

Effet d'un complexe carbohydrases sur la microflore intestinale du porc

Joseane DOS SANTOS (1), Ignacio BADIOLA (1), David TORRALLARDONA (2), Pierre-André GERAERT (3), Estelle DEVILLARD (3)

(1) CRESA, Campus de Bellaterra, 08193 Barcelone, Espagne

(2) IRTA, Centre de Mas de Bover, 43120 Constanti, Espagne

(3) ADISSEO France SAS, 42 Avenue Aristide Briand, 92160 Antony, France

Estelle.Devillard@adisseo.com

Effect of a carbohydrase cocktail on pig intestinal microflora

Exogenous enzymes are added to animal diets to improve feed digestibility. These enzymes modify substrates reaching the different parts of the gastrointestinal tract and thus could have a similar effect to that of prebiotics on intestinal microflora. The aim of our study is to investigate the links between diet composition and enzyme supplementation and their effects on intestinal microflora. Thirty-six pigs (body weight ~ 25 kg) were distributed in 4 treatments and fed for 28 days diets containing high or low level of non-starch polysaccharides (wheat-barley-rye or corn), supplemented or not with a carbohydrase cocktail. At the end of the experimental period, digestive contents (ileum and caecum) and mucosal fractions were sampled. Microbial diversity and bacterial profiles were analysed in the different samples by using molecular techniques. Microbial diversity was modified by the diet and by the enzyme supplementation at the ileal level as well as caecal level. Analysis of bacterial profiles showed that diet influences the composition of the bacterial communities. The profiles were also modified by enzyme supplementation. Further analyses will allow to identify which bacterial species are inhibited or enhanced by enzyme supplementation and thus will allow to specify the effects of enzymes on intestinal microflora.

INTRODUCTION

Les enzymes exogènes de type carbohydrases, utilisées en alimentation animale pour améliorer les performances zootechniques, hydrolysent les polysaccharides non amyliques (PNA) des substrats alimentaires (Bedford et Schulze, 1998). Les nutriments libérés des matières premières pourraient alors jouer un rôle « prébiotique » pour la microflore digestive. Puisque plus de 80% des bactéries colonisant le tractus digestif de porcs ne sont pas cultivables (Castillo et al., 2007), nous avons choisi une approche moléculaire, basée sur la PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism) pour étudier l'effet de l'addition d'enzymes sur la microflore intestinale, en fonction de la nature de la matière première ingérée.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Animaux, alimentation et performances

36 porcs en croissance (Landrace x Pietrain) ont été distribués selon leur poids vif (22 à 26 kg) en 4 traitements de 9 répétitions : régimes riches ou pauvres en PNA, respectivement régime blé-orge-seigle (BOS, 24,8 % blé, 24,8 % orge, 22,9 % seigle) et régime maïs (M, 71,5 % maïs), supplémentés ou non avec une

préparation enzymatique (Rovabio™ Excel, Adisseo, France). Les 4 groupes étaient référencés ainsi : régime T1 (régime M, sans enzyme), régime T2 (régime M, avec enzyme), régime T3 (régime BOS, sans enzyme) et régime T4 (régime BOS, avec enzyme). La consommation et les poids vifs ont été mesurés tous les 3 jours, pendant 28 jours. Les statistiques ont été réalisées par des analyses ANOVA (SAS package).

1.2. Prélèvements

Après 28 jours d'expérimentation, les 36 animaux ont été euthanasiés et leurs contenus iléaux et caecaux ont été prélevés. Pour chaque contenu, 1 ml d'échantillon a été prélevé et ajouté à 3 ml d'éthanol, puis stockés à 4°C. Des échantillons de muqueuses iléales et caecales ont été prélevés (environ 4 cm), lavés dans une solution saline stérile, puis raclés à l'aide d'une spatule. 250 à 500 mg de cellules ont été congelés rapidement dans de l'azote liquide et stockés à -80°C.

1.3. Analyses de populations bactériennes

L'ADN des bactéries des contenus digestifs ou associées aux muqueuses a été extrait et purifié en utilisant les kits QIAmp (Qiagen, West Sussex, UK). Un fragment de 580 paires de bases

de l'ADNr 16S a été amplifié, selon la méthode décrite par Lane (1991). Après restrictions enzymatiques (5 enzymes), les fragments d'ADN ont été séparés par électrophorèse, et la taille et l'intensité de chaque bande ont été analysées grâce au software GENE TOOLS (Syngene, Cambridge, UK). Le degré de diversité microbienne a été estimé par le nombre total de bandes obtenues avec les 5 restrictions enzymatiques. La taille et l'intensité des bandes ont permis de construire des matrices de similarité et des dendrogrammes.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Quelque soit le régime de base, le poids vif final n'était pas différent entre les lots témoins et les lots traités avec les enzymes. Le gain moyen quotidien a été significativement amélioré par la supplémentation en enzymes quand les animaux étaient nourris avec le régime BOS (T3 *versus* T4). La supplémentation en enzymes n'a pas modifié la consommation des animaux rece-

vant le régime M, alors qu'elle était augmentée (de 1,256 à 1,429 kg/j) pour les animaux recevant le régime BOS. Une diminution numérique de l'indice de consommation (- 7,7 %) était observée lorsque les animaux recevant le régime BOS étaient supplémentés avec les enzymes (T3 *versus* T4).

La diversité bactérienne des digesta était différente entre les régimes M et BOS non supplémentés (T1 *versus* T3) (Figure 1A), traduisant la différence de substrats disponibles pour le développement de la microflore, apportés par ces régimes. La supplémentation du régime M avec des enzymes a globalement peu modifié le degré de diversité des digesta et des muqueuses (T1 *versus* T2) (Figures 1A et 1B). La diversité bactérienne a par contre été augmentée significativement par la supplémentation en enzymes du régime BOS, et ceci quelque soit l'échantillon considéré (T3 *versus* T4) (Figures 1A et 1B). Dans les régimes de type BOS, la quantité de PNA étant plus importante que dans les régimes M, l'action des

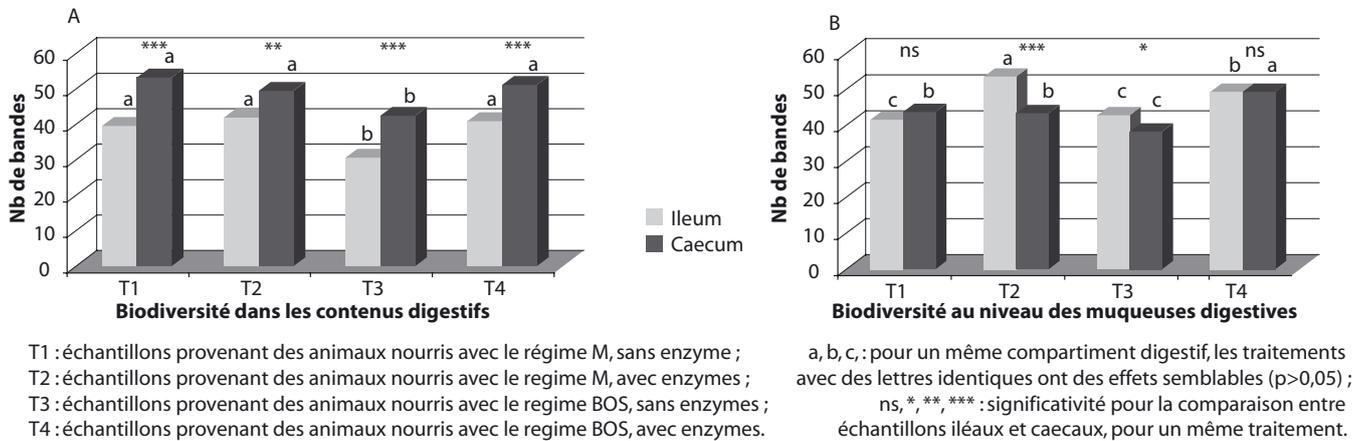


Figure 1 - Diversités iléale et caecale des contenus digestifs (A) et des muqueuses digestives (B)

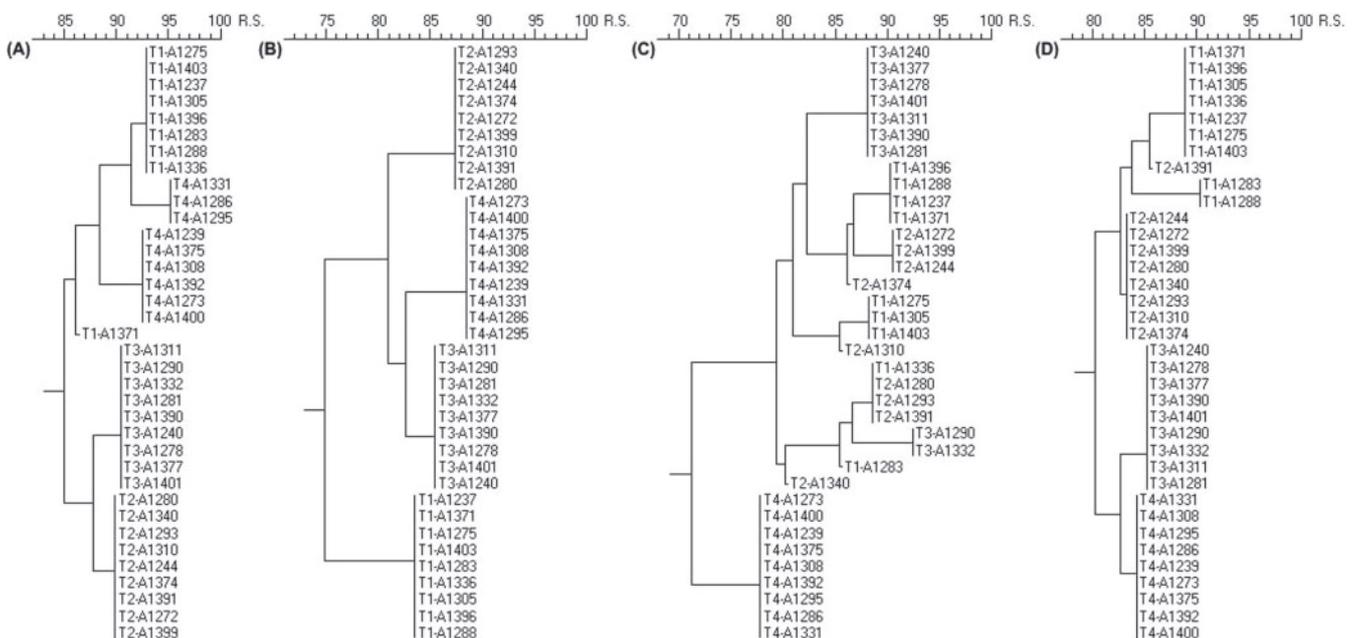


Figure 2 - Dendrogrammes de similarité entre les profils bactériens obtenus par RPLP pour les échantillons de muqueuses iléales (A), de muqueuses caecales (B), de contenus iléaux (C) et de contenus caeaux (D)

enzymes exogènes se traduit par une libération plus importante de substrats disponibles pour le développement de la microflore.

Les effets du régime de base sur les profils bactériens sont très clairement mis en évidence sur tous les types d'échantillons traités. Une séparation très nette des régimes T1 et T3 apparaît en effet sur les différents dendrogrammes (Figure 2). Cet effet régime est à mettre en relation avec les substrats disponibles pour le développement de la microflore. L'addition d'enzymes dans le régime BOS (T4 *versus* T3) modifie la composition de la flore intestinale aussi bien au niveau caecal qu'iléal, et au niveau des contenus digestifs comme des muqueuses (Figure 2). La supplémentation en enzymes du régime M

conduit également à une modification de la flore (T1 *versus* T2), particulièrement visible sur les échantillons provenant des muqueuses (Figures 3A et 3B).

CONCLUSION

Nos résultats montrent clairement que la microflore est modifiée par l'apport d'enzymes, et que ces modifications sont d'autant plus importantes que le régime est riche en PNA. Ces résultats sont à rapprocher des observations faites sur les modifications de la microflore digestive de poulets (Bedford et Apajalahti, 2001). Des analyses complémentaires permettront de mettre en évidence quelles sont les espèces bactériennes stimulées ou inhibées par la supplémentation en enzymes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bedford M.R., Apajalahti J.H., 2001. Microbial interactions in the response to exogenous enzymes utilisation. In : M.R. Bedford and G.G. Partridge (Eds), *Enzymes in farm animal nutrition*, 299-314. CAB International, New York, USA.
- Bedford M.R., Schulze H., 1998. Exogenous enzyme for pigs and poultry. *Nutr. Res. Rev.*, 11, 480-488.
- Castillo M., Skene G., Roca M., Anguita M., Badiola I., Duncan S.H., Flint H.J., 2007. Application of 16S rRNA gene-targeted fluorescence *in situ* hybridization and restriction fragment length polymorphism to study porcine microbiota along the gastrointestinal tract in response to different sources of dietary fibre. *FEMS Microbiol Ecol.*, 59, 138-146.
- Lane D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In : E. Stackebrandt and M. Goodfellow (Eds), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, 115-175. John Wiley and sons, New York, USA.

