

Le microbiote du porcelet au sevrage : influence de l'environnement d'élevage, et corrélations avec la robustesse

Elodie MERLOT (1), Mathilde LE SCIELLOUR (1), Diana LUISE (2), Arnaud BUCHET (3), Rémi RESMOND (1),
Charlène CLEMENT (1), Olivier ZEMB (4), Catherine BELLOC (5)

(1) PEGASE, INRAE, AGROCAMPUS OUEST, 35590, Saint Gilles, France

(2) Agricultural, Environmental, Food Science and Technology, DISTAL, University of Bologna, Italy

(3) Cooperl Innovation, Lamballe, France

(4) GenPhySE, INRAE, Toulouse, France

(5) BIOEPAR, INRAE, ONIRIS, Nantes, France

Elodie.Merlot@inrae.fr

Avec la collaboration des 16 éleveurs ayant participé à l'étude, Françoise Thomas, Michel Lefebvre et Gildas Martin (PEGASE, INRAE), Milly Leblanc-Maridor et Jean-Yves Audiard (BIOEPAR), Marie-Noëlle Rossignol et Deborah Jardet (@BRIDGE, INRAE).

Le microbiote du porcelet au sevrage : influence de l'environnement d'élevage, et corrélations avec la robustesse

Cette étude décrit la variabilité entre élevages de l'évolution du microbiote au moment du sevrage, et évalue la relation entre cette dernière et la robustesse des porcelets. Des échantillons fécaux et des enregistrements de croissance ont été collectés juste avant et sept jours après le sevrage pour 288 porcelets issus de 16 élevages commerciaux, caractérisés pour leur statut sanitaire et leur usage d'antibiotiques. Nous avons observé dans toutes les fermes la présence de quatre entérotypes bactériens (E1 à E4), différant notamment par leur abondance de *Prevotella*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, et *Lachnospira*, et correspondant à des stades de maturation graduelle pré- vers post-sevrage de la flore. Après le sevrage, des 1 177 unités taxonomiques (OTU) contenues dans le jeu de données, 462 et 340 voyaient leur abondance respectivement influencée par l'utilisation d'antibiotiques et par le statut sanitaire de l'élevage. Les animaux ont ensuite été classés selon leur gain de poids relatif (GMQr) calculé entre 26 et 48 jours d'âge. Les porcelets à haut GMQr avaient moins d'*Oscillospira* ($P < 0,05$) et *Campylobacter* ($P < 0,01$), et plus de *Prevotella* ($P < 0,01$), *Coprococcus* ($P < 0,01$) et *Lachnospira* ($P < 0,05$) après le sevrage, ce qui s'apparentait à l'entérotipe E4. Ainsi, en utilisant des animaux provenant de 16 fermes, nous avons pu identifier quatre entérotypes maturationnels ubiquitaires, et supposé que les porcelets ayant atteint l'entérotipe E4 juste après le sevrage pourraient être plus robustes. Hormis l'usage d'antibiotiques, le statut sanitaire global de l'élevage a une influence importante sur l'évolution précoce du microbiote après le sevrage.

Microbiota of piglets at weaning: influence of rearing environment and correlations with robustness

This study describes variability among farms of the response of microbiota to weaning and evaluates its relation to the robustness of piglets. Faecal samples and growth data were collected just before and seven days after weaning in 288 piglets from 16 commercial farms characterised by their pathogenic status and antimicrobial use. We observed in all farms the presence of four bacterial enterotypes (E1 to E4), differing notably in their abundance of *Prevotella*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, and *Lachnospira*, and corresponding to a gradual maturational shift from pre- to post-weaning microbiota. After weaning, of the 1 177 operational taxonomic units (OTU) contained in the dataset, 462 and 340 had their abundance affected ($P < 0.05$) by the use of antimicrobials and by the health status of the herd, respectively. Animals were then classified according to their relative average daily gain (rADG) from 26 to 48 days of age. The high rADG piglets had less *Oscillospira* ($P < 0.05$) and *Campylobacter* ($P < 0.01$), and more *Prevotella* ($P < 0.01$), *Coprococcus* ($P < 0.01$) and *Lachnospira* ($P < 0.05$) after weaning, which resembled the E4 enterotype. Thus, using animals from 16 farms, we identified four ubiquitous maturation enterotypes and found that piglets that reached enterotype E4 just after weaning might be more robust. Besides antimicrobial use, the general health status of the farm has a strong influence on the early post-weaning evolution of piglet microbiota.

INTRODUCTION

Malgré une réduction spectaculaire de la fréquence et des volumes d'antibiotiques utilisés ces 8 dernières années, une très large majorité des élevages français en demeure utilisatrice pour éviter les diarrhées de post-sevrage (Hémonic *et al.*, 2019). La bonne santé du porcelet pendant les semaines qui suivent le sevrage dépend notamment de l'adaptation rapide de son microbiote digestif au nouveau régime alimentaire. Les traits principaux de cette transition microbienne ont été largement décrits ces dernières années (Mach *et al.*, 2015), mais le rôle joué par l'environnement d'élevage sur la variabilité de cette transition est encore méconnu.

L'objectif de cette étude était de déterminer si la réponse du microbiote au sevrage est influencée par des facteurs environnementaux comme le statut sanitaire de l'élevage et l'utilisation d'antibiotiques, et si certaines de ses caractéristiques peuvent être associées à la robustesse du porcelet après le sevrage. Le microbiote fécal de 288 porcelets issus de 16 élevages commerciaux a été étudié la veille et cinq jours après le sevrage par séquençage du gène de l'ARN 16S microbien. Le GMQ réalisé pendant les trois premières semaines de post-sevrage rapporté au poids de sevrage a été utilisé comme proxy de la robustesse.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Elevages et animaux

Seize élevages du réseau COOPERL ont été sélectionnés de façon à être homogènes en taille (100 truies minimum), génétique (porcs Piétrain x [Large White x Landrace]), et âge de sevrage (27 ± 2 jours), mais divers pour leur GMQ moyen en post-sevrage et leur statut sanitaire (Tableau 1). Les aliments sous la mère et 1^{er} âge distribués étaient divers mais conventionnels. Dans chaque élevage, 18 mâles entiers issus de neuf portées ont été sélectionnés (288 porcelets au total). Les élevages ont été visités juste avant, 7 et 21 jours après le sevrage, soit lorsque les porcs étaient âgés de 26 (j26), 35 (j35) et 48 (j48) ± 2 jours.

La présence de cinq pathogènes majeurs a été établie grâce au bilan sanitaire d'élevage rempli par le vétérinaire de chaque élevage (basé sur des sérologies et les expressions cliniques) et

par des sérologies réalisées à j48 sur tous les porcelets : *Actinobacillus pleuropneumoniae*, la grippe, le Syndrome Disgénétique et Respiratoire du Porc (SDRP), *Lawsonia intracellularis* et *Streptococcus suis*. En sommant la présence (+1) ou non (+0) de ces cinq pathogènes, huit élevages obtenaient un score inférieur ou égal à deux (statut favorable, SAN+), et huit un score strictement supérieur à deux (statut dégradé, SAN-, Tableau 1). Tous étaient porteurs du circovirus porcin de type 2.

Les traitements individuels et collectifs ont été enregistrés par les éleveurs au moyen de grilles, stylos électroniques et smartphones mis à disposition par la société ZOETIS. Aucun porcelet n'a reçu de traitement avant le sevrage. Pendant la 1^{ère} semaine de post-sevrage, huit élevages se sont passés d'antibiotiques (AB-) et huit ont administré un traitement collectif (AB+) via l'eau de boisson, une injection intramusculaire ou un aliment médicamenteux (un, un et six élevages respectivement).

1.2. Mesures, prélèvements et analyses de laboratoire

Les porcelets ont été pesés à chacune des trois visites, et le GMQ relatif a été calculé comme suit :

$GMQr = (\text{poids à j48} - \text{poids à j26}) / (N * \text{poids à j26})$, N étant le nombre de jours exact entre ces deux visites.

Le GMQ en post-sevrage est fortement associé au poids de sevrage, et résulte donc de l'histoire de vie de l'animal depuis sa conception. En revanche, comme discuté ailleurs (Buchet *et al.*, 2018), le GMQr permet d'exprimer la performance de croissance de l'animal rapportée au potentiel de croissance dont il dispose au jour du sevrage (son poids), et reflète donc la robustesse du porcelet en réponse à l'événement « sevrage » plus spécifiquement. Les 40% inférieurs et les 40% supérieurs de la distribution des GMQr au sein de chaque élevage ont été affectés aux classes de GMQr- et GMQr+, respectivement, résultant en environ sept porcelets par classe et par élevage. Ainsi, pour l'analyse des effets du GMQr, les 20% de porcelets médians n'ont pas été utilisés.

Les fèces ont été collectés dans des tubes stériles aux deux premières visites, conservés sur la glace puis à -80°C dès l'arrivée au laboratoire. Les prélèvements manquent à j26 dans l'élevage 13 et à j35 dans le 8. L'ADN bactérien a été extrait avec le kit chemagic STAR DNA BTS Kit (PerkinElmer chemagen Technology, Courtaboeuf, France).

Tableau 1 – Caractéristiques des élevages inclus dans l'étude

Elevage	Maladies présentes	Statut sanitaire	Antibiotiques après le sevrage ¹	Poids de sevrage (kg) ²	GMQ j26-j48 (g/j) ²	GMQr (g/kg/j) ²
Elevage 1	<i>Actino, Infl, PRRSV</i>	SAN-	linco + spect	8,2 \pm 0,4	265 \pm 17	32 \pm 2
Elevage 2	<i>Actino, Infl, PRRSV, Law</i>	SAN-	AB-	6,7 \pm 0,4	208 \pm 20	30 \pm 3
Elevage 3	<i>Actino, infl, PRRSV</i>	SAN-	AB-	7,4 \pm 0,4	285 \pm 17	38 \pm 2
Elevage 4	<i>Actino, Infl, PRRSV, Strepto</i>	SAN-	colistin + doxy	8,6 \pm 0,3	295 \pm 29	35 \pm 4
Elevage 5	<i>Actino, PRRSV</i>	SAN+	AB-	7,1 \pm 0,4	295 \pm 17	42 \pm 2
Elevage 6	<i>Actino, Law</i>	SAN+	AB-	7,9 \pm 0,4	221 \pm 22	29 \pm 3
Elevage 7	<i>Law, Strepto</i>	SAN+	AB-	8,5 \pm 0,2	232 \pm 22	27 \pm 2
Elevage 8	<i>Infl</i>	SAN+	colistin	8,8 \pm 0,2	357 \pm 15	40 \pm 1
Elevage 9	<i>Actino, Infl, Law</i>	SAN-	AB-	7,7 \pm 0,3	316 \pm 15	42 \pm 2
Elevage 10	<i>Actino, PRRSV, Law</i>	SAN-	AB-	8,3 \pm 0,3	315 \pm 22	38 \pm 3
Elevage 11	<i>Actino, Infl, PRRSV, Strepto</i>	SAN-	AB-	8,6 \pm 0,4	337 \pm 24	40 \pm 2
Elevage 12	<i>Actino, PRRSV, Strepto</i>	SAN-	colistin + amoxi	8,0 \pm 0,3	311 \pm 11	40 \pm 2
Elevage 13	<i>Actino</i>	SAN+	tulathromycine	8,3 \pm 0,3	445 \pm 28	53 \pm 2
Elevage 14	<i>Infl</i>	SAN+	colistin + doxy	8,7 \pm 0,3	430 \pm 24	49 \pm 2
Elevage 15	<i>Law</i>	SAN+	apra + sulfa + trimétho	9,1 \pm 0,4	352 \pm 25	39 \pm 2
Elevage 16	<i>Law</i>	SAN+	colistin + doxy	9,1 \pm 0,4	385 \pm 18	43 \pm 2

¹Linco : lincomycine, spect : spectinomycine, doxy : doxycycline, amoxi : amoxicilline, apra : apramycine, trimétho : triméthoprime, sulfa : sulfadiazine, AB- : pas de traitement antibiotique entre le sevrage et j35. ²Les performances indiquées sont celles mesurées sur les 288 animaux de l'étude.

La qualité et la pureté de l'ADN ont été contrôlées par spectrophotométrie avec un NanoDrop (Fisher Scientific, Schwerte, Germany). Les régions hypervariables V3 et V4 du gène codant pour l'ARN 16S ont été amplifiées par PCR et séquencées avec le système MiSeq (Illumina Inc., San Diego, Ca, USA) sur la plateforme @BRIDGE (INRA, Jouy-en-Josas).

1.3. Analyses bioinformatiques

Les séquences générées ont été analysées grâce au logiciel QIIME (v1.9.1), en utilisant les paramètres par défaut. Les séquences ont été regroupées par OTU (operating taxonomic units) à partir d'un seuil de similarité de 97%. Seules les OTU de phylum et de classe connus, présentes dans au moins cinq échantillons, et avec une abondance relative moyenne sur l'ensemble des échantillons supérieure à 0,01% ont été conservées. Le jeu de données final contenait les résultats pour 1 177 OTUs de 222 échantillons à j26 et 254 échantillons à j35, dont 196 porcelets avec des données pour les deux dates. A j35, le jeu de données contenait 121 porcs AB+ et 133 porcs AB-.

1.4. Analyses statistiques

Deux indices de diversité α , c'est-à-dire la richesse observée (le nombre d'espèces dans un échantillon) et l'index de Shannon (représentant la diversité au sein d'un échantillon en tenant compte des abondances relatives des espèces) ont été calculés avec le paquet phyloseq du logiciel R (R core team, 2019). Les indices de diversité, le poids, le GMQ et le GMQr ont été analysés avec les paquets lmer et car de R dans un 1^{er} modèle testant l'influence de l'élevage en interaction avec l'âge et le porcelet en effet aléatoire, puis dans un second modèle testant simultanément les effets de l'administration d'antibiotiques, du statut sanitaire de l'élevage et de la classe de GMQr en effets simples. Ces effets ont également été testés en interaction avec l'âge pour les données de diversité α et de poids. L'unité expérimentale était le porcelet.

La diversité β a été évaluée par calcul de la matrice des distances UniFrac, avec le paquet vegan de R. Hormis pour l'effet élevage, les facteurs testés n'avaient pas d'effet sur l'homogénéité de la dispersion (testée avec la fonction beta disper), et une analyse de variance par permutations a été effectuée (procédure Adonis, 999 permutations).

L'effet des facteurs étudiés sur l'abondance relative des OTU a été testé à l'aide du paquet EdgeR. La significativité des effets des facteurs à deux niveaux sur les log de base 2 du taux d'accroissement (LogFC) a été corrigée par la probabilité de faux positif (FDR). A l'échelle des familles et des genres (abondances relatives calculées sur les données non raréfiées), l'influence des facteurs à deux niveaux a été testée par un test de Wilcoxon et celle des facteurs à plus de deux niveaux par des tests de Kruskal-Wallis et de Dunn.

Tous ces tests étaient assortis d'une correction de Benjamini-Hocheberg. L'interaction des facteurs « statut sanitaire » et « classe de GMQr » avec le temps a été testée par une analyse de variance par permutations (paquet LmPerm).

La méthodologie d'Arumugam *et al.* (2011), précédemment décrite chez l'Humain, a été utilisée pour regrouper sur la base de l'abondance relative des genres bactériens présents des échantillons présentant une composition microbienne similaire (des « entérotypes »).

2. RESULTATS

2.1. Résultats zootechniques

Par construction, le GMQ et le GMQr calculés sur les 3 semaines après le sevrage étaient très variables entre les élevages ($P < 0,001$). La valeur de ces deux variables était plus élevée dans le groupe AB+ ($P < 0,001$). Les porcs élevés dans les élevages SAN+ étaient plus lourds au sevrage ($8,5$ vs. $8,0 \pm 0,2$ kg, $P < 0,05$), avaient un GMQ plus élevé (362 vs. 332 ± 11 g/jour, $P < 0,001$), mais un GMQr comparable (38 ± 1 g/kg/jour, $P > 0,1$).

2.2. Influence du sevrage sur le microbiote

Quel que soit l'âge, les phyla *Firmicutes* (63% du nombre total de séquences amplifiées) et *Bacteroidetes* (29%) étaient les plus représentés, suivis des *Proteobacteria* (5,2%), des *Spirochaetes* (1,7%) et des *Fusobacteria* (1,3%). Au sein de ces phyla, les OTUs du jeu de données appartenaient à 33 familles connues, subdivisées elles-mêmes en 45 genres connus.

L'effet du sevrage, c'est-à-dire la différence entre les prélèvements réalisés juste avant (j26) et sept jours (j35) après le sevrage, a été très net, avec une augmentation de la diversité α (observée : 388 à j26 vs. 432 à j35, $P < 0,001$; indice de Shannon : 4,34 vs. 4,50, $P < 0,001$), et une variation du LogFC de 950 OTU parmi les 1 177 que contenait le jeu de données (Tableau 2). A l'échelle phylogénique de la famille, cela a induit une diminution de l'abondance relative de 16 familles ($P < 0,05$), et l'augmentation de celle de 8 autres ($P < 0,05$) après le sevrage. Parmi les familles les plus abondantes, les *Bacteroidaceae* (surtout représentés par le genre *Bacteroides*) ont diminué de 61%, les *Christencellaceae* de 35%, les *Enterobacteriaceae* de 42% et les *Clostridiaceae* de 32% ($P < 0,001$). Les *Prevotellaceae* (surtout représentées par le genre *Prevotella*) ont augmenté de 143% ($P < 0,001$). Les *Lachnospiraceae* ont augmenté de 21% ($P < 0,001$), en particulier les genres *Blautia*, *Lachnospira* et *Roseburia* (Tableau 3). L'abondance globale des *Ruminococcaceae* était stable, mais au sein de cette famille, le genre *Faecalibacterium* a augmenté de 116% ($P < 0,001$), tandis que le genre *Oscillospira* a décliné de 14% ($P < 0,05$).

Tableau 2 – Nombre d'OTU dont l'abondance a été influencée par les facteurs âge, antibiotique, statut sanitaire et GMQr.

Effet de l'âge		Effet des antibiotiques		Effet du statut sanitaire		Effet de la classe de GMQr			
j26+j35 (n=196)		j35 (n=254)		j26 (n=223)	j35 (n=255)	j26 (n=167)	j35 (n=195)		
j35 > j26	436	AB+ > AB-	214	H+ > H-	333	137	GMQr- > +	165	217
j35 < j26	514	AB+ > AB-	248	H+ > H-	103	203	GMQr- < +	150	244
1 177 OTU au total dans le jeu de données									

2.3. Détermination d'entérotypes

Les 476 échantillons (j26 + j35) étudiés ont pu être clustérisés en quatre entérotypes (Figure 1A), pour lesquels les genres

Prevotella, *Faecalibacterium*, *Roseburia* et *Lachnospira* présentaient les P-values les plus discriminantes ($P < 0,001$, Tableau 3). Les entérotypes E1 et E2 avaient de plus faibles abondances relatives pour ces 4 genres en comparaison des

entérotypes E3 et E4, les E4 présentant les abondances les plus élevées. La diversité α (observée et indice de Shannon) augmentait graduellement de E1 à E3, et redescendait au niveau de E2 pour l'entérotipe E4. Entre les deux âges, la plupart des porcelets sont passés d'un entérotipe à un autre, avec une tendance majoritaire pour un changement vers un entérotipe de rang plus élevé, suggérant une maturation graduelle de E1 vers E2, puis vers E3 et E4 (Figure 1B). Les quatre entérotypes étaient présents à au moins un des deux âges dans 15 des 16 élevages (Figure 1C).

2.4. Influence de l'environnement sur le microbiote

L'effet du sevrage sur l'évolution de l'abondance relative des principales familles et l'augmentation de la diversité α était globalement le même dans tous les élevages. Néanmoins, à j26, la diversité observée variait selon les élevages ($P < 0,05$), qui différaient pour l'abondance des *Christencellaceae* ainsi que de cinq autres familles moins abondantes, dont les *Lactobacillus* ($P < 0,05$). A j35, les différences entre élevages s'étaient accrues : les abondances relatives de 21 familles étaient affectées par l'effet élevage ($P < 0,05$). De nombreux genres différemment exprimés dans les entérotypes l'étaient aussi entre les élevages (Tableau 3), ce qui a conduit à des proportions de chacun des quatre entérotypes différentes d'un élevage à l'autre ($P < 0,05$; Figure 1C).

Pour tenter d'expliquer cette variabilité, l'influence de l'utilisation d'antibiotiques dans les élevages a été étudiée. Toutes molécules confondues, cette utilisation a modifié la structure globale des populations microbiennes fécales en comparaison des porcs AB- (test Adonis sur la diversité β , $P < 0,01$). Elle n'a pas eu d'influence sur la diversité α ni sur la distribution des individus parmi les entérotypes. Les OTU affectées (Tableau 2) étant réparties dans de nombreuses familles, les abondances relatives sommées à l'échelle des familles ou des genres étaient peu modifiées : seules les familles *Helicobacteraceae* et *Succinivibrionaceae* avaient leur abondance diminuée à j35 par l'usage d'antibiotiques ($P < 0,05$).

Le statut sanitaire global des élevages a également influencé la structure globale des populations microbiennes fécales (test Adonis sur la diversité β : $R^2 = 0,03$, $P < 0,05$). Il n'a pas eu d'effet sur les indices de diversité α ni sur la distribution des individus parmi les entérotypes. Néanmoins, à j26, 436 OTU étaient différemment exprimées entre les élevages SAN+ et SAN-. Ce chiffre baissait à 340 OTU à j35 (Tableau 2), et 152 de ces OTU étaient communes aux deux âges. A l'échelle de la famille, tous âges confondus, les porcelets SAN- tendaient à avoir plus de *Paludibacter* ($P < 0,1$, Figure 2A). En comparaison des SAN+, la réponse des porcs SAN- au sevrage se caractérisait par une plus forte baisse des *Oscillospira* ($P < 0,05$) et une augmentation moins nette des *Lachnospira* ($P < 0,1$). A j35, les SAN- avaient plus d'*Helicobacteraceae* et de *Succinivibrionaceae* ($P < 0,05$).

2.5. Relation entre le microbiote et la croissance

La comparaison des classes GMQr+ et GMQr- indique une diversité observée similaire dans les deux classes, et un indice de Shannon tendant à être plus bas chez les GMQr- ($P < 0,1$).

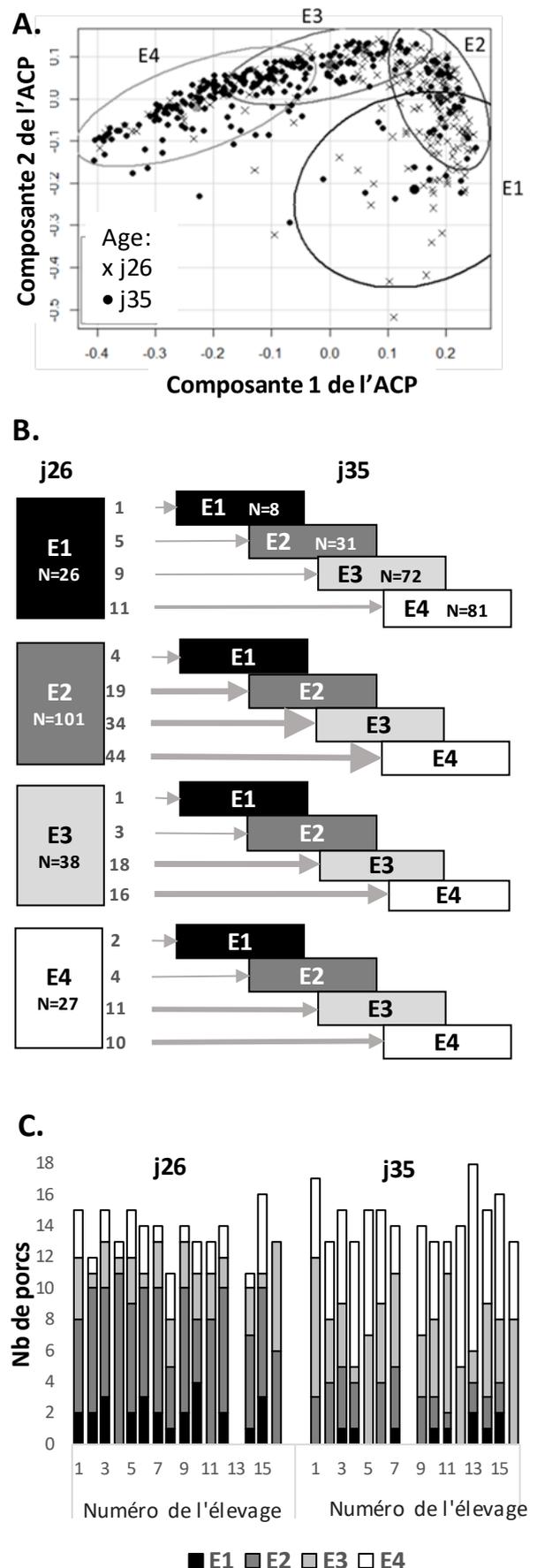


Figure 1 – Représentation des entérotypes E1 à E4 sur les deux premiers axes de l'analyse en composante principale (ACP) (A), effectifs passant d'un entérotipe à l'autre entre j26 et j35 (B), et distribution des entérotypes au sein des 16 fermes (C).

Tableau 3 – Abondances relatives (en %) de quelques genres bactériens selon l'entérotypage, l'âge et l'élevage

Abondance relative, %	Entérotypage ¹					Age			Elevage	
	E1	E2	E3	E4	P ²	j26	j35	P ²	P à j26 ²	P à j35 ²
<i>Prevotella</i>	3,87 ^a	1,32 ^a	11,29 ^b	31,4 ^c	***	7,82	18,98	***	NS	NS
<i>Faecalibacterium</i>	0,35 ^a	0,24 ^a	2,41 ^b	11,08 ^c	***	2,64	5,72	***	*	NS
<i>Roseburia</i>	0,24 ^a	0,17 ^a	1,20 ^b	4,36 ^c	***	0,98	2,46	***	NS	NS
<i>Lachnospira</i>	0,02 ^a	0,05 ^a	0,48 ^b	1,08 ^c	***	0,30	0,68	***	*	**
<i>Bacteroides</i>	16,10 ^a	5,71 ^b	0,59 ^c	0,63 ^d	***	5,34	2,07	***	NS	NS
<i>Coprococcus</i>	0,12 ^a	0,35 ^b	0,86 ^c	0,93 ^c	***	0,51	0,77	***	NS	NS
<i>Paludibacter</i>	0,02 ^a	0,26 ^b	0,27 ^c	0,06 ^a	***	0,15	0,21	NS	NS	***
<i>Ruminococcus</i>	1,27 ^a	2,25 ^b	2,16 ^c	1,34 ^a	***	2,07	1,61	t	t	***
<i>Mitsuokella</i>	0,02 ^{ab}	0,01 ^a	0,03 ^b	0,21 ^c	***	0,04	0,09	***	NS	*
<i>Oscillospira</i>	2,43 ^a	3,59 ^b	2,79 ^c	2,05 ^a	***	2,90	2,50	*	NS	**
<i>Lactobacillus</i>	1,82 ^a	0,88 ^{bc}	0,78 ^c	0,68 ^d	***	0,98	0,75	**	*	***
<i>Campylobacter</i>	1,52 ^a	0,57 ^b	1,14 ^a	1,11 ^a	***	0,81	1,11	t	*	t

¹Abondances relatives moyennes par entérotypage calculées pour les temps j26 et j35 regroupés. ²Probabilités des effets entérotypage, âge et élevage : NS P > 0,1 ; t P < 0,1 ; * P < 0,05 ; ** P < 0,01 ; *** P < 0,001. ^{a, b, c} : des lettres différentes indiquent des abondances significativement différentes.

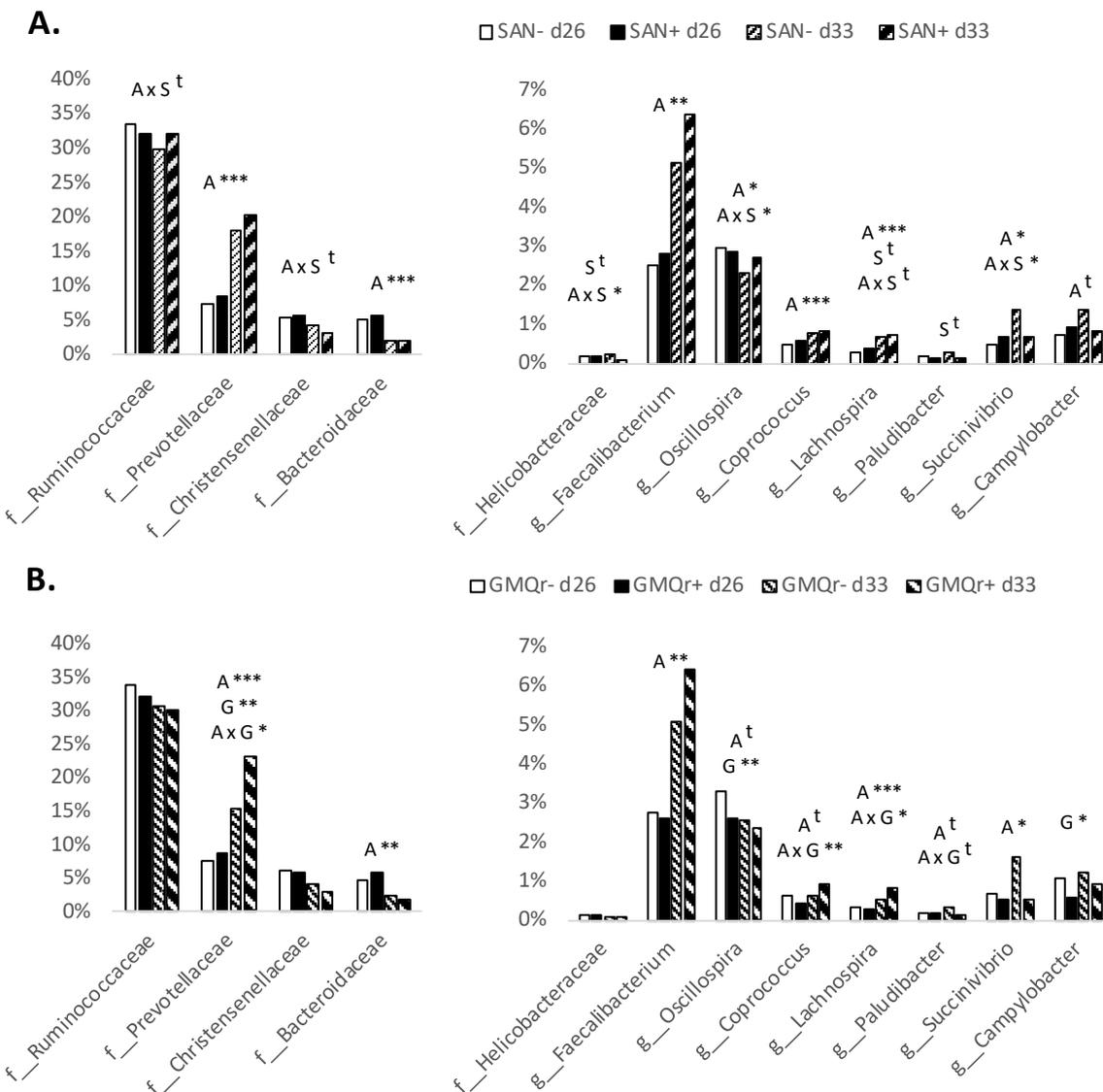


Figure 2 – Effets du statut sanitaire de l'élevage (A) et de la classe de GMQr (B) sur les abondances relatives de quelques familles (f_) et genres (g_) bactériens aux âges j26 et j35. Les effets significatifs de l'âge (A), du statut sanitaire (S) et de la classe de GMQr (G) testés par analyse de variance par permutation sont indiqués par : t P < 0,1 ; * P < 0,05 ; ** P < 0,01 ; *** P < 0,001.

Les GMQr+ avaient à tout âge moins d'*Oscillospira* et de *Campylobacter* ($P < 0,05$, Figure 2B). Ils avaient un plus fort accroissement après le sevrage de leurs proportions de *Prevotella* ($P < 0,05$), *Lachnospira* ($P < 0,05$) et *Coprococcus* ($P < 0,01$). L'abondance des *Paludibacter* tendait à augmenter à j35 chez

les GMQr- ($P < 0,1$). Les porcelets ayant atteint l'entérotypage E4 sept jours après le sevrage avaient un meilleur GMQr (43 ± 1 g/kg/jour) que ceux d'entérotypage E2 ou E3 (37 ± 2 et 40 ± 1 g/kg/jour, $P < 0,05$), les porcs E1 présentant un GMQr intermédiaire.

3. DISCUSSION

Ces travaux présentent les variations du microbiote des porcelets autour du sevrage dans 16 environnements commerciaux différents simultanément, permettant ainsi de valider la généralité des observations précédemment reportés dans la littérature (Pajarillo *et al.*, 2014 ; Mach *et al.*, 2015). Nous confirmons ainsi une augmentation de la diversité α après le sevrage, une diminution de l'abondance relative des familles *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidaceae*, *Clostridiaceae*, *Christensenellaceae*, des genres *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Ruminococcus* et une augmentation des *Prevotellaceae*, *Veillonellaceae* et *Succinovibrionaceae*.

Il existe dans les populations humaines adultes un nombre limité de profils de microbiote digestif, présents dans toutes les zones géographiques, et appelés entérotypes (Arumugam *et al.*, 2011). Chez le porc, de façon comparable, deux entérotypes majoritaires ont été décrits : les jeunes porcelets appartiendraient au cluster caractérisé par *Ruminococcus* et *Treponema*, et évolueraient lentement vers l'entérotipe « *Prevotella* » du sevrage à la fin de l'engraissement (Mach *et al.*, 2015 ; Ramayo-Caldas *et al.*, 2016). Dans l'étude présente, nous avons pu identifier quatre entérotypes qui, de par leur composition, s'apparenteraient tous à des subdivisions de l'entérotipe « *Ruminococcus* et *Treponema* », et qui sembleraient être des étapes successives de maturation vers une flore capable de digérer les nutriments apportés par un régime basé sur des céréales (des entérotypes E1 et E2 vers E3 et E4, majoritaires après le sevrage). Ces quatre entérotypes, qui peuvent être différenciés par leurs abondances relatives des genres *Faecalibacterium*, *Lachnospira*, *Prevotella*, *Roseburia* et *Coproccoccus*, étaient ubiquitaires dans les 16 élevages étudiés. Les porcs ayant atteint l'entérotipe E4 une semaine après le sevrage présentaient un meilleur GMQr, ce que nous interprétons comme une meilleure adaptation au sevrage.

Le jeu de données met en effet en évidence une relation entre le microbiote et la croissance. Quel que soit l'élevage dans lequel ils étaient élevés, les porcs à GMQr élevé présentaient plus de *Prevotella*, *Coproccoccus* et *Lachnospira* que leurs voisins de case à GMQr bas.

Ce profil les rapproche de l'entérotipe E4. Une plus forte abondance de *Prevotella* a aussi été associée à un fort GMQ (Mach *et al.*, 2015). Ces bactéries sont capables de dégrader les polysaccharides complexes, améliorant ainsi la digestibilité des fibres et l'efficacité alimentaire de l'hôte (Le Sciellour *et al.*, 2018).

Même si la réponse au sevrage a été très comparable d'un élevage à l'autre, et si les entérotypes E1 à E4 s'observent dans tous les élevages, une forte variabilité liée au lieu de vie demeure, qui semble s'accroître entre j26 et j35. Elle trouve une partie de son explication dans la diversité d'usage des antibiotiques pendant les premiers jours suivant le sevrage, comme déjà décrit par d'autres (Holman, Chenier, 2014). De façon plus originale, notre étude suggère que le statut sanitaire de l'élevage joue un rôle significatif dans la genèse de variations de flore digestive d'un élevage de porc à l'autre. Cet effet résulte peut-être des différences d'environnement microbien associées à des statuts sanitaires d'élevage favorables ou dégradés, et de leur influence sur le niveau d'activation du système immunitaire des porcelets, alors en cours de maturation (Buchet *et al.*, 2018).

CONCLUSION

Cette étude a permis de confirmer la généralité de certaines variations du microbiote fécal des porcelets en réponse au sevrage, et de mettre en évidence l'existence de quatre entérotypes correspondant probablement à des étapes successives de maturation du microbiote. Il existe néanmoins de la diversité entre individus, et des associations entre la présence de certains genres bactériens et la robustesse des porcelets après le sevrage sont observées, sans qu'il soit possible de conclure à une relation causale entre les deux. Des variations microbiennes significatives existent aussi d'un élevage à l'autre. Elles résultent pour partie de la diversité des pratiques relatives à l'utilisation d'antibiotiques. Mais cette étude montre que le statut sanitaire global de l'élevage, évalué selon la présence de pathogènes dont le tropisme n'était pourtant pas nécessairement digestif, est également un facteur important dans la genèse de la diversité de la flore digestive.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arumugam M., Raes J., Pelletier E., Le Paslier D., Yamada T., Mende D.R., Fernandes G.R., Tap J., Bruls T., Batto J.M., Bertalan M., Borruel N., Casellas F., Fernandez L., Gautier L., Hansen T., Hattori M., Hayashi T., Kleerebezem M., Kurokawa K., Leclerc M., Levenez F., Manichanh C., Nielsen H.B., Nielsen T., Pons N., Poulain J., Qin J.J., Sicheritz-Ponten T., Tims S., Torrents D., Ugarte E., Zoetendal E.G., Wang J., Guarner F., Pedersen O., de Vos W.M., Brunak S., Dore J., Weissenbach J., Ehrlich S.D., Bork P., Meta H.I.T.C., 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473, 174-180.
- Buchet A., Merlot E., Mormède P., Terenina E., Lieubeau B., Mignot G., Hervé J., Leblanc-Maridor M., Lacoste A., Sialelli J.N., Belloc C., 2018. Recherche de variables biologiques associées à la robustesse du porcelet au sevrage. 50èmes Journées Recherche Porcine, 201-206.
- Hémonic A., Poissonnet A., Chauvin C., Corrége I., 2019. Evolution des usages d'antibiotiques dans les élevages de porcs en France entre 2010 et 2016 au travers des panels INAPORC. 51èmes Journées Recherche Porcine, 277-282.
- Holman D.B., Chenier M.R., 2014. Temporal changes and the effect of subtherapeutic concentrations of antibiotics in the gut microbiota of swine. *FEMS Microbiol Ecol*, 90, 599-608.
- Le Sciellour M., Labussiere E., Zemb O., Renaudeau D., 2018. Effect of dietary fiber content on nutrient digestibility and fecal microbiota composition in growing-finishing pigs. *Plos One*, 13, e0206159.
- Mach N., Berri M., Estelle J., Levenez F., Lemonnier G., Denis C., Leplat J.J., Chevalerey C., Billon Y., Dore J., Rogel-Gaillard C., Lepage P., 2015. Early-life establishment of the swine gut microbiome and impact on host phenotypes. *Environ Microbiol Rep*, 7, 554-569.
- Pajarillo E.A.B., Chae J.P., Balolong M.P., Kim H.B., Kang D.K., 2014. Assessment of fecal bacterial diversity among healthy piglets during the weaning transition. *J Gen Appl Microbiol*, 60, 140-146.
- R Core Team, 2019, R: A language and environment for statistical computing, Vienna, Austria.
- Ramayo-Caldas Y., Mach N., Lepage P., Levenez F., Denis C., Lemonnier G., Leplat J.J., Billon Y., Berri M., Dore J., Rogel-Gaillard C., Estelle J., 2016. Phylogenetic network analysis applied to pig gut microbiota identifies an ecosystem structure linked with growth traits. *Isme J*, 10, 2973-2977.