de l'intestin grêle et de l'estomac avec présence de liquide, caecum compacté, présence de mucus. La mortalité commençait la deuxième semaine après le sevrage et montrait un maximum pendant la troisième semaine après le sevrage.

De 25 à 39 jours d'âge, l'addition de glutamine ou d'arginine n'a pas eu d'effet sur la croissance, l'ingestion (46,8 et 74,6 g/jour en moyenne respectivement) ou l'efficacité alimentaire (0,626; tableau 2). En revanche, l'addition de glutamine a réduit la mortalité pendant cette période (18,5% vs 8,4%, P<0,01), tandis que l'addition d'arginine n'avait pas d'effet significatif.

De 25 à 56 j., les animaux qui ont consommé les régimes avec 1% de glutamine (glu et glu+arg) ont eu moins de mortalité (31,9 vs 21,8%, P=0,04), l'ingestion moyenne quotidienne tendait à augmenter (114 vs 108 g/jour, P=0,07), et aucun effet sur le gain moyen et sur l'efficacité n'a été observé. L'addition d'arginine (glu vs glu+arg) tendait à augmenter le gain moyen quotidien (46,5 vs 48,9 g/jour, P=0,08) et le poids à 56 jours (1903 vs 1979 g, P=0,09) tandis que l'ingestion et la mortalité n'ont pas été modifiées.

L'addition de glutamine a réduit la fréquence des profils compatibles (tableau 3) avec *Clostridium* spp (92,9 vs 33,3%, P=0,001), *Helicobacter* spp. (92,9 vs 29,3%, P=0,001), et *Clostridium perfringens* (21,4 vs 3,4%, P=0,07) dans l'iléon; et avec *Helicobacter* spp.

(86,7 vs 53,3, P=0,03) dans le cæcum. Aucun effet n'a été observé avec l'addition d'arginine.

La microflore iléale et caecale des animaux alimentés avec les régimes glu et glu+arg présentait une faible similarité avec les témoins (figure 1).

Tableau 2. Effet de l'addition de glutamine et arginine sur les performances de croissance et la mortalité.

| | Régime | Témoin | Glu | Glu+Arg | SEM ¹ | P ³ | |
|--|--------|--------|-------|---------|------------------|----------------|------|
| | | | | | | 1 | 2 |
| Poids au sevrage (25 jours) | | 477 | 461 | 453 | 13,2 | NS | NS |
| <i>Période 25-39 jours</i> | | | | | | | |
| Gain moyen quotidien (g/jour) | | 45,9 | 46,0 | 48,5 | 1,5 | NS | NS |
| Ingestion moyenne quotidienne (g/jour) | | 72,5 | 73,2 | 78,1 | 2,2 | NS | NS |
| Efficacité alimentaire (g /g) | | 0,632 | 0,624 | 0,623 | 0,010 | NS | NS |
| Poids à 39 jours | | 1106 | 1107 | 1139 | 21,1 | NS | NS |
| Mortalité, % ² | | 18,5 | 8,4 | 8,4 | - | 0,005 | NS |
| <i>Période 25-56 jours</i> | | | | | | | |
| Gain moyen quotidien (g/jour) | | 46,7 | 46,5 | 48,9 | 1,00 | NS | 0,08 |
| Ingestion moyenne quotidienne (g/jour) | | 108 | 112 | 116 | 2,5 | 0,07 | NS |
| Efficacité alimentaire (g /g) | | 0,434 | 0,421 | 0,424 | 0,006 | NS | NS |
| Poids à 56 jours | | 1909 | 1903 | 1979 | 30,9 | NS | 0,09 |
| Mortalité, % ² | | 31,9 | 20,2 | 23,5 | - | 0,04 | NS |

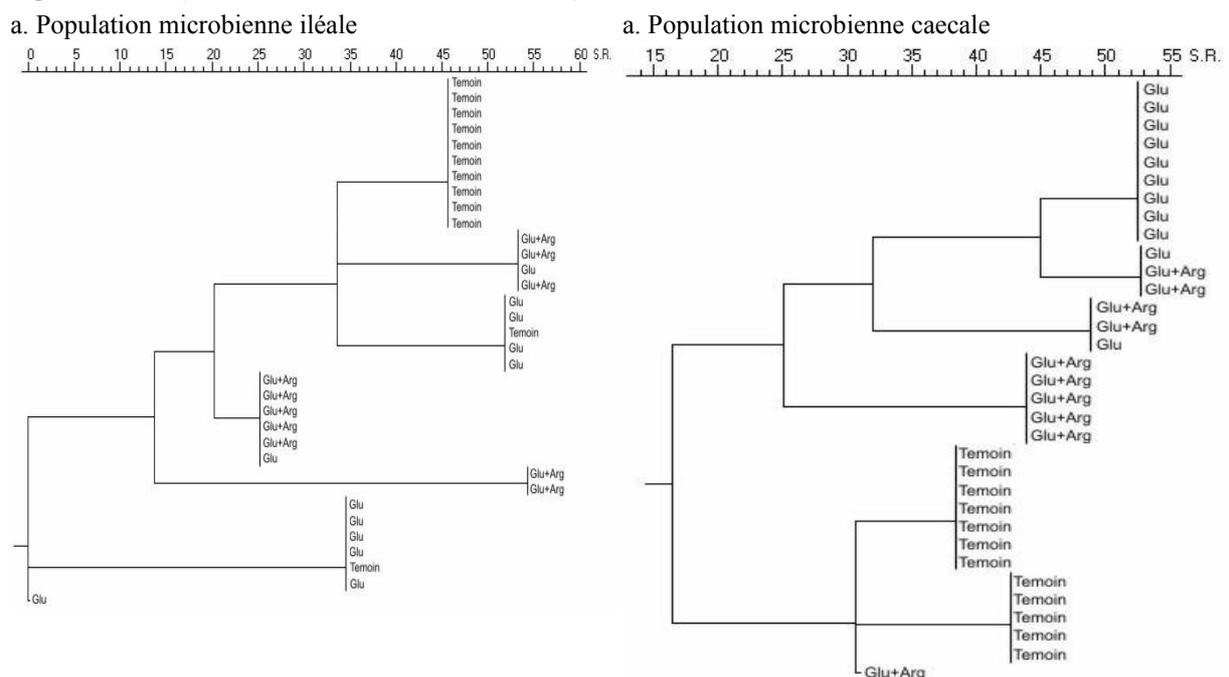
¹N=34 ; ²N=119 par régime expérimental ; ³Contrastes : 1=Témoin vs Glu + (Glu+Arg) ; 2=Glu vs Glu+Arg

Tableau 3. Effet de l'addition de glutamine et d'arginine sur la fréquence de profil compatible (%) de la microbiote iléale et caecale mesuré par RFLP

| | Ileum | | | | | Caecum | | | | |
|--------------------------------|--------|------|---------|----------------|----|--------|------|---------|----------------|----|
| | Témoin | Glu | Glu+Arg | P ¹ | | Témoin | Glu | Glu+Arg | P ¹ | |
| | | | | 1 | 2 | | | | 1 | 2 |
| <i>Clostridium</i> spp. | 92,9 | 33,3 | 33,3 | 0,001 | NS | 100 | 100 | 100 | NS | NS |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 21,4 | 6,7 | 0,0 | 0,07 | NS | 53,3 | 40,0 | 66,7 | NS | NS |
| <i>Campylobacter</i> spp. | 50,0 | 20,0 | 33,3 | NS | NS | 73,3 | 46,7 | 73,3 | NS | NS |
| <i>Helicobacter</i> spp. | 92,9 | 33,3 | 25,0 | 0,001 | NS | 86,7 | 46,7 | 60,0 | 0,03 | NS |

¹Contrastes : 1=Témoin vs Glu + (Glu+Arg) ; 2=Glu vs Glu+Arg

Figure 1. Similarité de la population microbienne de lapereaux âgés de 35j et nourris avec les différents régimes expérimentaux (en abscisse : taux de similarité en %).



Quand on compare la microflore des animaux alimentés avec glu et avec glu+arg, on observe une faible similarité pour le caecum tandis que pour l'ileum la microflore était plus similaire entre ces deux traitements.

3. Discussion

Les effets les plus marquants sont obtenus avec la supplémentation en glutamine : réduction de la mortalité et modification de la microflore iléale et caecale, en particulier une réduction de certains genres ou espèces bactériennes (*C. perfringens*, *Helicobacter* spp., *Campylobacter* spp.), pour lesquels une corrélation avec l'incidence de EEL a été observée (Carabaño *et al.*, 2006). Nos résultats semblent aussi indiquer que les changements de la microflore iléale sont plus liés aux résultats de mortalité que ceux de la flore du cæcum. Ces résultats sont en accord avec ceux de Carabaño *et al.* (2006) montrant que la microflore iléale semble être plus sensible que celle du caecum, pour mettre en évidence des relations entre alimentation (particulièrement pour l'apport de protéines) et sensibilité à l'EEL. Les causes de ces modifications de flore restent inconnues. Cependant, quelques études récentes montrent qu'une variation de la disponibilité en substrats arrivant à l'iléon peut provoquer des changements importants sur la microflore (Gómez-Conde *et al.* 2006, Chamorro *et al.*, 2007a).

Conclusion

Une supplémentation en glutamine réduit la mortalité causée par l'EEL, modifie la microflore intestinale, et limite la présence de certains genres ou espèces bactériennes associés à l'incidence de l'EEL. L'addition d'arginine (en plus de la glutamine) n'a pas d'effet sur ces paramètres.

Remerciements

Ce travail a eu le soutien d'un projet AGL2005-03203.

Références

- CARABAÑO R., BADIOLA I., LICOIS D., GIDENNE T. 2006. The digestive ecosystem and its control through nutritional or feeding strategies. In : *Recent advances in rabbit sciences*. Ed. L. Maertens and P. Coudert. ILVO, 211-227.
- COUDERT P., LICOIS D., ZONNEKEYN V. 2000. Epizootic Rabbit Enterocolitis and coccidiosis a criminal conspiracy. *Proc 7th World Rabbit Congress*, Valencia, Spain
- CHAMORRO S., GOMEZ CONDE M.S., PEREZ DE ROZAS A.M., BADIOLA I., CARABAÑO R., DE BLAS J.C. 2007a. Effect on digestion and performance of dietary protein content and of increased substitution of lucerne hay with soya-bean protein concentrate in starter diets for young rabbits. *Animal* 1, 651-659.
- CHAMORRO S., CARABAÑO R., GRANT G., GARCIA J., DE BLAS C. 2007b. Efecto de la adición de glutamina y arginina sobre la mortalidad y barrera intestinal en gazapos. *II Congreso Ibérico de Cunicultura*, Vila-Real, Portugal 5-6 /06/2007, 91-94.
- DE BLAS J.C., MATEOS G.G., 1998. Feed formulation. In: *The Nutrition of the Rabbit*. Ed. J.C. De Blas and J. Wiseman. CABI Publishing, pp 241-254.
- GÓMEZ-CONDE M.S., CHAMORRO S., NICODEMUS N., GARCIA J., CARABAÑO R., DE BLAS C. 2004. Effect of the level of soluble fibre on ileal apparent digestibility at different ages. *Proc 8th World Rabbit Congress*, Puebla, Mexico, 862-863.
- GÓMEZ-CONDE M.S., PEREZ DE ROZAS A.M., BADIOLA I., CHAMORRO S., MATEOS, G. G., DE BLAS, J. C., GARCIA J., CARABAÑO, R. 2006. Level of soluble fiber and medication influence the presence of intestinal pathogen microbiota in young rabbits. *J. Anim. Sci.*, 84, 343-343 Suppl. 1.
- GÓMEZ-CONDE M.S., GARCÍA J., CHAMORRO S., EIRAS P REBOLLAR P.G., PÉREZ DE ROZAS A, BADIOLA I., DE BLAS C., CARABAÑO R. 2007. Neutral detergent-soluble fiber improves gut barrier function in 25 d old weaned rabbits. *J. Anim. Sci.* Published Online First on August 20, 2007 as doi:10.2527/jas.2006-777
- GUTIÉRREZ I., ESPINOSA A., GARCÍA J., CARABAÑO R., DE BLAS J.C. 2003. Effect of protein source on digestion and growth performance of early-weaned rabbits. *Anim. Res.*, 52, 461-471.
- KAUFMANN L., ROUSSEEUW P. J. 1990. Finding Groups in Data. An Introduction to Cluster Analysis. John Wiley & Sons, New York, NY.
- KIM S.W., MCPHERSON R.L., WU G. 2004. Dietary arginine supplementation enhances the growth of milk-fed young pigs. *J.Nutr.*, 134, 625-630.
- SAS. Statistical Analysis Systems Institute. 1991. User's guide, statistics, version 6.03, edition. SAS. Institute Inc., Cary, NC.
- WU G., SABINA A.M., KNABE A. 1996. Dietary glutamine supplementation prevents jejunal atrophy in weaned rabbits. *J.Nutr.*, 126, 2578-2584
- WU G. 1998. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J.Nutr.*, 128, 1249-1252.
- YOO S.S., FIELD C.J., MCBURNEY M.I. 1997. Glutamine supplementation maintains intramuscular glutamine concentrations and normalizes lymphocyte function in infected early weaned pigs. 1997. *J.Nutr.*, 127, 2253-2259. Figure 1. Similarité de la population microbienne iléale de lapereaux âgés de 35j et nourris avec les différents régimes expérimentaux.