

Effet modulateur sur la population bactérienne intestinale des hydrates de carbone constitutifs de différentes variétés de céréales

Jérôme Bindelle, 1^{er} Assistant, Unité de Zootechnie, Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège, Passage des Déportés, 2, 5030, Gembloux, Belgique

Robert Pieper, Researcher, Institute of Animal Nutrition, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Brümmerstraße 34, 14195 Berlin, Allemagne

Andrew Van Kessel, Professor, Department of Animal & Poultry Science, University of Saskatchewan, 51 Campus Drive, S7H 5A8 Saskatoon, SK, Canada

Pascal Leterme, Researcher & Associate Professor, Prairie Swine Centre Inc., 2105 8th Street East, S7H 5N9 Saskatoon, SK, Canada

1. Introduction

Le tractus gastro-intestinal (TGI) des porcs est un organe servant à la digestion et l'absorption de nutriments. C'est aussi un organe extrêmement actif en matière de transformations métaboliques qui joue un rôle très important dans les mécanismes de défenses de l'animal contre les pathogènes (Pluske, 2008).

Lors du sevrage des porcelets, de nombreux problèmes de santé sont susceptibles d'apparaître en raison des changements encourus au niveau de l'alimentation, de la constitution des groupes d'animaux et des conditions environnementales. L'occurrence de diarrhées provoquées par la prolifération de bactéries entéro-toxiques dans l'intestin grêle et/ou la fermentation excessive de substrats indigestibles dans le gros intestin est élevée.

Les antibiotiques ont été intensément utilisés en vue de prévenir ces problèmes. Toutefois l'interdiction de leur utilisation à titre préventif en raison des risques pour la santé publique liés aux phénomènes de résistance a conduit à une recherche intense de solutions alternatives pour maintenir la santé intestinale du porcelet lors du sevrage. Parmi celles-ci, la manipulation de l'alimentation et l'utilisation d'additifs alimentaires ont été envisagées : extraits de levures, huiles essentielles, probiotiques (Pluske, 2008), colostrum bovin (Boudry et al., 2008), etc. Différentes recherches ont également porté sur les fibres alimentaires. Traditionnellement, ces hydrates de carbone (CHO) non digestibles mais fermentables, souffrent d'une image négative dans la mesure où ils diminuent la densité énergétique des aliments et peuvent affecter négativement la digestibilité des nutriments et les performances de croissance. Parmi ces fibres, on retrouve une série de molécules très diverses allant de l'amidon résistant à la cellulose en passant par des pectines, des hémicelluloses et des oligosaccharides. Des enzymes hydrolases (β -glucanases, xylanases) sont ainsi ajoutés aux régimes pour limiter ces effets (Li et al., 1996). Néanmoins, étant donné que les fibres constituent le substrat de prédilection des bactéries intestinales, les variations de composition en fibres alimentaires des régimes et des aliments qui les composent tels que les céréales sont une voie possible pour influencer la santé intestinale des porcs.

2. Population bactérienne intestinale

Le concept de santé intestinale repose sur les interactions entre la muqueuse intestinale et la population bactérienne qui colonise le TGI des porcs. Cette population microbienne est extrêmement diversifiée. Elle comprend plus de 400 phylotypes (Leser et al., 2002). La concentration en bactéries évolue de 10^7 à 10^8 colonies.g⁻¹ dans l'estomac et l'intestin grêle à 10^{10} à 10^{11} colonies.g⁻¹ dans le gros intestin. Environ 90 % des bactéries cultivables sont des bactéries Gram-positives appartenant aux genres *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Clostridium* et *Peptostreptococcus*, tandis que les 10 % restant appartiennent aux genres

Bacteroides et *Prevotella*. Urubschurov et al. (2007) ont également mis en évidence la grande diversité des espèces de levures du TGI du porc.

Les fermentations de CHO (fibres alimentaires) et de protéines d'origine alimentaire et les sécrétions endogènes et les cellules desquamées de la muqueuse intestinale produisent des acides gras à courte chaîne (AGCC) tels que du lactate, de l'acétate, du propionate et du butyrate. Ces AGCC sont assimilés par le porc qui les utilise comme substrat énergétique. Le butyrate semble particulièrement intéressant puisqu'il est métabolisé directement par les entérocytes intestinaux et contribue à leur renouvellement. Toutefois, ces fermentations peuvent conduire à la production de substances toxiques pour l'hôte telles que de l'ammoniaque, des amines, etc. (Anderson, 2002).

La population bactérienne commensale influence aussi le développement des fonctions immunes. Elle stimule l'imperméabilité de l'épithélium intestinal, le système immunitaire de la muqueuse intestinale et protège contre la surcroissance de bactéries pathogènes, la colonisation de la lumière intestinale et leur adhésion à la muqueuse (Willing et Van Kessel, 2010)

Les communautés bactériennes intestinales sont sujettes à des modifications des espèces prédominantes. La présence de CHO non-digestibles tels que les polysaccharides non-amylacés (NSP) et l'amidon résistant dans les régimes semble jouer un rôle prépondérant dans ces modifications (Louis et al., 2007). Ces CHO ne sont pas digérés par les enzymes sécrétés par l'animal mais fermentés par les bactéries intestinales qui entrent en compétition pour ces substrats. Dès lors depuis quelques années, les recherches se sont accentuées en matière d'inclusion de CHO dans les aliments des porcelets sevrés pour exploiter leur potentiel prébiotique et promouvoir les bactéries bénéfiques telles que les lactobacilles (Verstegen & Williams, 2002). Par exemple, Pié et al. (2007) ont étudié l'effet de régimes comprenant des sources variées de CHO fermentescibles (lactulose, inuline, pulpe de betterave et amidon de blé) sur l'expression des cytokines proinflammatoires dans le TGI du porcelet sevré. Leurs résultats semblent montrer qu'il existe un lien entre l'expression des cytokines et les produits issus des fermentations intestinales, en particulier les acides gras à chaîne ramifiées. Ces acides gras, tels que l'iso-butyrate, le valérate ou l'iso-valérate, sont des indicateurs de la fermentation des protéines.

3. Céréales et fibres alimentaires

Les céréales constituent la fraction prédominante des aliments pour porcs et une source majeure de fibres alimentaires dans leurs régimes. Leur teneur en fibres alimentaires varie de 108 g/kg MS pour le maïs à 138 pour le blé, 221 pour l'orge et 298 pour l'avoine. Chez l'orge, les fibres alimentaires principales sont le β -glucane et les arabino-xylanes, localisés dans les parois cellulaires de l'endosperme et la couche à aleurone du grain.

La teneur en β -glucane varie d'un type de grain à l'autre. Au sein d'un même type de céréales, d'importantes différences de concentration peuvent être observées selon la variété et les conditions environnementales de culture. Les grains d'orges par exemple ont une teneur en β -glucane allant de 2,5 à 11,3 %. Dans l'avoine (2,2 – 7,8 %), dans le seigle (1,2 – 2,0 %) et le blé (0,4 – 1,4 %), ces teneurs varient aussi mais moins que pour l'orge (Izydorczyk et Dexter, 2008).

De même, la structure de l'amidon présent sous forme d'amylopectine ou d'amylose, varie fortement d'une variété à l'autre. La proportion d'amylose qui représente habituellement 25 % de l'amidon total pour l'orge, n'est, dans certaines variétés, que de 3 % (Holtekjølen et al., 2006). L'amylopectine est rapidement digéré, tandis que l'amylose présente des liens glucosidiques qui rendent sa digestion plus lente (Pierce et Stevenson, 2007). La digestibilité de l'amidon des céréales est dépend du rapport amylose/amylopectine.

Certaines études (ex. Hill et al., 2005) ont mis en évidence l'influence du type de céréale sur la composition de la population bactérienne iléale. En outre, les interactions entre fibres solubles, fibres insolubles et l'amidon d'une part et la population bactérienne et la morphologie intestinale d'autre part sont extrêmement complexes et doivent encore être élucidées (Bach Knudsen et al., 2008). On ne sait pas non plus si les différences entre variétés d'une même céréale permettent de moduler ces populations, ni quelles sont les constituants des céréales qui auraient une influence prépondérante sur les populations bactériennes.

4. Influence de la composition en hydrates de carbone de variétés d'orge sur les fermentations intestinales

En vue d'étudier les interactions entre les différents constituants de la fraction hydrocarbonée des céréales et leur influence sur la population bactérienne, nous avons travaillé sur l'orge. Depuis les années 80, les chercheurs du Crop Development Centre de l'Université de la Saskatchewan (Saskatoon, SK, Canada) ont sélectionné un grand nombre de variétés dont des orges nues, ayant les teneurs très contrastées en β -glucane, amylose et fibres alimentaires insolubles.

Seize variétés d'orges normales et nues de composition différente (Tableau 1), après avoir subi une hydrolyse à la pepsine et la pancréatine porcine pour simuler la digestion dans l'estomac et l'intestin grêle, ont été fermentées *in vitro* dans un « gaz test » par des bactéries intestinales de porcs (Bindelle et al., 2007). La vitesse de fermentation de chaque variété a été mesurée à l'aide d'un modèle mathématique ($T/2$ (h), temps requis pour atteindre la moitié de la production finale de gaz ; μ ($100 \times h^{-1}$), taux de dégradation du substrat ; V_f (ml g⁻¹DM), volume final de gaz). Au terme de la fermentation, la production en acides gras à courte chaîne a été déterminée et la composition de la population bactérienne mesurée par Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (TRFLP) (Tableau 2). Ces résultats ont été analysés au moyen d'une analyse multivariée (analyse canonique de redondance ; Ter Braak et Šmilauer, 2002). La composition spécifique en hydrates de carbone (teneurs en amidon, amylose, amylopectine, NSP totaux, NSP soluble NSP insoluble et β -glucane) de chaque variété d'orge a servi de variable explicative dans le modèle multivarié. La digestibilité enzymatique, la production en acides gras à courte chaîne, la cinétique de fermentation et la composition de leur population bactérienne après fermentation de ces variétés ont été introduites dans le modèle comme variables prédites (Pieper et al., soumis).

Tableau 1. Gamme de variation (minimum - maximum) des teneurs en hydrates de carbone (g kg⁻¹ MS) des orges étudiées *in vitro*.

Type de céréale	Orges normales	Orges nues
Nombre de variétés	6	10
Amidon	549 - 598	488 - 604
Amylose	148 - 182	39 - 234
Amylopectine	388 - 431	273 - 486
β -glucane	41 - 59	46 - 127
NSP totaux	118 - 172	77 - 153
NSP insolubles	71 - 123	40 - 89
NSP solubles	14 - 77	23 - 101

Tableau 2. Gamme de variation (minimum - maximum) de la digestibilité *in vitro* de la matière sèche à la pepsine et la pancréatine (IVDMD), cinétiques de fermentation des résidus (T/2, μ , Vf), profils en acides gras à courte chaîne (% de AGCC totaux) et contribution de certains phylotypes bactériens (TRF) à la communauté microbienne (%).

Type de céréale	Orges	
	normales	Orges nues
Nombre de variétés	6	10
Digestion à la pepsine-pancréatine		
IVDMD (%)	59.2 - 73.3	49.7 - 77.5
Cinétique de fermentation		
T/2 (h)	10.2 - 10.8	8.3 - 10.5
μ (100 \times h-1)	7.6 - 9.3	8.1 - 11.3
Vf (ml g-1DM)	167 - 197	188 - 235
Profil en AGCC		
Acétate (%)	55.9 - 57.4	54.4 - 52.5
Propionate (%)	20.3 - 22.1	22.0 - 24.5
Butyrate (%)	14.9 - 16.9	15.1 - 17.2
Profil microbien (TRF) (espèces les plus probables)		
TRF 6- <i>Bacteriodes</i> -like (%)	4.30 - 5.57	2.48 - 10.37
TRF 11- <i>Anaerotruncus colihominis</i> (%)	3.75 - 17.57	7.67 - 16.84
TRF 13- <i>Roseburia faecalis</i> , <i>Clostridium sulfatireducens</i> ; (%)	0 - 4.70	0 - 4.32
TRF 16- <i>Ruminococcus flavefasciens</i> , <i>C. xylanolyticum</i> (%)	5.45 - 11.02	0 - 7.42
TRF 23- <i>C. subterminale</i> , <i>C. butyricum</i> (%)	1.64 - 2.92	1.63 - 3.17

Les deux principaux axes d'ordonnement du modèle obtenu (Figure 1) sont étroitement liés (1) aux teneurs en β -glucane vs. leur teneur en NSP totaux, d'une part, et (2) à la structure de leur amidon (amylose vs. amylopectine), d'autre part. La teneur en β -glucane est corrélée positivement à la vitesse des fermentations, la production d'AGCC et d'acides gras ramifiés. A l'inverse, la proportion d'acétate et de *Ruminococcus flavefasciens* et *Clostridium xylanolyticum* (TRF 16) est positivement corrélée à la teneur en fibre totales et insolubles.

La teneur en amylopectine influence positivement la proportion du propionate dans le ratio molaire des AGCC et l'abondance d'espèces bactériennes apparentées à *Bacteroides/Cytophaga* (TRF 6), mais affecte négativement la production de butyrate. Cette dernière par contre est positivement corrélée à la fermentescibilité du substrat et l'abondance de *Clostridium butyricum* (TRF 23).

On constate qu'il existe une interaction complexe entre la composition en hydrates de carbone au sein d'un même type de grain qui conduit à observer une grande diversité entre variétés dans la composition et l'activité de la population microbienne intestinale, particulièrement entre les variétés d'orges nues (Tableau 2) dont la composition était plus contrastée (Tableau 1). Les différences de composition entre variétés peuvent donc être exploitées pour manipuler la composition de la population bactérienne intestinale.

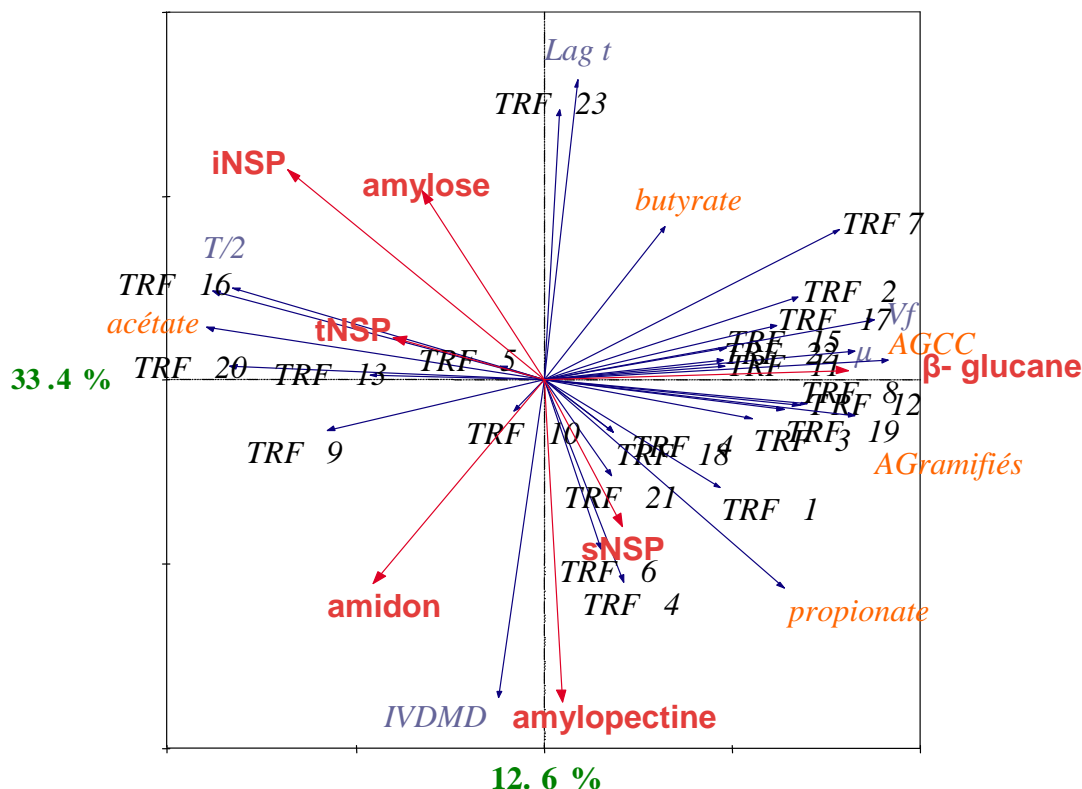


Figure 1. Analyse multivariée sur l'influence de la composition des hydrates de carbone sur la digestion vitro et la fermentation, la production d'AGCC et leurs rapports molaires et les phylotypes bactériens dominants (TRF) de variétés d'orges (Pieper et al., soumis). La longueur et les angles entre les flèches indiquent l'importance de la corrélation entre les variables.

Pour compléter ces résultats, une seconde expérience évaluant *in vivo* le potentiel protecteur des variétés montrant des comportements différents *in vitro* a été élaborée. Un challenge à *Salmonella enterica* serovar *Thyphimurium* (ST) a été réalisé en vue de comparer l'importance de la colonisation et la transmission entre porcs de ST chez 84 porcelets sevrés nourris avec des régimes contenant des variétés d'orges différentes pour évaluer le potentiel protecteur de leurs fibres sur la santé intestinale. Pour ce faire le modèle de challenge à ST décrit ci-après a été appliqué. Quatre rations constituées à partir de 3 variétés d'orges nues (CDC Fibar, CDC McGwire, SB94893) et une orge normale (AC Metcalfe). Ces variétés ont été distribuées à 12 groupes de 7 porcelets (3 groupes par régime). Après 2 semaines d'adaptation aux régimes, 2 porcs par groupe (porcs « troyens ») ont été infectés avec une souche porcine peu virulente de ST, les 5 autres porcs de la loge étant considérés comme des porcs « contacts ». Ce type de challenge a été utilisé pour s'approcher des conditions rencontrées dans les exploitations où tous les porcs d'une même loge ne sont pas infectés. Pendant les 5 jours qui ont suivi l'inoculation, des échantillons de matière fécale ont été collectés sur tous les porcs (« troyens » et « contacts ») et analysés pour la présence de salmonelles, par comptage direct sur milieu de culture. Ensuite, 2 porcs troyens et 2 porcs contacts par groupe ont été abattus et des échantillons de contenu intestinal ainsi que de tissus (foie, rate, ganglions lymphatiques) ont été prélevés et analysés pour la présence de salmonelles.

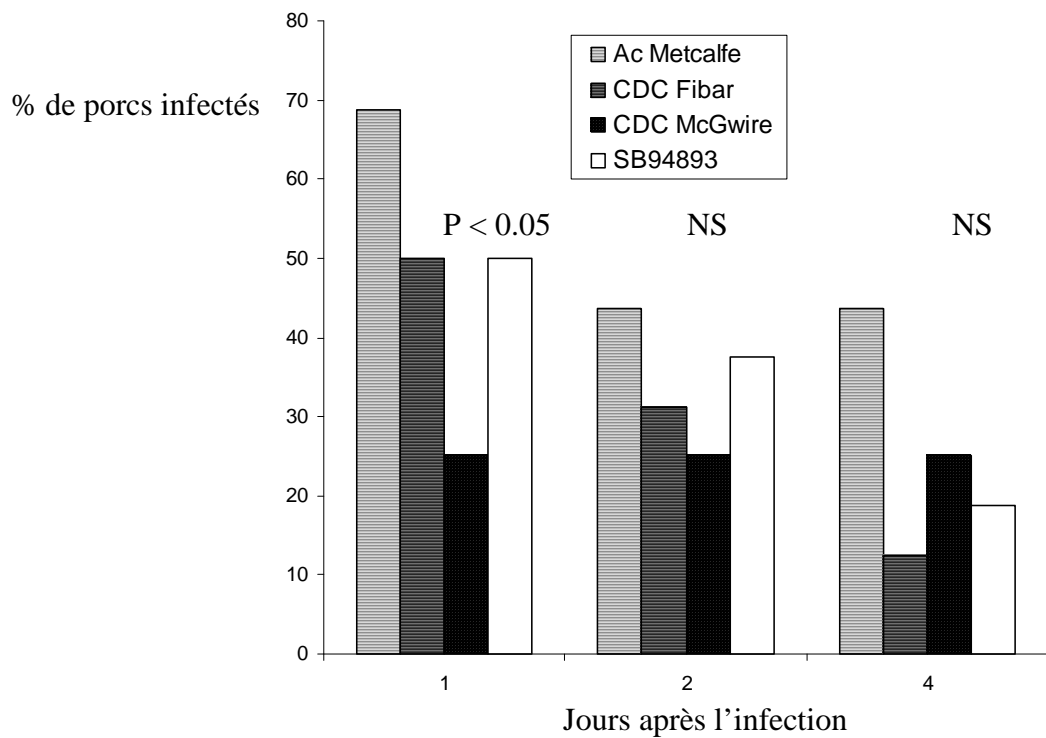


Figure 2. Fréquence de détection de la présence de *Salmonella enterica* serovar *Thyphymurium* dans les fèces des porcs contact nourris avec 4 variétés différentes d'orges : AC Metcalfe (orge normale) et CDC Fibar, CDC McGwire et SB94893 (orges nues) 1, 2 et 4 jours après avoir infecté les porcs troyens (n = 15).

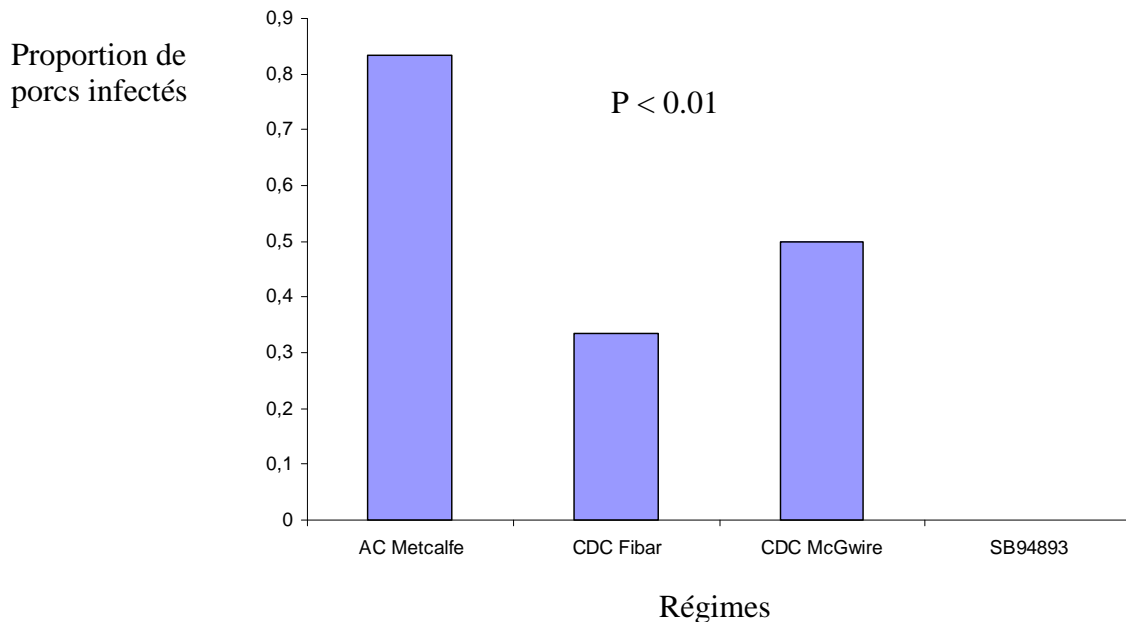


Figure 3. Fréquence de détection de la présence de *Salmonella enterica* serovar *Thyphymurium* 6 jours après l'infection des porcs « troyen » dans le cécum des porcs « contact » nourris avec 4 variétés différentes d'orges : AC Metcalfe (orge normale) et CDC Fibar, CDC McGwire et SB94893 (orges nues) (n = 6).

Chez les porcs troyens, le type de céréale n'a eu aucune influence sur l'excrétion fécale de Salmonelles au cours du temps ou la colonisation du tractus digestif après 6 jours. Tous les porcs se sont avérés positifs. Cependant, à 2 exceptions près, la souche de salmonelles utilisée n'a pas donné lieu à de la translocation du TGI vers d'autres organes, confirmant l'impact modéré de la souche utilisée sur la santé animale. En ce qui concerne les porcs contacts, l'influence du type de grain (orges nues vs. normales) n'a pu être mise en évidence que dans l'excrétion fécale le lendemain de l'inoculation (Figure 2) et dans la présence de salmonelles au niveau du cécum après 6 jours (Figure 3). La variété d'orge normale (AC Metcalfe) a permis une colonisation plus fréquente du TGI que les orges nues.

Conclusions

Il semble donc possible d'influencer la composition de la flore microbienne et l'installation de bactéries pathogènes via un choix des variétés d'orge dans les rations. Si le modèle de challenge retenu a permis de dégager une nette différence de comportement entre les porcs troyens et contacts, les conditions de réalisation et challenge (propreté des loges) et le nombre de répétitions n'ont toutefois pas permis de mettre en évidence des différences entre les variétés d'orges nues. Si on ne peut pas exclure un effet de la composition en CHO des variétés d'orges nues, il conviendra de répéter le challenge avec plus de répétitions en vue de confirmer ou d'infirmier ces effets.

Références citées

- Anderson D.B.2002. Intestinal Microbes: When does normality change into a health and performance insult? Elanco Global Enteritis Symposium - Cambridge, UK - July 9th-11th 2002. Disponible sur Internet, accédé le 5 août 2009 : <http://www.poultry-health.com/fora/inthelth/pdfs/anderson02.pdf>
- Bach Knudsen K.E., Lærke H.N., Hedemann M.S. 2008. The role of fibre in piglet gut health. *In* Taylor-Pickard J.A., Spring P. (Eds.). Gut efficiency; the key ingredient in pig and poultry production. Wageningen Academic Publishers, Pays-Bas. pp. 65-95
- Bindelle J., Buldgen A., Boudry C., Leterme P. 2007. Effect of inoculum and pepsin-pancreatin hydrolysis on fibre fermentation measured by the gas production technique in pigs. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 132: 111-122
- Boudry C., Dehoux J.P., Portetelle D., Buldgen A. 2008. Bovine colostrum as a natural growth promoter for newly weaned piglets: a review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12 : 157-170
- Hill J.E., Hemmingsen S.M., Goldade B.G., Dumonceaux T.J., Klassen J., Zijlstra R.T., Goh S.H., Van Kessel A.G. 2005. Comparison of Ileum Microflora of Pigs Fed Corn-, Wheat-, or Barley-Based Diets by Chaperonin-60 Sequencing and Quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 : 867-875
- Holtekjølén A.K., Uhlen A.K., Bråthen E., Sahlstrøm S., Knutsen S.H. 2006. Contents of starch and non-starch polysaccharides in barley varieties of different origin. *Food Chem.* 94: 348-358
- Izydorczyk M.S., Dexter J.E. 2008. Barley β -glucans and arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products—a Review. *Food Res. International* 41: 850–868

- Jones J.M. 2007. Dietary fibre or whole grains or both? *In* Salovaara H., Gates F., Tenkanen M. (Eds). Dietary fibre components and functions. Wageningen Academic Publishers, Pays-Bas. pp. 13-30.
- Leser T.D., Amenuvor J.Z., Jensen T.K., Lindecrona R.H., Boye M., Møller K. 2002. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 : 673-690
- Li S., Sauer W.C., Huang S.X., Gabert V.M. 1996. Effect of beta-glucanase supplementation to hullless barley- or wheat-soybean meal diets on the digestibilities of energy, protein, beta-glucans, and amino acids in young pigs. *J. Anim. Sci.* 74: 1649-1656
- Pié S., Awati A., Vida S., Falluel I, Williams B.A., Oswald I.P. 2007. Effects of added fermentable carbohydrates in the diet on intestinal proinflammatory cytokine-specific mRNA content in weaning piglets. *J. Anim. Sci.* 85 : 673-683
- Pieper R., Bindelle J., Rossnagel B., Van Kessel A., Leterme P., soumis pour publication. Effect of carbohydrate composition in barley and oat cultivars on microbial ecophysiology and the proliferation of *Salmonella enterica* in an in vitro model of the porcine gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Pierce J., Stevenson Z. 2008. Nutrition and gut microbiology: redirecting nutrients from the microbes to the host animal with SSF. *In* Taylor-Pickard J.A., Spring P. (Eds.). Gut efficiency; the key ingredient in pig and poultry production. Wageningen Academic Publishers, Pays-Bas. pp. 167-182
- Pluske J.R. 2008. Gut development : interactions between nutrition, gut health and immunity in young pigs. *In* Taylor-Pickard J.A., Spring P. (Eds.). Gut efficiency; the key ingredient in pig and poultry production. Wageningen Academic Publishers, Pays-Bas. pp. 39-56
- Ter Braak, C.J.F., Šmilauer, P., 2002. CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: software for canonical community ordination (version 4.5). Microcomputer Power, Ithaca.
- Urubschurov V., Janczyk P., Pieper R., Souffrant W.B. 2008. Biological diversity of yeasts in the gastrointestinal tract of weaned piglets kept under different farm conditions. *FEMS Yeast Research.* 8: 1349-1356
- Willing B. P., Van Kessel A. G. 2010. Host pathways for recognition: establishing gastrointestinal microbiota as relevant in animal health and nutrition. *Livest. Sci.* in press