

## **Bases physiologiques, microbiologiques et immunitaires des troubles digestifs du sevrage chez le porcelet : données récentes dans le contexte de la suppression des antibiotiques additifs alimentaires**

*Jean-Paul LALLÈS (1), Sergey KONSTANTINOV (2), Hermann-Josef ROTHKÖTTER (3)*

*(1) INRA, Unité Mixte de Recherche sur le Veau et le Porc, Rennes, France*

*(2) Microbiology Laboratory, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands*

*(3) Anatomy Department, School of Medicine, Magdeburg, Germany*

### **Bases physiologiques, microbiologiques et immunitaires des troubles digestifs du sevrage chez le porcelet : données récentes dans le contexte de la suppression des antibiotiques additifs alimentaires**

Le sevrage est considéré comme une période critique majeure de l'élevage du porc en Europe. Il est caractérisé par une baisse transitoire de l'appétit et un état de sous-nutrition. Ceci affecte divers aspects de la physiologie, de la microbiologie et de l'immunologie du tube digestif. Au plan physiologique, l'atrophie villositaire et la dépression de l'expression des enzymes digestives intestinales ont été décrits. Des résultats récents indiquent des perturbations dans les échanges hydro-minéraux et dans la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale, l'activation précoce de systèmes de cytoprotection et la sur-expression des gènes de plusieurs cytokines inflammatoires. Au plan microbiologique, les techniques moléculaires nouvelles révèlent que la diversité taxonomique et la stabilité de la flore augmentent avec l'âge mais qu'elles sont transitoirement réduites au sevrage. L'alimentation est une voie importante de modulation de la diversité et de la stabilité de cette flore, et donc de la santé, tant dans l'intestin grêle que dans le côlon. Le système immunitaire intestinal évolue en intégrant deux fonctions majeures : reconnaissance et élimination des agents pathogènes et établissement d'une tolérance aux antigènes alimentaires et aux bactéries commensales. Les mécanismes immunitaires régulant ces réponses sont encore mal connus. Chez le porcelet, le sevrage intervient à un moment où la mise en place et le développement du système immunitaire intestinal sont en cours. Les résultats disponibles suggèrent que ce système est très immature et que son développement lent, perturbé par le sevrage, est propice à une sensibilité accrue aux antigènes alimentaires et aux entéro-pathogènes.

### **Physiological, microbiological and immunological basis of post-weaning gut disorders in piglets : recent data in the context of in-feed antibiotic ban**

Weaning is considered as a critical period of pig rearing in Europe. It is characterised by a transient drop in feed intake associated with a state of under-nutrition. This in turn affects various aspects of the physiology, microbiology and immunology of the gut. With regard to physiology, intestinal villus atrophy and depression of various digestive enzymes have been long reported. Recent data indicate disturbances in the exchange of minerals and water and in the permeability of the intestinal epithelial barrier, activation of cytoprotection systems and gene over-expression of various inflammatory cytokines. As far as microbiology is concerned, novel molecular techniques revealed that the diversity and stability of the intestinal flora usually increase with age but that weaning decreases them transiently. The diet is an important factor for modulating the diversity and stability of the flora in the small and large intestines, as an attempt to improve gut health. The intestinal immune system has evolved by integrating two major functions : recognition and elimination of pathogenic agents and set up of a tolerance to dietary and commensal bacteria antigens. The immune mechanisms regulating these responses are not fully understood yet. In the piglet, weaning is applied at a moment when the immune system settles and develops locally. The available data indicate that this system is very immature and that its slow development is disturbed at weaning and favours an increased susceptibility to non-harmful antigens and to enteric pathogens.

## INTRODUCTION

La production porcine, très intensive en Europe, doit faire face depuis quelques années à de nouvelles législations destinées à améliorer la sécurité sanitaire des produits et à limiter les effets indésirables des effluents sur l'environnement. Ainsi, l'augmentation des résistances bactériennes aux antibiotiques, tant en médecine humaine que vétérinaire, et la toxicité de certains métaux vis-à-vis des sols, ont progressivement conduit l'Union Européenne à interdire totalement l'usage des antibiotiques facteurs de croissance en élevage, à partir du 1<sup>er</sup> janvier 2006, et à imposer une réduction drastique des niveaux d'incorporation du zinc et du cuivre dans les aliments. Cette évolution a stimulé la recherche de solutions alternatives destinées, dans le cas du porc, à limiter les troubles digestifs du sevrage, tout en maintenant des niveaux de performances compétitifs. Il est aussi apparu des lacunes importantes dans notre compréhension des mécanismes physio-pathologiques, microbiologiques et immunitaires digestifs, et plus généralement dans l'évaluation de la santé du tube digestif.

La période de sevrage du porcelet est caractérisée par une chute transitoire de l'ingestion conduisant à un état de sous-nutrition sévère, à un arrêt de la croissance et à une susceptibilité accrue aux désordres digestifs, aux infections et aux diarrhées. Au plan de la physiologie intestinale, des altérations anatomiques et fonctionnelles profondes de l'intestin grêle ont été décrites de nombreuses fois (revue de PLUSKE et al, 1997). Il s'agit en particulier d'une atrophie villositaire, accompagnée ou non d'un approfondissement des cryptes intestinales, et d'une dépression plus ou moins marquée de la plupart des enzymes digestives de la bordure en brosse (tableau 1). La restauration de l'intégrité intestinale nécessite une à deux semaines, selon la sévérité des altérations.

Au plan microbiologique, le tube digestif est colonisé au moment de la naissance et sa flore va évoluer d'une communauté simple et instable à une autre plus complexe mais aussi plus stable. La flore est relativement spécifique de l'individu. Au moment du sevrage, des changements majeurs interviennent dans la composition de la flore du porcelet, sous l'influence de l'alimentation et de l'environnement (revues de AKKERMANS et al, 2003 ; JENSEN et al, 2003).

La connaissance de ces phénomènes complexes, initialement appréhendés à l'aide de techniques microbiologiques classiques (cultures), connaît actuellement un développement important grâce aux techniques moléculaires (FAVIER et al, 2002b ; LESER et al, 2002 ; KONSTANTINOV et al, 2003). Elles permettent d'évaluer plus précisément la diversité taxonomique et la stabilité de la flore, notamment au moment du sevrage, et d'étudier les bactéries non cultivables, les plus nombreuses.

Du point de vue immunitaire, le porcelet est profondément immunodéficient à la naissance. Il est totalement dépendant de l'apport de facteurs immunitaires spécifiques et non spécifiques présents dans le colostrum puis le lait maternel, pour sa protection immune, son développement et sa survie. Le transfert de l'immunité passive par les anticorps maternels est bien connu. En revanche, la mise en place de l'immunité active l'est beaucoup moins (revue de STOKES et al, 2000). Le porcelet nouveau-né ne peut développer que des réponses T et B très limitées, en réponse aux agents pathogènes. Le développement d'une immuno-compétence est un besoin absolu pour optimiser la croissance et les performances. Cette immuno-compétence consiste en la capacité de mettre en place d'une part une tolérance aux antigènes des aliments et des bactéries commensales et, d'autre part, des réponses immunitaires actives, appropriées vis-à-vis des pathogènes. De nombreux arguments suggèrent que la nutrition précoce et l'environnement agissent sur le développement et les fonctions du système immunitaire (BRANDTZAEG, 2002). On considère de plus que le système immunitaire nécessite des stimuli spécifiques pendant des périodes bien définies du développement post-natal précoce conduisant à des réponses optimales et, qu'enfin, l'absence de stimuli peut altérer profondément les fonctions immunitaires au cours de la vie.

L'objectif de cette revue bibliographique est de faire une synthèse sur les données récentes de la physiologie, de la microbiologie et de l'immunologie du tube digestif du porcelet et des changements survenant au moment du sevrage, sur la base des revues récemment publiées dans chacune des disciplines (AKKERMANS et al, 2003 ; BURRIN et STOLL, 2003 ; JENSEN et al, 2003 ; LALLES et al, 2003 ; STOKES et al, 2000). Dans la dernière partie, quelques voies d'amélioration de la santé du tube digestif sont analysées plus en détail.

**Tableau 1** - Evolution post-sevrage de quelques paramètres pondéraux, morphologiques et enzymatiques de l'intestin grêle du porcelet sevré à 21 jours ; valeurs en % de celles observées le jour du sevrage (UMRVP, équipe 4, non publié)

	Temps post-sevrage <sup>1</sup>		
	Jour 2	Jour 8	Jour 15
<b>Intestin grêle</b>			
• poids du tissu	-18	+14	+49
• poids de la muqueuse	-30	+5	+36
<b>Duodénum</b>			
• hauteur des villosités	-40	-37	23
• profondeur des cryptes	-2	+41	+43
• activités enzymatiques spécifiques			
- lactase	-19	-71	-80
- maltase	-12	+2	+2
- amino-peptidase N	-49	-39	-39

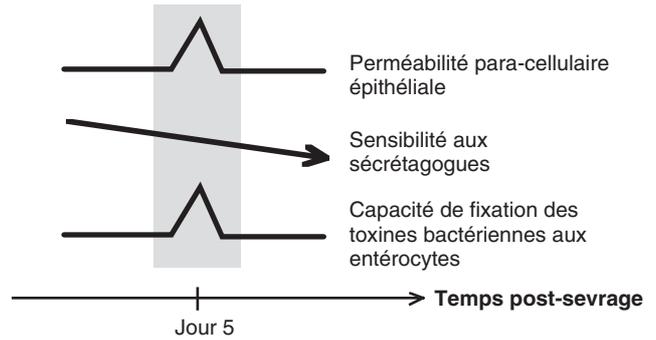
<sup>1</sup>niveaux d'ingestion d'aliment de 9, 61 et 80 g/kg<sup>0,75</sup>/j, respectivement

## 1. PHYSIOLOGIE INTESTINALE

Il est admis depuis longtemps que le sevrage se traduit par une réduction importante mais transitoire de l'ingestion, avec des conséquences néfastes sur la structure et les diverses fonctions de l'intestin grêle (revue de PLUSKE et al, 1997). Au cours des deux dernières décennies, l'hypothèse qui a prévalu pour expliquer ces altérations intestinales était que les porcelets développaient des réactions de type allergique aux antigènes alimentaires nouvellement introduits dans l'alimentation (STOKES et al, 1987 ; LALLES et SALMON, 1994). Des travaux plus récents (McCRACKEN et al, 1999) mettent directement en cause l'anorexie post-sevrage comme facteur étiologique primaire des altérations intestinales, les réactions allergiques alimentaires se développant éventuellement secondairement.

### 1.1. Absorption, sécrétion et perméabilité intestinale

Du point de vue physiologique, l'intestin possède plusieurs fonctions : absorption de nutriments, absorption-sécrétion de minéraux et d'eau, barrière limitant l'entrée d'agents indésirables (inertes ou vivants) à travers l'épithélium. Les études d'absorption intestinale *in vivo* concernant le sevrage sont rares, la seule disponible indiquant une réduction transitoire de l'absorption nette (NABUURS et al, 1996). Les études *in vitro* (en chambres d'Ussing) sont plus nombreuses. Elles permettent d'évaluer les caractéristiques électriques, basales ou stimulées, d'une muqueuse, les propriétés d'absorption, de sécrétion et de perméabilité, ainsi que certains mécanismes (humoraux ou nerveux) impliqués. Les résultats plus anciens, comparant le jeune porcelet allaité au porc sevré depuis plusieurs semaines, indiquaient que les flux nets d'ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , etc.) à travers la muqueuse de l'intestin grêle diminuaient au cours du temps. L'analyse plus fine de la période post-sevrage a récemment révélé un état hyper-sécrétoire transitoire de l'intestin grêle proximal et du côlon, 2 à 4 jours après le sevrage (figure 1) (SPREEUWENBERG et al, 2001 ; BOUDRY et al, 2003a,b). Cependant, la capacité sécrétoire des intestins, en réponse aux sécrétagogues bactériens (toxines) ou endogènes (molécules de l'hôte impliquées dans ses réponses) diminue au fil du temps. Enfin, la perméabilité para-cellulaire de l'épithélium (entre les cellules, au niveau des jonctions serrées), mesurée par des marqueurs ou



**Figure 1** - Evolution des principales propriétés physiologiques de la muqueuse de l'intestin grêle chez le porcelet après sevrage (G. BOUDRY, non publié)

évaluée par la résistance électrique du tissu, est transitoirement augmentée 2 à 4 jours post-sevrage dans l'intestin grêle proximal, alors qu'elle diminue au niveau du côlon. Collectivement, ces résultats indiquent l'existence d'une période de perturbation dans la physiologie intestinale immédiatement post-sevrage, suivie par l'acquisition des propriétés anatomo-fonctionnelles de type adulte. Les perturbations précoces sont probablement liées à l'anorexie post-sevrage.

### 1.2. Cytoprotection intestinale par les protéines du choc thermique

Au plan des mécanismes de protection cellulaire, plusieurs membres de la famille des protéines du choc thermique (HSP) apparaissent jouer un rôle central. Ces protéines ont des propriétés cytoprotectrices (revue de FEDER et al, 1999) et interviennent dans la défenses des muqueuses agressées (revue de TSUKUMI et OKABE, 2001). L'apport de glutamine ou de butyrate à des cellules épithéliales intestinales en culture les protège des agressions en stimulant l'expression des HSP70 et HSP25, respectivement (WISCHMEYER et al, 1997 ; REN et al, 2001). Chez le porcelet, nous avons récemment montré que le sevrage se traduit par une sur-expression très précoce (6-48h) des HSP27 et HSP70 (DAVID et al, 2002), avec des changements spatio-temporels plus complexes pour la HSP90 (tableau 2). L'anorexie post-sevrage pourrait être en partie responsable de ces change-

**Tableau 2** - Evolution post-sevrage de l'expression des protéines du choc thermique (ou heat shock proteins, HSP) dans divers segments du tube digestif du porcelet sevré à 28 jours (DAVID et al, 2002)

HSP	Site	Temps post-sevrage (heures)			
		6	24	48	> 72
HSP 27	Estomac	++	++	0	0
	Jéjunum	+	++	0	0
	Côlon	+	+	++	0
HSP 70	Estomac	++	++	+	0
	Jéjunum	+	++	0	0
	Côlon	0	+	++	0
HSP 90	Estomac	-	0	+	0
	Jéjunum	-	+	++	0
	Côlon	0	-	--	0

+, ++ augmentation ; -, -- diminution ; 0 inchangé (par rapport aux valeurs respectives observées juste avant le sevrage)

ments car le jeûne module l'expression de la HSP90 (GRONGNET et DAVID, 2003). Le rôle précis des HSP dans la physiopathologie intestinale post-sevrage reste à élucider, mais elles interfèrent probablement avec l'expression des cytokines inflammatoires (cf paragraphe 3) (MALAGO et al, 2002).

### 1.3. Protection par le mucus (les mucines)

Les mucines, glyco-protéines du mucus, sont aussi un déterminant important de la protection physico-chimique et antibactérienne du tube digestif. Cependant, les données disponibles sur la période du sevrage sont rares et parfois contradictoires. Une étude ancienne rapporte une baisse transitoire de la densité des cellules à mucus dans les villosités de l'intestin grêle (DUNSFORD et al, 1991), changement non confirmé dans une étude plus récente (SPREEUWENBERG et al, 2001). L'étude des types de mucines (neutres, acides, sulfatés) peut renseigner sur l'état du tube digestif, les mucines sulfatées étant considérées comme plus matures et plus protectrices que les neutres. Des changements dans ces types de mucines tissulaires ou dans les résidus glycosylés ont parfois été décrits mais il est difficile de tirer des conclusions claires (revue de LALLES et al, 2003).

### 1.4. Métabolisme intestinal des acides aminés et synthèse protéique

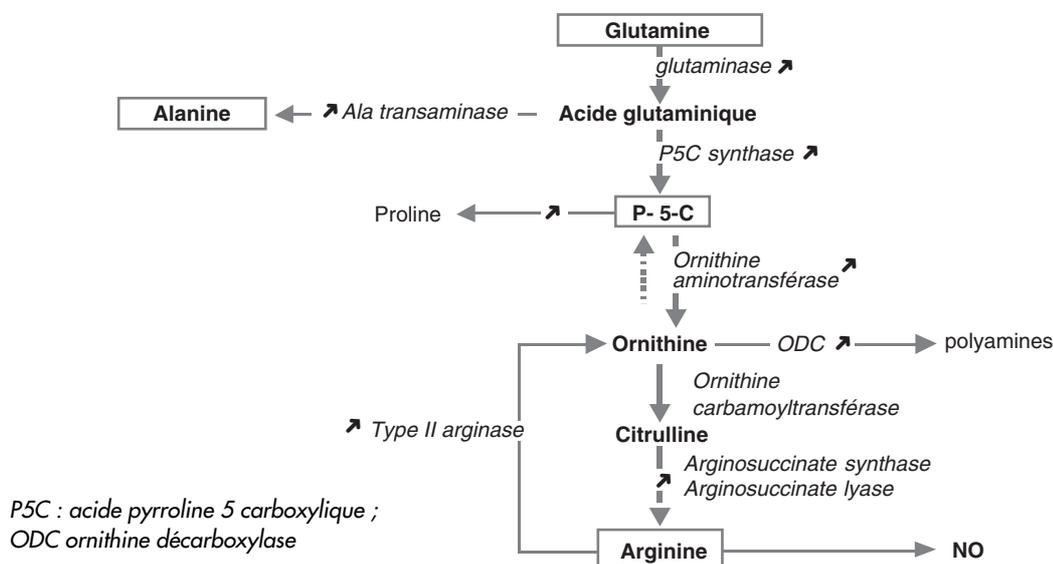
Du point de vue du métabolisme protéique et des acides aminés, l'intestin grêle perd de 20 à 30 % de sa masse protéique juste après le sevrage. Ceci est principalement lié à l'anorexie post-sevrage car l'apport luminal de nutriments est essentiel à la croissance et au développement de cet organe (BURRIN et al, 2000), d'une part. La présence luminale d'acides aminés libres limite la protéolyse intestinale, d'autre part (ADEGOKE et al, 2003). L'intestin devient ensuite prioritaire pour la synthèse protéique, au détriment du muscle, et même en situation de déficience en protéines ou en certains acides aminés (SEVE et al, 1986 ; revue de

LALLES et al, 2003). Du point de vue métabolisme, le tube digestif du porcelet, comme celui d'autres mammifères, est un site majeur d'oxydation (Gln, Glu, Asp), de synthèse nette (Pro, Ala, Tyr, Arg, etc.) et d'utilisation des acides aminés pour la synthèse protéique (Thr, Lys, Phé, acides aminés ramifiés, Met) (revue de BURRIN et STOLL, 2003). Plusieurs acides aminés indispensables sont impliqués, directement ou indirectement, dans les systèmes de défense intestinale : thréonine dans les mucines, cystéine dans le glutathion, tryptophane et histidine dans la synthèse de sérotonine et d'histamine, méthionine dans les polyamines, arginine dans le monoxyde d'azote, etc. (BURRIN et STOLL, 2003). Le sevrage du porcelet s'accompagne de changements substantiels dans le métabolisme de certains acides aminés. Celui mettant en jeu collectivement la glutamine, l'arginine, la citrulline et la proline est particulièrement concerné comme le montre l'augmentation d'activité de plusieurs enzymes-clés (figure 2) (WU et al, 1994 ; FLYNN et WU, 1997 ; FLYNN et al, 1999). Apparemment, ces changements ne sont pas spécifiques de l'âge ou de l'alimentation mais dépendent des glucocorticoïdes dont la sécrétion est stimulée en situation de jeûne ou de stress. Quoi qu'il en soit, ces modifications conduisent à la production de molécules d'importance physiologique pour l'adaptation, la protection et la réparation intestinale (glutathion, polyamines, composés énergétiques, etc.).

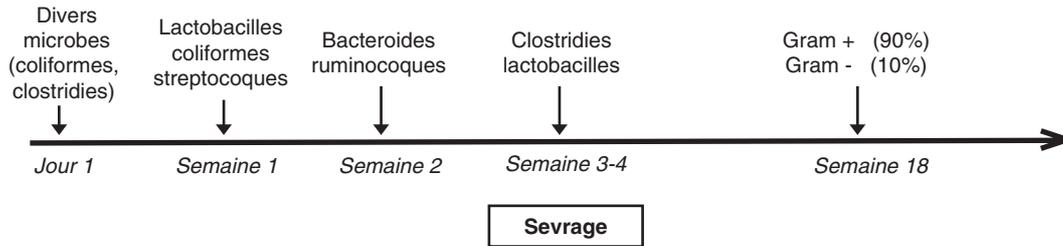
## 2. MICROBIOLOGIE INTESTINALE

### 2.1. Développement de la flore gastro-intestinale

La succession de populations microbiennes dans le tube digestif pendant les premières semaines de vie est remarquablement similaire chez l'Homme, le porc, le bovin et l'oiseau (revue d'AKKERMANS et al, 2003). Quelques jours après la naissance, les coliformes et les streptocoques dominent la flore digestive (figure 3). Les bactéries anaérobies obligatoires apparaissent plus tard. Les clostridies et les lactobacilles sont aussi présents chez la plupart des hôtes pendant une courte période (MACKIE et al, 1999). Chez le

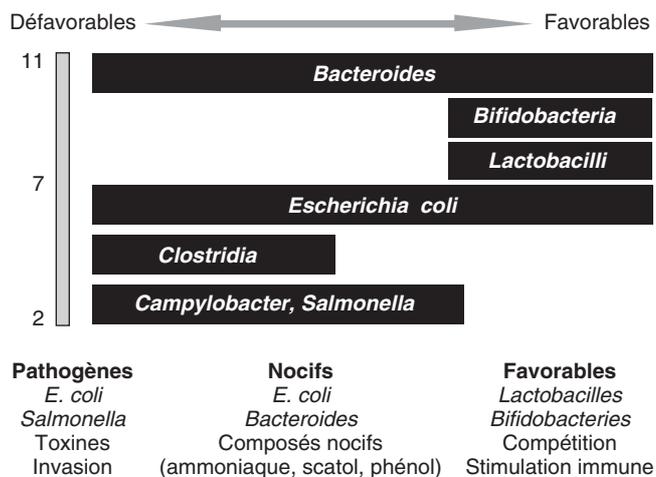


**Figure 2** - Principales modifications du métabolisme intestinal des acides aminés chez le porcelet après le sevrage (N. LE FLOC'H, non publié)



**Figure 3** - Succession temporelle des genres bactériens dans les fèces du porc (S. KONSTANTINOV, non publié)

porc, le développement de la flore connaît une succession écologique rapide de la naissance au sevrage. Ensuite, elle reste relativement stable en termes de composition d'espèces bactériennes, ceci tant que le porcelet consomme le lait maternel (MATHEW et al, 1998). Cependant, l'introduction d'aliments solides provoque des changements qualitatifs et quantitatifs importants. Par exemple, les anaérobies strictes telles que *Bacteroides* s'établissent dans le gros intestin, alors que ceci correspond à un déclin du nombre de bactéries anaérobies facultatives (SAVAGE, 1977). Enfin, en relation avec la santé du tube digestif et celle de l'hôte, certaines bactéries sont bien connues pour leur pathogénicité, d'autres pour leurs effets plutôt protecteurs, certaines ayant des effets variables en fonction des situations (figure 4).



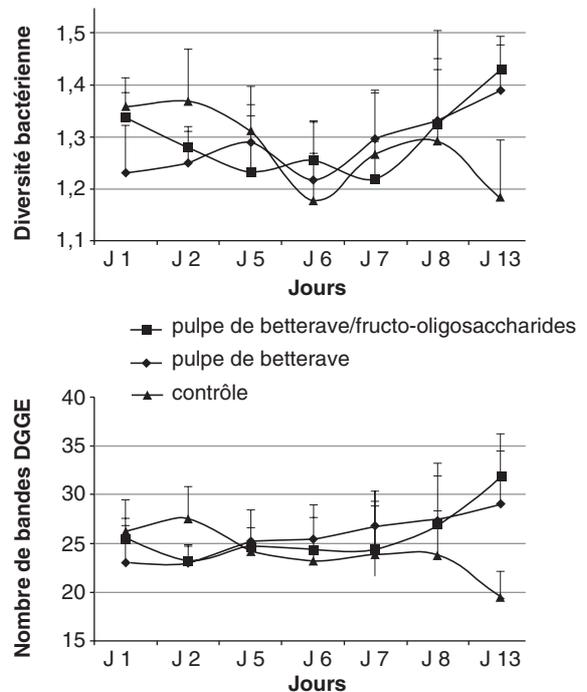
**Figure 4** - Genres bactériens et leur influence sur l'hôte (S. KONSTANTINOV, non publié)

Le développement récent des techniques de microbiologie moléculaire appliquées à l'étude de l'écologie du tube digestif a apporté de nouveaux éclairages sur la colonisation bactérienne et son évolution au cours du temps. Les principaux résultats disponibles actuellement proviennent des études chez l'Homme (FAVIER et al, 2002b), mais cette évolution est considérée comme relativement représentative de celle chez les autres espèces. Ainsi, chez l'enfant, les premières bactéries colonisatrices sont *Escherichia coli* et *Clostridium spp.* Après quelques jours, apparaissent les premières *bifidobacterium spp.* Celles-ci restent dominantes pendant l'allaitement maternel. Après le sevrage, la flore devient plus complexe, avec l'apparition d'autres types bactériens, notamment *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Enterococcus* et *Enterobacter spp.* Avec l'âge, ces profils bactériens deviennent encore plus complexes et plus stables. La plupart des

bactéries mises en évidence par les techniques moléculaires correspondent à des espèces nouvelles, non détectées préalablement par culture (ZOETENDAL et al, 1998). C'est en particulier le cas de *Ruminococcus*.

## 2.2. Influence des glucides fermentescibles sur la flore digestive chez le porcelet au sevrage

Plusieurs études visant à préciser l'influence des facteurs alimentaires sur la flore digestive du porcelet au sevrage, et mettant en œuvre des techniques de microbiologie moléculaire, ont été conduites récemment dans le cadre du projet Européen HEALTHYPIGUT (2001-2004). Ainsi, l'influence des glucides fermentescibles (pulpe de betterave, vs. fructo-oligosaccharides) sur les communautés bactériennes a été explorée, d'abord au niveau fécal (KONSTANTINOV et al, 2003). Les porcelets consommant les régimes supplémentés présentaient une communauté bactérienne beaucoup plus diversifiée et plus stable que les porcelets témoins (figure 5). De nombreuses espèces bactériennes identifiées par voie moléculaire ne correspondaient pas à celles obtenues par les techniques classiques. Ainsi, les espèces de type



**Figure 5** - Influence du temps après le sevrage (jours, D) et d'une supplémentation de l'aliment en prébiotiques sur la diversité bactérienne et sur le nombre de bandes d'ARN 16S bactériens séparés par électrophorèse (DGGE), dans les fèces du porcelet sevré à 28 jours (KONSTANTINOV et al, 2003).

*Ruminococcus* ont été mises en évidence chez tous les porcelets supplémentés, mais jamais chez les témoins. Ces espèces joueraient donc un rôle important dans la fermentation des fibres alimentaires chez le porcelet.

L'influence de glucides fermentescibles (lactulose, inuline, amidon de blé, pulpe de betterave) sur la flore de l'iléon et du côlon a ensuite été étudiée (S.R. KONSTANTINOV et al, non publié). La diversité taxonomique bactérienne a été plus élevée dans le côlon que dans l'iléon. De plus, les régimes étudiés ont influencé la concentration et la diversité des communautés bactériennes dans l'intestin grêle, mesurées 10 jours après la mise en régime. Il a aussi été possible de montrer, par technique quantitative d'hybridation *in situ* en fluorescence, une prolifération accrue des lactobacilles dans l'intestin grêle, avec ces régimes supplémentés en glucides, ce qui est considéré comme favorable à la santé. Ces résultats suggèrent un rôle significatif, à ce site, de la flore dans la dégradation des glucides fermentescibles.

Dans un autre essai visant à développer un modèle de troubles digestifs non infectieux, une grande quantité de blé (68 %) a été introduite dans un régime de sevrage, en comparaison à un régime témoin (25 % de blé) (FAVIER et al, 2002a). Il a été montré, par techniques classiques, que les rapports entérocoques/anaérobies et coliformes/entérocoques du jéjunum étaient plus élevés avec le régime blé, deux semaines après la mise en régime. L'analyse moléculaire a révélé une diversité taxonomique réduite et très instable dans le caecum, avec l'apparition d'une espèce bactérienne dominante à partir d'une semaine après le sevrage (FAVIER et al, 2003).

Une autre étude comparait des régimes avec ou sans antibiotiques et deux niveaux de fibres (KLUSS et al, 2003). La combinaison des techniques classiques et moléculaires a montré que les bactéries dominantes étaient les lactobacilles, transitoirement déprimés pendant le sevrage, ceci indépendamment des régimes. La majorité correspondait à *Lactobacillus amylovorus*, récemment décrit chez des porcs danois d'âge et de régimes alimentaires différents (LESER et al, 2002).

L'ensemble de ces résultats souligne l'instabilité de la flore au sevrage et illustre certaines voies alimentaires de modulation de cette flore, permettant éventuellement de la stabiliser.

### 3. IMMUNOLOGIE INTESTINALE

Les premiers mécanismes de protection du tube digestif visent à prévenir l'entrée des antigènes néfastes dans l'organisme. Il s'agit d'une réponse foncièrement non inflammatoire : la sécrétion d'anticorps IgA. Le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale est, à cet égard, de première importance. Lorsque qu'elle est altérée, d'autres mécanismes de défense interviennent alors.

#### 3.1. Organisation fonctionnelle du système immunitaire intestinal

De manière schématique, le tissu lymphoïde associé aux muqueuses digestives est formé de deux compartiments : celui composé de structures organisées (plaques de Peyer, gan-

glions lymphatiques mésentériques) et celui, diffus, disséminé dans les tissus digestifs (lamina propria, lymphocytes intra-épithéliaux) (revue de STOKES et al. 2000). Les sites organisés sont classiquement considérés comme des sites d'induction des réponses immunitaires, peuplés de cellules immunitaires naïves. Après un premier stimulus, elles recirculent en se transformant en cellules mémoires qui vont se localiser dans les zones diffuses, considérées comme les sites effecteurs. Dans le jéjunum, sont localisées 11 à 26 petites plaques de Peyer contenant de multiples follicules de cellules B séparés par des zones inter-folliculaires riches en cellules T. La région du dôme des plaques de Peyer est riche en cellules dendritiques, présentatrices de l'antigène. La lamina propria intestinale est très peuplée en leucocytes. Les cellules de la lignée B prédominent autour des cryptes et les cellules T dans les villosités. Les cellules B sont principalement à IgM et à IgA. Les cellules T des villosités ont clairement une distribution spatiale organisée : les cellules auxiliaires régulatrices (CD4+) en profondeur et les cellules cytotoxiques (CD8+) dans et immédiatement sous l'épithélium. D'un point de vue fonctionnel, ces lymphocytes T CD8+ peuvent produire de l'IL-2 et de l'interféron après activation *in vitro* et être impliqués dans des réactions cytotoxiques limitées (STOKES et al, 2000).

#### 3.2. Induction et régulation des réponses immunitaires muqueuses

Les réponses immunitaires muqueuses seraient initiées par la captation d'antigènes par les plaques de Peyer, à travers des cellules spécialisées (cellules M) de l'épithélium. Ensuite, dans la lamina propria, deux populations de cellules T ont été mises en évidence : les cellules naïves (CD45+), fortement stimulatrices de réponses primaires, et les cellules mémoires (CD45-), relativement inertes (HAVERSON et al, 1999).

Les cellules T de la lamina propria présentent, après certaines stimulations, un profil de cytokines de type 'Th2' (IL-4 et IL-10, mais pas d'IL-2), supportant la synthèse et la sécrétion d'IgA (BAILEY et al, 1994). Cependant, le profil de cytokines exprimées dépend de la nature des stimulations induisant l'activation (STOKES et al, 2000). Quoi qu'il en soit, les cellules T spécifiques d'un antigène peuvent avoir deux fonctions : 1/ surveillance et développement de réponses actives aux pathogènes potentiels, 2/ régulation et maintien de l'homéostasie (BAILEY et al, 1998). Nos travaux récents indiquent que l'activation des lymphocytes T isolés de la lamina propria du porc les conduit majoritairement à la mort cellulaire, suggérant que la fonction primaire de cet environnement intestinal est de prévenir l'expression de réponses de cellules T actives à des antigènes normalement présents dans la lumière intestinale (C.R. STOKES et al, non publié). Les mécanismes du maintien de la tolérance au niveau de la lamina propria sont en cours d'élucidation (HAVERSON et al, 1999).

#### 3.3. Développement du système immunitaire intestinal

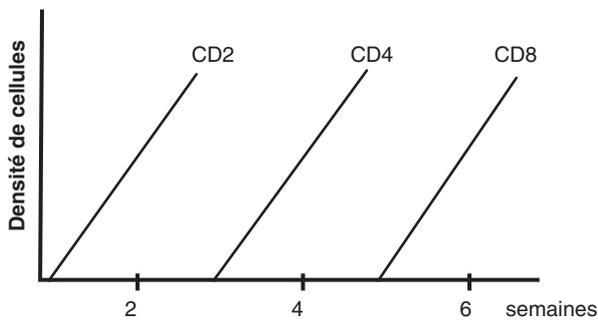
Le système immunitaire du jeune porcelet est relativement immature, probablement du fait de l'absence d'exposition aux antigènes. Les plaques de Peyer ne sont pas complète-

ment formées à la naissance mais l'accumulation de leucocytes est visible. Elles se structurent au cours des jours suivant la naissance, mais leur taille et leur organisation va évoluer en fonction des antigènes rencontrés. Les lymphocytes intra-épithéliaux acquièrent le phénotype cytotoxique (CD8+) assez tardivement, à partir de l'âge de 7 semaines (WHARY et al, 1995). Ces lymphocytes intra-épithéliaux répondent peu aux mitogènes, probablement du fait de leur incapacité à produire de l'IL-2 (WHARY et al, 1995). La lamina propria ne contient quasiment pas de cellules T ou B à la naissance. Le développement de ce compartiment est dépendant des antigènes rencontrés et procède par phases. Les cellules B s'accumulent au cours des 4 premières semaines de vie, passant du phénotype IgM+ à IgA+ rapidement. Les cellules T auxiliaires (CD4+) apparaissent à partir de 3 semaines d'âge alors que celles de phénotype cytotoxique (CD8+) ne sont présentes qu'à partir de 7 semaines (figure 6) (revue de STOKES et al, 2000). Alors que les tissus lymphoïdes organisés se structurent rapidement et deviennent fonctionnels, le développement des sites effecteurs diffus de la muqueuse intestinale prend plus de temps (7-9 semaines). Le porcelet est doué de réponses immunologiquement actives vis-à-vis des virus et des antigènes alimentaires, à partir de l'âge de 3 semaines. Cependant, il n'acquiert une tolérance aux antigènes alimentaires (tolérance orale) qu'après 8 semaines d'âge (MILLER et al, 1994). Cette incapacité à réguler les réponses aux antigènes inoffensifs des aliments ou des bactéries commensales pourrait contribuer aux diarrhées post-sevrage chez le porcelet (MILLER et al, 1984).

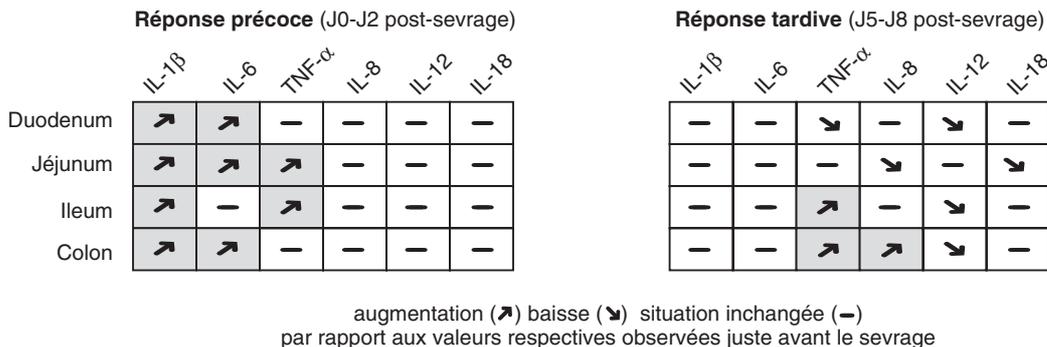
### 3.4. Réponses immunitaires au sevrage

Le sevrage est caractérisé par des réponses immunitaires relativement aberrantes, comme en témoigne par exemple l'absence de tolérance aux antigènes alimentaires avant l'âge de 8 semaines (MILLER et al, 1994). Il a par exemple été montré que la réponse des lymphocytes intra-épithéliaux aux mitogènes d'une part, et la capacité de certaines cellules T de rate à sécréter de l'IL-2 d'autre part, étaient transitoirement réduites (revue de STOKES et al, 2000). Le sevrage conduit aussi à une accumulation de cellules T CD2+ (marqueur des lymphocytes T et des cellules NK, 'natural killer') dans la lamina propria, probablement en réponse à une re-localisation, vers le tube digestif, des cellules T circulantes. Les récentes investigations conduites dans le cadre du projet européen HEALTHYPIGUT ont montré qu'après le sevrage, le porcelet exprime les ARNm codant pour plusieurs cytokines inflammatoires (IL-2, IFN- $\gamma$  et l'IL12p40) et anti-inflammatoires (IL-4, IL-5, IL-10) dans tous les segments intestinaux (E. SOWA et H.J. ROTHKOETTER, non publié). Dans le gros intestin, les cellules contenant ces ARNm sont localisées dans la lamina propria près des cryptes.

Les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle-clé dans les processus inflammatoires intestinaux, comme cela a été montré chez l'homme et les animaux de laboratoire. Chez le porcelet, le sevrage semble être associé à un processus inflammatoire précoce (McCRACKEN et al, 1999). Nous avons donc étudié l'expression des gènes de ces cytokines chez le porcelet à différents temps après le sevrage. Il est effectivement associé à une augmentation transitoire de plusieurs cytokines inflammatoires le long du tube digestif (figure 7) (PIE et al, 2003). L'analyse cinétique a révélé, au cours des deux premiers jours suivant le sevrage, une augmentation significative des niveaux d'ARNm de l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  le long de l'intestin grêle et du côlon. Cette inflammation transitoire était contemporaine de l'atrophie villositaire et de la réduction d'activité des enzymes digestives intestinales et un état anorexique plus ou moins prononcé (J.P. LALLES et al, non publié). Au cours des 5 jours suivants, les niveaux d'expression de l'IL-12p40 ont diminué partout, sauf dans le jéjunum. Enfin, les expressions des gènes de TNF- $\alpha$  et IL-8 ont aussi diminué dans les parties proximales de l'intestin grêle mais elles ont augmenté dans le côlon. Cette dernière observation est à mettre en relation avec



**Figure 6** - Représentation schématique de la mise en place de quelques sous-populations de lymphocytes T dans la muqueuse intestinale du porcelet au cours du temps après la naissance (C. STOKES, non publié)



**Figure 7** - Influence du sevrage sur l'expression des gènes des cytokines inflammatoires dans les tissus digestifs du porcelet sevré à 28 jours (S. PIE et al, 2003)

l'arrivée massive de digesta et le développement des fermentations dans le gros intestin.

Dans une autre étude visant à moduler la santé du tube digestif par voie alimentaire, l'apport de glucides fermentescibles a eu un effet marginal sur l'expression de l'IL-1 $\beta$  (I. OSWALD et al, non publié). En revanche, ce régime favorisait la baisse d'expression des gènes de l'IL-6 et de l'IL-12p40, mesurée 10 jours post-sevrage. Dans cette étude, un jeûne de 2 jours immédiatement post-sevrage n'avait pas d'effet notable sur l'expression des cytokines étudiées (I. OSWALD et al, non publié).

Le tube digestif connaît donc de grands changements spatio-temporels d'expression des gènes de cytokines au cours du sevrage. Les relations causales ainsi que les mécanismes physio-pathologiques conduisant aux altérations tissulaires intestinales restent à éclaircir.

#### 4. QUELQUES VOIES D'AMÉLIORATION DE LA SANTÉ DU TUBE DIGESTIF CHEZ LE PORCELET AU SEVRAGE

Cette partie n'a pas pour objet de faire une revue exhaustive des alternatives aux antibiotiques (acidifiants, prébiotiques, probiotiques, huiles essentielles, etc.) utilisées en élevage. Il s'agit plutôt d'illustrer quelques points, particulièrement étudiés, intéressant la conduite alimentaire et la formulation des aliments (tableau 3).

##### 4.1. Stimulation de l'ingestion volontaire d'aliment de sevrage

L'anorexie post-sevrage étant considérée comme un facteur étiologique important des troubles digestifs post-sevrage (McCRACKEN et al, 1999), toutes les actions stimulant l'ingestion volontaire d'aliment de sevrage doivent contribuer à améliorer la santé du tube digestif, des points de vue anatomique, fonctionnel, microbiologique et/ou immunitaire.

Plusieurs travaux ont montré que l'alimentation liquide stimule l'ingestion (BROOKS et al, 2001) et l'état sanitaire du tube digestif du porcelet, en particulier lorsque que les aliments ont été préalablement fermentés (revue de JENSEN et al, 2003). Dans ces conditions, le pH gastrique est maintenu en dessous de 4 et de fortes concentrations d'acide lactique, d'origine alimentaire, sont présentes. Ces deux facteurs contribuent à inhiber la croissance des bactéries pathogènes (*E. coli*, *Salmonella*). La réduction des coliformes est probablement liée, en partie, à la moindre fermentescibilité *in vivo* des aliments fermentés. Ceux-ci favorisent aussi le développement des levures mais l'importance de leur influence sur la santé du tube digestif n'est pas claire (JENSEN et al, 2003). Enfin, les performances sont généralement réduites, probablement à cause de la dégradation des acides aminés ajoutés (Lys).

Un autre exemple intéressant d'amélioration de la santé digestive par voie alimentaire, malgré l'interdiction d'utilisation qui pèse sur le produit, est celui de la supplémentation en protéines de plasma (spray-dried plasma, SDP). Ainsi, l'incorporation de SDP à un taux de 3-6 % dans l'aliment de sevrage, stimule considérablement la croissance (+27 %), essentiellement par le biais de l'ingestion (+25 %) (revue de VAN DIJK et al, 2001). Les résultats sont cependant moins bons en présence de sources végétales de protéines (VAN DIJK et al, 2001). La supplémentation de l'eau de boisson en SDP, en association avec d'autres nutriments, est également efficace (STEIDINGER et al, 2002). L'incidence et la sévérité des diarrhées post-sevrage et les altérations intestinales sont généralement réduites. En plus de la palatabilité élevée du SDP, les effets favorables impliqueraient des facteurs de croissance (IGF-1), des glycoprotéines non-immunoglobuliniques et les immunoglobulines (revue de VAN DIJK et al 2001), en particulier celles spécifiquement dirigées contre *E. coli* (OWUSU-ASIEDU et al, 2002). Le SDP réduit aussi les niveaux d'expression des cytokines inflammatoires dans plusieurs tissus et la densité de cellules immunitaires dans la muqueuse intestinale (JIANG et al, 2000 ; TOUCHETTE et al,

**Tableau 3** - Influence de quelques facteurs alimentaires sur l'intégrité (morphologie) de l'intestin grêle chez le porcelet sevré

Facteur	Effet <sup>1</sup>	Référence
<b>Niveau d'ingestion (augmentation)</b>	favorable	PLUSKE et al 1997
<b>Composition de l'aliment, nature des ingrédients</b>		
* rapport lactose/protéines élevé	favorable (t)	SPREEUWENBERG, 2002
* digestibilité des protéines (lait vs. plumes)	NS	SPREEUWENBERG, 2002
* prédigestion des protéines de gluten de blé	NS	SPREEUWENBERG, 2002
* prédigestion des protéines de soja	NS	SPREEUWENBERG, 2002
* protéines plasmatisées	favorable <sup>2</sup>	VAN DIJK et al 2001
<b>Supplémentation en acides aminés</b>		
* glutamine	favorable	WU et al, 1996
	NS	SPREEUWENBERG, 2002
* arginine	favorable	EWTUSHICK et al, 2000
	NS	SPREEUWENBERG, 2002
* ornithine	NS	EWTUSHICK et al, 2000
* citrulline	NS	EWTUSHICK et al, 2000

<sup>1</sup> t tendance, NS non significatif

<sup>2</sup> principalement via une augmentation importante du niveau d'ingestion d'aliment

2002). Ces résultats suggèrent donc un abaissement global du niveau de stimulation immunitaire. Cependant, certains aspects des réponses observées avec le SDP sont moins favorables. Par exemple, la réponse immunitaire à une stimulation par le LPS (lipopolysaccharide) est accrue, et les altérations intestinales sont plus importantes, chez des porcelets supplémentés en SDP par rapport aux témoins, (TOUCHETTE et al, 2002).

#### 4.2. Composition des aliments

La composition des aliments semble avoir des effets limités sur plusieurs indicateurs sanitaires digestifs au moment du sevrage (McCRACKEN et al, 1999, SPREEUWENBERG et al, 2001). Par exemple, l'apport comparé de glucose, de lactose ou d'amidon influence peu les altérations intestinales (SPREEUWENBERG, 2002). Il en va de même pour l'hydrolyse des protéines, comparativement aux protéines non hydrolysées (SPREEUWENBERG, 2002). Certains hydrolysats sont connus pour accroître les pertes de matières azotées endogènes iléales, et donc probablement les stimulations du tube digestif, comparativement aux protéines non hydrolysées (SEVE et LAHAYE, 2003).

En revanche, plusieurs acides aminés ont des effets favorables. Des travaux antérieurs avaient indiqué que l'alanine et la glycine amélioraient la croissance et réduisaient les diarrhées post-sevrage (revue de GORANSSON, 1997). Ces acides aminés stimulent la production du «facteur sécrétoire», particulièrement faible au moment du sevrage. Plus récemment, il a été montré que la glutamine (1-4 %), le glutamate (6,5 %) et l'arginine (0,93 %) améliorent, à des degrés divers, l'intégrité intestinale et l'efficacité alimentaire pendant la première semaine post-sevrage (WU et al, 1996 ; EWTUSHICK et al, 2000). Des additions de citrulline et d'ornithine à la ration n'ont pas eu d'effet (EWTUSHICK et al, 2000) alors que celle de cystine a réduit la masse du tube digestif (HARTE et al, 2003). Malgré les progrès récents réalisés dans la compréhension du métabolisme des acides aminés dans les tissus digestifs, des travaux complémentaires sont cependant nécessaires pour préciser les doses efficaces (BURRIN et STOLL, 2003).

Concernant le rôle des fibres alimentaires, les résultats sont contrastés (revue de JENSEN et al, 2003). Alors que dans certaines études, danoises notamment, les fibres réduisaient les populations de coliformes, d'autres études, essentiellement australiennes, ont montré que certaines fibres favorisaient les colibacilloses post-sevrage (McDONALD et al, 1999, 2001). Une telle controverse existe aussi concernant l'impact des fibres sur certaines infections (*Brachyospira hyodysenteriae*) du porc en croissance (revue de JENSEN et al, 2003). Une certaine prudence est donc de mise dans l'utilisation des fibres alimentaires, selon leur nature. En revanche, une granulométrie grossière améliore l'état sanitaire digestif, malheureusement au détriment des performances, chez le porc en croissance (JENSEN et al, 2003). Ceci passe par un abaissement du pH et une augmentation des concentrations en acides organiques volatiles dans l'estomac, une augmentation des densités de bactéries anaérobies (lactiques, en particulier) et de la diversité taxonomique bactérienne, une réduction de la densité des

entérobactéries et enfin, un développement accru des levures. Les aliments grossiers stimulent aussi la prolifération cellulaire épithéliale et la production de mucus dans le côlon (BRUNSGAARD, 1998). Ces effets restent à démontrer chez le porcelet au sevrage.

Ces résultats montrent que plusieurs voies alimentaires de prévention et/ou d'amélioration des troubles digestifs post-sevrage sont possibles. Des travaux complémentaires sont nécessaires pour étudier l'intérêt d'associations de composés, tant les problèmes sont complexes.

#### CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

D'une manière générale, les travaux portant sur le sevrage du porcelet en relation avec la santé digestive sont difficilement dissociables des études de développement du tube digestif. En effet, le sevrage intervient à un moment important du développement, et celui-ci n'est pas encore suffisamment bien connu.

De nombreux facteurs interagissent au sevrage pour générer des changements spatio-temporels dans l'anatomie, l'écologie et les fonctions physiologiques et immunitaires du tube digestif. Du point de vue physiologique, la période post-sevrage peut être subdivisée en deux phases, la première aiguë (ou dégénérative) et la suivante adaptative (ou régénérative). La phase aiguë inclut une atrophie et une dégradation précoces des tissus digestifs, une inflammation et une sur-expression transitoire des systèmes de cytoprotection. Ensuite, à la plupart de ces événements précoces se substitue une phase de restauration qui se caractérise globalement par une priorité du tube digestif, comparativement au muscle, pour la synthèse protéique et l'utilisation des acides aminés. Plusieurs paramètres de la physiologie intestinale vont se stabiliser à des valeurs de type adulte, reflétant ainsi une maturation profonde des fonctions digestives au cours du sevrage. L'évolution intégrée de ces modifications complexes et les régulations mises en jeu demeurent largement méconnues.

Du point de vue microbiologique, le sevrage est caractérisé par de nombreux changements dont les importances qualitative et quantitative étaient difficiles à évaluer globalement par les techniques microbiologiques classiques. Les premiers résultats apportés par les techniques moléculaires montrent que la diversité taxonomique et la stabilité des communautés bactériennes du tube digestif sont fortement influencées par le sevrage. Ces techniques ouvrent des perspectives prometteuses dans la compréhension des changements microbiologiques, mais aussi pour étudier les interactions entre la microbiologie, la physiologie et l'immunologie intestinales. Ceci devrait contribuer à optimiser les voies alimentaires et environnementales de gestion de la santé digestive.

Le système immunitaire digestif se révèle être d'une grande complexité, tant anatomique que fonctionnelle, notamment sous l'angle du développement. Les perturbations du sevrage sont en grande partie liées à l'immaturation caractérisée du système immunitaire et elles influencent son évolution à plus long terme. Actuellement, les mécanismes par lesquels la colonisation microbienne potentialise le développement

immunitaire et module les réponses immunitaires adaptatives sont mal connus. La fonction de barrière intestinale et l'immunité est très importante physiologiquement. Elle est le reflet des interactions complexes entre les micro-organismes et les cellules épithéliales et immunitaires. Il est probable que même à l'intérieur de l'écosystème complexe du tube digestif, les antigènes des bactéries dominantes orientent et déterminent les réponses immunitaires. Il est donc important d'élucider ces mécanismes d'action et d'évaluer l'impact de ces antigènes sur l'homéostasie immunitaire.

Concernant les alternatives à l'usage des antibiotiques dans les aliments pour porcelets, des solutions ont été apportées et des progrès dans la compréhension des mécanismes d'action ont été réalisés au cours des dernières années. Cependant,

l'amélioration de leur efficacité et le développement de nouvelles stratégies d'élevage et d'alimentation passent par une meilleure analyse des interactions entre nutrition, physiologie, microbiologie et immunologie du tube digestif.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'Union Européenne pour son soutien financier dans le cadre du projet européen HEALTHYPIGUT (contrat n° QLK5-CT-2000-00522). Les auteurs sont seuls responsables de la publication et le manuscrit ne représente pas l'opinion de la Commission Européenne qui ne peut pas être tenue pour responsable de l'information délivrée. Les auteurs remercient les partenaires du projet dont l'activité a permis d'élaborer ce texte.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADEGOKE O.A.J., McBURNEY M.I., SAMUELS S.E., BARACOS V.E., 2003. *Am. J. Physiol.*, 284, G1017-G1026.
- AKKERMANS A.D.L., KONSTANTINOV S.R., ZHU W.Y., FAVIER C.F., WILLIAMS B.A., 2003. In "Proceedings of the 9<sup>th</sup> International symposium on digestive physiology in pigs", vol. 1, 49-56. BALL R.O., éd., Banff, AB, Canada.
- BAILEY M., HALL L., BLAND P.W., STOKES C.R., 1994. *Immunology*, 82, 577-583.
- BAILEY M., PLANKETT F., CLARKE A., 1998. *Scand. J. Immunol.*, 48, 177-182
- BOUDRY G., PERON V., LALLES J.P., SEVE, B., 2003a. In "Proceedings of the 9<sup>th</sup> International symposium on digestive physiology in pigs", vol. 2, 195-197. BALL R.O., éd., Banff, AB, Canada.
- BOUDRY G., PERON V., LALLES J.P., SEVE, B., 2003b. In "Proceedings of the 9<sup>th</sup> International symposium on digestive physiology in pigs", vol. 2, 121-123. BALL R.O., éd., Banff, AB, Canada.
- BRANDTZAEG P.E., 2002. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 964, 13-45.
- BROOKS P.H., MORAN C.A., BEAL J.D., DEMECKOVA V., CAMPBELL A., 2001. In "The weaner pig : nutrition and management", 153-178, Varley M.A., WISEMAN J., éd. CAB International, Wallingford, U.K.
- BRUNSGAARD G., 1998. *J. Anim. Sci.*, 76, 2787-2798.
- BURRIN D.G., STOLL B., JIANG R., CHANG X., HARTMANN B., HOLST J.J., GREELY G.H., REEDS P.J., 2000. *Am. J. Clin.Nutr.*, 71, 1603-1610.
- BURRIN D., STOLL B., 2003. In "Proceedings of the 9<sup>th</sup> International symposium on digestive physiology in pigs", vol. 1, 121-138. BALL R.O., éd., Banff, AB, Canada.
- DAVID J.C., GRONGNET J.F., LALLES J.P., 2002. *J. Nutr.*, 132, 2551-2561.
- DUNSFORD B.R., HAENSLY W.E., KNABE D.A., 1991. *Am. J. Vet. Res.*, 52, 1743-1746.
- EWTUSHICK A.L., BERTOLO R.F.P., BALL R.O., 2000. *Can. J. Anim. Sci.*, 80, 653-662.
- FAVIER C.F., LALLES J.P., SEVE B., 2002a. *Reprod. Nutr. Dev.*, 42, 18-19.
- FAVIER C.F., VAUGHAN E.E., DE VOS W.M., AKKERMANS A.D.L., 2002b. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 219-226.
- FAVIER C., LALLES J.P., SEVE, 2003. In "Proceedings of the 9<sup>th</sup> International symposium on digestive physiology in pigs", vol. 2, 102-104. BALL R.O., éd., Banff, AB, Canada.
- FEDER M., HOFMANN G.E., 1999. *Annu. Rev. Physiol.*, 61, 243-282.
- FLYNN N.E., WU G., 1997. *J. Nutr.*, 127, 732-737.
- FLYNN N.E., MEININGER C.J., KELLY K., ING N.H., MORRIS S.M., WU G., 1999. *J. Nutr.*, 129, 799-803.
- GORANSSON, L., 1997. In "Recent advances in animal nutrition", 45-56. GARNSWORTHY P.C., WISEMAN J., éd., Nottingham University Press, Nottingham, U.K.
- GRONGNET J.F., DAVID J.C., 2003. *Dig. Dis. Sci.*, 48, 365-372.
- HARTE R.D., SHOVELLER H.K., BERTOLO R.F.P., BALL R.O., 2003. "Proceedings of the 9<sup>th</sup> International symposium on digestive physiology in pigs", vol. 2, 213-215. BALL R.O., éd., Banff, AB, Canada.
- HAVERSON K., BAILEY M., STOKES C.R., 1999. *Immunology*, 96, 66-73.
- JENSEN B.B., HOJBERG O., MIKKELSEN L.L., HEDEMANN M.S., CANIBE N., 2003. In "Proceedings of the 9<sup>th</sup> International symposium on digestive physiology in pigs", vol. 1, 103-119. BALL R.O., éd., Banff, AB, Canada.
- JIANG R., CHANG X., STOLL B., FAN M.Z., ARTHINGTON J., WEAVER E., CAMPBELL X., BURRIN D.G., 2000. *J. Nutr.*, 130, 21-26.
- KLUJESS J., AKKERMANS A.D.L., KONSTANTINOV S.R., KUHLA S., KWELLA M., SOUFFRANT W.B., 2003. *Early Hum. Dev.*, sous presse.
- KONSTANTINOV S.R., ZHU W.Y., WILLIAMS B.A., TAMMINGA S., DE VOS W.M., AKKERMANS A.D.L., 2003. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 43, 225-235.
- LALLES J.P., SALMON H., 1994. In "6<sup>th</sup> international symposium on digestive physiology in pigs", E.A.A.P. publication n° 80, vol. 1, 295-307. SOUFFRANT W.B., HAGEMEISTER H., éd. Bad-Doberan, Germany.
- LALLES J.P., BOUDRY G., FAVIER C., LE FLOCH N., LURON I., MONTAGNE L., OSWALD I.P., PIE S., PIEL C., SEVE B., 2003. In "Proceedings of the 9<sup>th</sup> International symposium on digestive physiology in pigs", vol. 1, 87-102. BALL R.O., éd., Banff, AB, Canada.
- LESER T.D., AMENUVOR J.Z., JENSEN T.K., LINDECORONA R.H., BOYE M., MOLLER K., 2002. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 673-690.
- MACKIE R.I., SGHIR A., GASKINS R.H., 1999. *Am. J. Clin. Nutr.*, 69, 1035S-1045S.
- MALAGO J.J., KONINKX J.F.J.G., VAN DIJK J.E., 2002. *Cell Stress & Chaperones*, 7, 191-199.
- MATHEW A.G., UPCHURCH W.G., CHATTIN S.E., 1998. *J. Anim. Sci.*, 76, 429-434.

- McCracken B.A., Spurlock M.E., Roos M.A., Zuckermann F.A., Gaskins H.R., 1999. *J. Nutr.*, 129, 613-619.
- McDonald D.E., Pethick D.W., Pluske J.R., Hampson D.J., 1999. *Res. Vet. Sci.*, 67, 245-250.
- McDonald D.E., Pethick D.W., Mullan P.B., Hampson D.J., 2001. *Br. J. Nutr.*, 86, 487-498.
- Miller B.G., Newby T.J., Stokes C.R., Hampson D.J., Brown P.J., Bourne P.J., 1984. *Am. J. Vet. Res.*, 45, 1730-1733.
- Miller B.G., Whittemore C.T., Stokes C.R., Temo E., 1994. *Brit. J. Nutr.*, 71, 615-625.
- Nabuurs M.J., Hoogendoorn A., van Zijderfeld-van Bommel A., 1996. *Res. Vet. Sci.*, 61, 72-77.
- Owusu-Asiedu A., Baidoo S.K., Nyachoti C.M., Marquardt R.R., 2002. *J. Anim. Sci.*, 80, 2895-2903.
- Pie S., Lalles J.P., Oswald I., 2003. In "Proceedings of the 9<sup>th</sup> International symposium on digestive physiology in pigs", vol. 2, 99-101. BALL R.O., éd., Banff, AB, Canada.
- Pluske J.R., Hampson D.J., William I.H., 1997. *Livest. Prod. Sci.*, 51, 215-236.
- Ren H., Musch M.W., Kojima K., Boone D., Ma A., Chang E.B., 2001. *Gastroenterology*, 121, 631-639.
- Savage D.C., 1977. *Annu. Rev. Microbiol.*, 31, 107-133.
- Seve B., Reeds P.J., Fuller M.F., Cadanhead A., Hay S.M., 1986. *Reprod. Nutr. Dev.*, 26, 849-861.
- Sève B., Lahaye L., 2003. In "Proceedings of the 9<sup>th</sup> International symposium on digestive physiology in pigs", vol. 1, 263a-263y. BALL R.O., éd., Banff, AB, Canada.
- Spreeuwenberg M.A.M., Verdonk J.M.A.J., Gaskins H.R., Versteegen M.W.A., 2001. *J. Nutr.*, 131, 1520-1527.
- Spreeuwenberg M.A.M., 2002. Diet composition and gut integrity in weaned piglets. PhD thesis, University of Wageningen, The Netherlands.
- Steidinger M.U., Goodband R.D., Tokach M.D., Nelssen J.L., Dritz S.S., Borg B.S., Campbell J.M., 2002. *J. Anim. Sci.*, 80, 3065-3072.
- Stokes C.R., Miller B.G., Bailey M., Wilson A.D., Bourne F.J., 1987. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 413-423.
- Stokes C.R., Bailey M., Haverson K., 2000. In "Proceedings of the 8<sup>th</sup> symposium on digestive physiology of pigs", 59-65. Lindberg J.E., Ogle B., éd., CABI publishing, Wallingford, Oxon, U.K.
- Touchette K.J., Carroll J.A., Allee G.L., Matteri R.L., Dyer C.J., Beausang L.A., Zannelli M.E., 2002. *J. Anim. Sci.*, 80, 494-501.
- Tsukimi Y., Okabe S., 2001. *Biol. Pharmacol. Bull.*, 24, 1-9.
- Van Dijk A.J., Everts H., Nabuurs N.J.A., Margry R.J.C.F., Beynen A.C., 2001. *Livest. Prod. Sci.*, 68, 263-274.
- Van Dijk A.J., Enthoven P.M.M., Van den Hoven S.G.C., Van Laarhoven M.M.M.H., Niewold T.A., Nabuurs N.J.A., Beynen A., 2002. *Vet. Microbiol.*, 84, 207-218.
- Whary M.T., Zarkower A., Confer F.L., Ferguson F.G., 1995. *Cell. Immunol.*, 163-215-221.
- Wischmeyer P.E., Musch M.W., Madonna M.B., Thisted R., Chang E.R., 1997. *Am. J. Physiol.*, 272, G879-G884.
- Wu G., Borbolla A.G., Knabe D.A., 1994. *J. Nutr.*, 124, 2437-2444.

