

Influence du *Pediococcus acidilactici* et du *Saccharomyces cerevisiae boulardii* sur l'immunité du porcelet et la translocation bactérienne

Martin LESSARD (1), Marie DUPUIS (1), Nathalie GAGNON (1), Jacques J. MATTE (1), Éric NADEAU (2), John M. FAIRBROTHER (2), Jacques GOULET (3,4)

(1) Agriculture et agroalimentaire Canada, Centre de R & D sur le bovin laitier et le porc, Lennoxville, Québec, Canada J1M 1Z3

(2) Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 2M

(3) Université Laval, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Québec, Canada G1K 7P4

(4) Institut Rosell Lallemand Inc., Montréal, Québec, Canada H2P 2M5

Avec la collaboration du personnel opérationnel sous la direction de Dominique MORRISSETTE

Influence des probiotiques *Pediococcus acidilactici* et du *Saccharomyces cerevisiae boulardii* sur l'immunité du porcelet et la translocation bactérienne

Dans cette étude, l'influence de deux probiotiques, le *Pediococcus acidilactici* (PA) et la levure *Saccharomyces cerevisiae boulardii* (SC), sur le développement de la réponse immunitaire et la translocation bactérienne a été étudiée. Dès la naissance, des portées de porcelets ont été distribuées entre les cinq traitements suivants : 1) témoin sans antibiotique ou 2) avec tiamuline (Tém+antib), 3) PA, 4) SC et 5) PA+SC. Pendant la lactation, chaque probiotique a été administré oralement trois fois par semaine. Au sevrage (jour 21), les probiotiques et l'antibiotique ont été ajoutés à l'aliment. Parmi les porcs sevrés, quatre ont été injectés avec de l'ovalbumine aux jours 21 et 32 et trois d'entre eux ont subi une épreuve d'infection avec *E. Coli*. Trois porcelets par portée ont été euthanasiés aux jours 18, 24 ou 52. Des échantillons de sang, d'iléon et de ganglions mésentériques (GM) ont été prélevés pour caractériser les cellules mononucléaires. Au niveau de l'iléon, le pourcentage de cellules CD8⁺ dans l'iléon est plus élevé (P = 0,06) chez les porcelets traités avec PA que chez les témoins et ceux traités avec PA+SC avant le sevrage. Au niveau des GM, des résultats similaires ont été obtenus montrant que les porcelets traités avec PA ont un nombre plus élevé (P = 0,10) de cellules CD4-CD8^{high} que ceux du groupe témoin ou traités avec PA+SC avant le sevrage. Suite à l'épreuve d'infection, le nombre de bactéries dans les GM des porcelets témoins est plus élevé que ceux observés chez les porcelets des autres groupes expérimentaux. Les résultats suggèrent que PA et SC peuvent être bénéfiques pour la santé des porcs.

The influence of *Pediococcus acidilactici* and *Saccharomyces cerevisiae boulardii* as probiotics on the porcine immunity and bacterial translocation

The influence of *Pediococcus acidilactici* (PA) and *Saccharomyces cerevisiae ssp. Boulardii* (SC), on immunity and bacterial translocation in piglets was evaluated. Litters were allocated to the following treatments: 1) Control without antibiotic or 2) with tiamulin as antibiotic (Ctr+antib); 3) PA; 4) SC; and 5) PA+SC. During lactation, probiotics were given orally three times a week. After weaning on day 21, probiotics and the antibiotic were incorporated into the diet. Among weaned piglets, four were injected with ovalbumine on days 21 and 32 to measure antibody response. They were also challenged with *E. coli* on days 49 to 51. Three piglets per litter were slaughtered at 18, 24 or 52 days of age. Blood, ileum and mesenteric lymph nodes (MLN) samples were taken to characterize mononuclear cell populations. A treatment by day interaction (P = 0.06) indicated that CD8⁺ cell population in the ileum was increased in PA compared to PA+SC and control before weaning whereas there was no difference after weaning. In the MLN, a treatment by day interaction (P = 0.10) showed that CD4-CD8^{high} cell population was increased before weaning in PA compared to PA+SC and to control. After challenge, bacterial translocation in MLN was higher in control than in other groups (P < 0.05). The influence of PA and SC on establishment of mononuclear cells in the intestine and on bacterial translocation after challenge suggests that these probiotics could protect the host against bacterial invasion and be beneficial for the health of the host.

INTRODUCTION

Il est reconnu que la période de sevrage est une période très critique pour les porcelets puisqu'ils sont soumis à plusieurs stress. Cette période est souvent marquée par un ralentissement de la croissance et une plus grande morbidité. Au Canada, afin d'améliorer les performances de croissance des porcelets et de prévenir les infections causées par des bactéries pathogènes durant cette période, les éleveurs ont encore recours aux aliments médicamenteux qui contiennent des antibiotiques. Cependant, cet usage des antimicrobiens est sévèrement critiqué dû à l'acquisition possible d'une résistance à ces derniers par les microorganismes pathogènes. Ainsi, la prévalence croissante de la résistance aux agents antimicrobiens chez les bactéries constitue un phénomène inquiétant et lourd de conséquences en ce qui concerne le traitement et la prévention des maladies infectieuses tant chez l'animal que chez l'humain.

Les additifs et les ingrédients susceptibles de remplacer les antibiotiques comme facteurs de croissance sont nombreux mais pour plusieurs leur efficacité reste à démontrer. Parmi ces produits, les probiotiques suscitent beaucoup d'intérêt. Le terme « probiotiques » est utilisé pour définir les préparations de microorganismes qui sont ajoutées aux aliments pour améliorer la santé de l'hôte. Les microorganismes les plus fréquemment utilisés dans les préparations de probiotiques sont principalement des bactéries lactiques Gram positives. Des levures le sont aussi, la plus utilisée étant le *Saccharomyces cerevisiae*. Bien que plusieurs études suggèrent que les probiotiques améliorent les performances des porcelets après le sevrage (ABE et al, 1995 ; SIMON et al, 2003 ; HUANG et al, 2004), les mécanismes d'action sont toujours mal connus. Un certain nombre de mécanismes biologiques plausibles a été suggéré pour expliquer les effets bénéfiques sur la santé, cependant les données scientifiques disponibles ne sont pas toujours suffisantes pour les supporter. Parmi les mécanismes étudiés, les effets stimulants ou régulateurs des probiotiques sur la réponse immunitaire ont fait l'objet de plusieurs travaux de recherche (DUGAS et al, 1999 ; ISOLAURI et al, 2001) mais peu ont été réalisés chez le porcelet. Dans cette étude, nous avons évalué l'influence de deux probiotiques, soit le *Pediococcus acidilactici* et la levure *Saccharomyces cerevisiae boulardii*, sur les performances et le développement de la réponse immunitaire humorale et intestinale.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Animaux et protocole expérimental

Quarante-deux truies Yorkshire-Landrace fournies par la COOP Fédérée et réparties en 6 livraisons ont été utilisées. Après la synchronisation des chaleurs, les truies ont été saillies avec de la semence porcine éprouvée fournie par le Centre d'insémination porcine du Québec. Une semaine avant la parturition, cinq truies ont été transférées dans une des cinq salles de maternité disponibles pour l'expérience (un traitement par salle) selon un dispositif en bloc complet. Après les mises-bas, les tailles de portées ont été ajustées à 10 porcelets ; selon les besoins, les porcelets des truies ges-

tantes supplémentaires ont été utilisés. À la naissance des porcelets, les cinq traitements expérimentaux suivants ont été attribués aux portées : portée recevant 1) du *Pediococcus acidilactici* (PA) 2) du *Saccharomyces cerevisiae boulardii* (SC) 3) du PA+SC 4) aucun probiotique (témoin) et 5) aucun probiotique mais dont l'aliment au sevrage contenait un antibiotique, la tiamuline (témoin+antibio). L'administration des probiotiques a commencé un jour après la naissance. Pendant la lactation, 1×10^9 unités formant des colonies (CFU) dans 2 ml d'eau peptonée ont été administrées trois fois par semaine. Les groupes témoins ont reçu 2 ml d'eau peptonée sans probiotiques. Au sevrage à l'âge de 21 jours, les porcelets de chaque portée ont été transférés dans leur chambre respective afin d'éviter les problèmes de contamination entre les traitements probiotiques qui ont été ajoutés à un niveau de 1×10^9 CFU/kg d'aliment de sevrage fourni par la COOP fédérée.

Trois porcelets par portées ont été euthanasiés 3 jours avant et trois autres après le sevrage. Des échantillons de sang, d'iléon et de ganglions mésentériques ont été prélevés pour caractériser les différentes populations leucocytaires et évaluer la translocation bactérienne, tel que décrit ci-dessous. Les autres porcelets sevrés ont été gardés jusqu'à la fin de l'essai, à l'âge de 52 jours. Ces derniers ont reçu une première injection d'ovalbumine (OVA) le jour du sevrage et une seconde à 32 jours. Ils ont également tous reçu, par voie orale aux jours 27 et 40, 1×10^9 CFU de la souche de *E. coli* JFF4 non virulente. Des échantillons de sang ont été prélevés aux jours 21, 32, 42 et 52 afin de déterminer la concentration sérique en anticorps dirigés contre l'OVA. Au jour 45, trois porcelets par traitement ont été transférés dans les facilités du Laboratoire d'hygiène vétérinaire et alimentaire, situé à St-Hyacinthe, pour exécuter l'infection d'épreuve avec une souche pathogène de *E. coli* O149:K49, STa STb LT F4(K88). Aux jours 49, 50 et 51, les animaux ont reçu une dose de 1×10^9 de cette souche d'*E. coli* entérotoxino-gène. Les animaux ont été euthanasiés au jour 52 et des prélèvements de ganglions mésentériques ont été faits pour évaluer la translocation bactérienne.

1.2. Dosage des populations lymphocytaires intestinales

Aux jours 18 et 24, des cellules mononuclées du sang et de suspensions de cellules de ganglions mésentériques ont été isolées sur un gradient de densité Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Québec, Canada) et remises en suspension dans du RPMI-1640 (Invitrogen Canada Inc., Ontario, Canada) enrichi avec 0,5 % d'albumine bovine (BSA) et 1 % d'un cocktail d'antibiotique et d'antifongique (Invitrogen Canada Inc., Ontario, Canada). Des segments d'iléon distal de 20 cm ont aussi été prélevés et digérés avec de la collagénase pendant 1 heure. Après la digestion, les cellules mononuclées intestinales en suspension ont été isolées sur un gradient de Percoll (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Québec, Canada). Les différentes populations de lymphocytes T (CD4 et CD8), de lymphocytes B (Ig) et de monocytes/macrophages (SWC3) ont été caractérisées par cytométrie en flux comme décrit précédemment (YANG et al, 1996). Des échantillons de sang ont également été prélevés

aux jours 42 et 52 pour caractériser les différentes populations de leucocytes du sang.

1.3. Dosage des anticorps

La concentration des anticorps spécifiques dirigés contre OVA a été déterminée par ELISA selon le protocole décrit par MAL-LARD et al (1997) auquel des modifications mineures ont été apportées. Les valeurs d'absorbance obtenues ont été utilisées pour calculer le niveau d'anticorps de chaque échantillon en utilisant comme référence un sérum témoin positif dilué en série. Une valeur arbitraire de 100 a été donnée à la première dilution de 1/500 du sérum témoin.

1.4. Mesure de la translocation bactérienne dans les ganglions mésentériques

Les ganglions mésentériques bordant l'iléon ont été prélevés, congelés immédiatement dans l'azote liquide et entreposés à -80°C. La translocation des bactéries aérobies à partir de ces ganglions a été mesurée comme suit : 0,1 g de ganglion a été homogénéisé dans 1ml de PBS 1X stérile. Deux séries de dilution 1/10 ont été faites dans du tampon phosphate stérile à partir de l'homogénat. Par la suite, 0,1 ml de chacune des dilutions ainsi que de l'homogénat ont été étalés stérilement sur une gélose au sang. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37°C pendant 3 jours. Le décompte des colonies a été fait seulement sur les boîtes ayant entre 20 et 300 CFU.

1.5. Analyses statistiques

Une analyse de variance selon un dispositif en blocs complets aléatoires a été effectuée pour déterminer l'effet des traitements sur les différents paramètres mesurés et cela en considérant au terme d'erreur l'effet portée. Lorsqu'une différence significative était détectée, une analyse de comparaisons multiples de type Dunnett a été faite afin de comparer le traitement témoin+antibio avec les autres groupes expérimentaux. Un test de Tukey a été aussi fait pour comparer les différents groupes entre eux.

2. RÉSULTATS

2.1. Influence de l'administration de *P. acidilactici* et de *S. cerevisiae boulardii* sur la croissance des porcelets

L'administration des probiotiques PA et SC, séparément ou ensemble, n'a pas affecté la croissance des porcelets pendant la lactation et après le sevrage comparativement aux

gains de poids observés chez le groupe témoin (tableau 1). Toutefois, dans la semaine avant le sevrage (J14 à J21), les résultats montrent que les porcelets qui ont reçu PA+SC ont tendance à avoir des gains de poids supérieurs à ceux traités avec PA ou SC ($P < 0,15$) alors qu'il n'y a pas de différence avec ceux du groupe témoin.

2.2. Influence de l'administration de *P. acidilactici* et de *S. cerevisiae boulardii* sur les populations lymphocytaires intestinales et du sang

Parmi les lymphocytes T isolés de l'iléon, seuls les lymphocytes T CD8⁺ étaient en nombre suffisamment important pour être analysés par cytométrie en flux dans nos conditions de marquage. Une interaction entre l'effet traitement et jours de prélèvements ($P = 0,06$) indique que les animaux traités avec PA ont des pourcentages de cellules CD8⁺ plus élevés que ceux ayant reçu PA+SC avant le sevrage alors que cette différence entre les traitements disparaît après le sevrage (tableau 2). Quant au pourcentage de lymphocytes B dans la muqueuse iléale, il tend à être plus élevé ($P = 0,08$) chez les animaux prélevés au jour 24 par rapport à ceux prélevés au jour 18. Celui des macrophages n'est pas affecté par les traitements probiotiques et le sevrage.

L'analyse des cellules isolées à partir des ganglions mésentériques (tableau 3) a montré que le nombre de lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺, incluant les CD8 à fluorescence faible (CD8^{+,low}) et élevé (CD8^{+,high}), diminue significativement (effet jour : $P < 0,001$) après le sevrage. Une interaction traitement x jour indique également que les pourcentages de cellules CD4⁺CD8^{+,high} sont plus élevés chez les porcelets traités avec PA comparativement à ceux des groupes témoin et PA+SC avant le sevrage, alors qu'après le sevrage les pourcentages de CD8^{+,high} sont comparables entre les différents traitements. Quant aux pourcentages de lymphocytes B, ceux-ci ne sont pas affectés par les traitements mais tendent à augmenter après le sevrage (effet jour : $P < 0,08$).

Au moment du sevrage, les populations de lymphocytes CD8⁺ dans le sang fluctuent de façon similaire. Ainsi, une baisse significative du nombre relatif de toutes les populations CD8⁺, sauf les CD4⁺CD8^{+,high}, survient après le sevrage (effet jour : $P < 0,01$). Quant au pourcentage de CD4⁺, il tend à augmenter après le sevrage ($P < 0,07$) et tend à être plus élevé chez les témoins comparativement aux animaux traités avec PA ou PA+SC. Pendant cette même période (jours 18 et 24), les pourcentages de lymphocytes B et de monocytes en circulation ne sont pas affectés significativement par les probiotiques et par le sevrage.

Tableau 1 - Influence de l'administration de probiotiques sur la croissance des porcelets

Gain de poids (kg)	Témoin	Témoin + antibio	<i>P. acidilactici</i> (PA)	<i>S. cerevisiae</i> (SC)	PA + SC	Probabilité d'un effet (1)
J1 à J14	3,22 ± 0,13	---	3,13 ± 0,18	3,35 ± 0,18	3,31 ± 0,13	NS
J1 à J21	5,40 ± 0,22	---	5,17 ± 0,31	5,43 ± 0,32	5,77 ± 0,30	NS
J14 à J21	2,12 ± 0,10	---	1,99 ± 0,14	1,99 ± 0,14	2,39 ± 0,14	0,15
J21 à J27	2,10 ± 0,18	1,69 ± 0,17	1,99 ± 0,17	2,09 ± 0,18	1,69 ± 0,17	NS
J21 à J42	8,77 ± 0,58	8,78 ± 0,56	9,26 ± 0,56	8,84 ± 0,63	8,38 ± 0,56	NS

(1) NS = non significatif

Tableau 2 - Populations de lymphocytes (pourcentage du nombre de cellules totales) dans l'iléon chez des porcelets ayant reçu un régime de base avec ou sans antibiotique (Tém ; Tém + antib) ou enrichi en *P. acidilactici* (PA) et/ou en *S. cerevisiae* (SC ; PA + SC)

Population	Jour (Jr)	Traitements (Tr) (1)					SEM	Probabilité d'un effet		
		Tém	Tém + antib	PA	SC	PA + SC		Tr	Jr	Tr x Jr
CD4 ⁺	18	nd	nd	nd	nd	nd	---	---	---	---
	24	nd	nd	nd	nd	nd	---	---	---	---
CD8 ⁺	18	9,7	11,7	18,2	13,1	8,4	2,8	NS	0,04	0,06
	24	10,21	9,4	9,5	9,6	9,4	2,8			
Lymphocyte B	18	50,4	63,5	58,7	49,0	56,4	18,7	NS	0,01	NS
	24	76,6	68,6	75,8	76,2	74,2	3,4			
Macrophages	18	17,8	24,8	30,2	23,8	30,9	8,4	NS	NS	NS
	24	23,9	24,4	27,5	27,1	25,5	5,6			

(1) nd = non détecté ; SEM : Erreur standard ; NS = non significatif ($P > 0,10$)

Tableau 3 - Populations de lymphocytes (pourcentage du nombre de cellules totales) dans les ganglions mésentériques chez des porcelets ayant reçu un régime de base avec ou sans antibiotique (Tém ; Tém + antib) ou enrichi en *P. acidilactici* (PA) et/ou en *S. cerevisiae* (SC ; PA + SC)

Population	Jour (Jr)	Traitements (Tr) (1)					SEM (1)	Probabilité d'un effet		
		Tém	Tém + antib	PA	SC	PA + SC		Tr	Jr(1)	Tr x Jr
CD4 ⁺	18	10,6	9,9	13,5	10,6	10,7	6,1	NS	0,001	NS
	24	1,7	2,0	2,4	3,5	1,6	1,6			
CD8 ⁺	18	22,4	25,0	27,8	19,5	24,4	3,8	NS	0,01	NS
	24	18,1	21,4	18,1	19,6	18,7	2,4			
CD8 ^{+,low}	18	18,4	18,7	19,8	15,9	18,9	3,4	NS	0,05	NS
	24	14,7	16,2	15,8	15,6	14,4	1,6			
CD8 ^{+,high}	18	4,1	6,4	7,9	4,0	5,47	1,6	NS	0,02	0,10
	24	3,4	4,7	2,5	4,0	4,4	1,4			
CD4 ⁺ CD8 ^{+,low}	18	7,7	8,1	9,2	6,3	7,9	2,9	NS	0,001	NS
	24	3,1	2,8	3,7	3,8	3,6	1,0			
CD4 ⁻ CD8 ⁺	18	17,7	17,2	18,9	15,7	16,9	3,0	NS	NS	NS
	24	15,5	17,8	15,3	16,4	15,4	2,2			
CD4 ⁻ CD8 ^{+,low}	18	12,4	10,6	10,6	10,5	11,0	3,6	NS	NS	NS
	24	11,6	13,4	12,5	11,9	10,8	1,6			
CD4 ⁻ CD8 ^{+,high}	18	3,6	5,5	7,0	3,5	4,8	1,4	NS	0,04	0,10
	24	3,2	3,8	2,1	3,7	4,0	1,3			
Lymphocyte B	18	22,1	24,7	25,6	27,0	22,3	7,4	NS	0,08	NS
	24	28,4	27,1	33,4	31,9	27,4	4,1			

(1) SEM : Erreur standard ; NS = non significatif ($P > 0,10$)

Durant la période de l'épreuve d'infection contre *E. coli*, seuls les pourcentages de monocytes sanguins sont affectés par les traitements, indiquant que leur niveau est significativement plus élevé chez les animaux ayant reçu du PA ($P < 0,01$) et tendait à l'être chez les porcs traités avec PA+SC comparativement à ceux alimentés avec un aliment enrichi d'un antibiotique. Par ailleurs l'effet « jour » démontre que toutes les populations de cellules, à l'exception des CD4⁺CD8^{+,high}, sont affectées par l'infection à *E. coli*, indiquant d'une part que les pourcentages de cellules CD8⁺ et de monocytes diminuent significativement ($P < 0,01$) entre les jours 42 et 52 alors que les pourcentages de lymphocytes T CD4⁺ et de lymphocytes B, respectivement, augmentent ($P < 0,05$) ou tendent à augmenter ($P = 0,08$).

2.3. Influence de l'administration de *P. acidilactici* et de *S. cerevisiae boulardii* sur la translocation bactérienne

Suite à l'épreuve d'infection effectuée avec une souche d'*E. coli* entérotoxigène, le nombre de bactéries aérobies (CFU/gr de ganglions mésentérique) est moins élevé ($P < 0,01$) chez les animaux alimentés avec un aliment médicamenté ou ayant reçu des probiotiques depuis la naissance comparativement aux porcs du groupe témoin qui n'ont pas reçu de probiotiques et d'antibiotique (figure 1). Aucune autre différence entre les traitements n'a été observée sur la translocation bactérienne vers les ganglions mésentériques.

Tableau 4 - Populations de lymphocytes (pourcentage du nombre de cellules totales) dans le sang périphérique chez des porcelets ayant reçu un régime de base avec ou sans antibiotique (Tém ; Tém + antib) ou enrichi en *P. acidilactici* (PA) et/ou en *S. cerevisiae* (SC ; PA + SC)

Population	Jour (Jr)	Traitements (Tr) (1)					SEM	Probabilité d'un effet		
		Tém	Tém + antib	PA	SC	PA + SC		Tr	Jr(1)	Tr x Jr(1)
CD4 ⁺	18	6,0	11,7	5,5	5,5	8,4	2,3	NS	0,07	0,07
	24	15,7	9,8	6,6	9,5	7,6	2,3			
	42	6,2	8,7	4,9	6,4	5,5	1,5			
	52	9,7	9,8	5,4	5,3	8,7	2,3			
CD8 ⁺	18	55,7	60,6	50,0	49,8	47,8	3,6	NS	0,01	NS
	24	42,9	43,9	45,7	39,8	47,6	6,5			
	42	55,6	54,3	59,7	52,4	57,4	5,6			
	52	46,8	49,1	53,6	53,6	49,9	5,1			
CD8 ^{+,low}	18	48,9	51,9	44,7	44,0	36,6	4,2	NS	0,001	NS
	24	35,7	32,1	32,8	29,3	38,8	5,2			
	42	35,8	29,4	30,3	28,1	38,6	5,3			
	52	24,1	24,4	30,2	30,4	23,6	4,2			
CD4 ⁺ CD8 ^{+,low}	18	3,3	6,2	3,5	2,7	4,6	1,1	NS	0,11	0,08
	24	7,9	4,6	4,0	5,4	4,0	1,1			
	42	3,5	3,8	2,7	3,4	3,3	0,5			
	52	5,0	4,5	4,3	3,9	4,4	0,8			
CD4 ⁻ CD8 ⁺	18	52,3	54,2	46,4	46,9	42,9	4,0	NS	0,01	NS
	24	34,7	38,5	41,1	34,0	42,8	6,3			
	42	51,7	49,7	56,3	48,4	53,8	5,7			
	52	40,3	43,5	48,0	48,5	43,5	5,1			
CD4 ⁻ CD8 ^{+,low}	18	45,7	45,7	41,2	41,4	32,0	4,8	NS	0,001	NS
	24	27,9	27,5	28,8	23,9	34,8	5,5			
	42	32,3	25,6	27,6	24,7	35,2	5,1			
	52	19,1	20,0	25,9	26,4	19,2	4,1			
CD4 ⁻ CD8 ^{+,high}	18	6,6	8,5	5,2	5,5	10,9	2,3	NS	NS	NS
	24	6,8	11,0	12,3	10,1	7,9	4,1			
	42	19,4	24,1	28,7	23,8	18,5	7,5			
	52	21,3	23,6	22,1	22,1	24,4	5,8			
Lymphocyte B	18	16,2	31,3	22,5	16,5	27,4	7,8	NS	NS	NS
	24	27,2	28,3	27,8	32,4	24,7	4,6			
	42	29,4	22,3	21,4	25,6	24,4	3,4			
	52	30,8	24,4	27,4	26,5	30,9	3,4			
Monocytes	18	12,5	20,0	18,0	12,7	14,5	4,7	NS	NS	NS
	24	17,3	17,2	17,2	16,7	23,9	3,2			
	42	14,2	10,6	12,2	11,3	13,8	2,2			
	52	7,79	5,4	11,1	8,3	10,1	1,7			

(1) Pour évaluer l'effet « Jour » les comparaisons ont été faites entre les jours 18 et 24 et les jours 42 et 52 ; NS = non significatif ; SEM = erreur standard

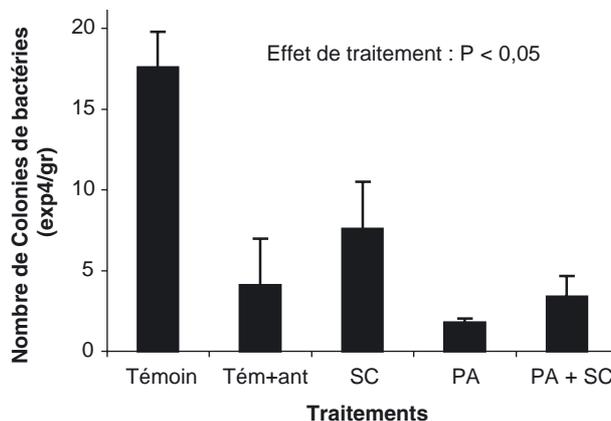


Figure 1 - Translocation bactérienne suite à une épreuve d'infection avec une souche d' *E. coli* entérotoxigène chez des porcs ayant reçu un régime de base avec ou sans antibiotique (Témoin ; Témoin + antibio) ou enrichi en *P. acidilactici* (PA) et/ou en *S. cerevisiae* (SC ; PA + SC)

2.4. Influence de l'administration de *P. acidilactici* et de *S. cerevisiae boulardii* sur la production d'anticorps contre OVA.

L'administration de probiotiques n'a pas eu d'effet significatif sur la production d'anticorps dirigée contre OVA (figure 2). Seul l'effet jour a été significatif ($P < 0,001$), indiquant une augmentation de la quantité d'anticorps spécifique contre OVA en réponse aux injections dans le temps.

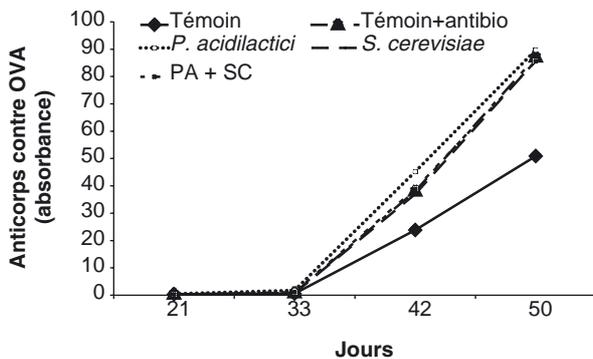


Figure 2 - Production d'anticorps contre ovalbumine (OVA) chez des porcs ayant reçu un régime de base avec ou sans antibiotique (Témoin ; Témoin + antibio) ou enrichi en *P. acidilactici* (PA) et/ou en *S. cerevisiae* (SC)

3. DISCUSSION

3.1. Effet des probiotiques sur la croissance, l'immunité et la translocation bactérienne

Les objectifs de cette étude étaient de vérifier l'influence d'administrer dès la naissance deux probiotiques, un de type bactérien le *Pediococcus acidilactici* et une levure le *Saccharomyces cerevisiae boulardii*, sur la croissance et sur le développement de la réponse immunitaire. Dans la présente étude, les deux probiotiques n'ont pas eu d'effet significatif sur la croissance des porcelets. Ce résultat contraste avec d'autres résultats rapportés dans la littérature qui suggèrent que l'utilisation de bactéries probiotiques tend à améliorer les performances des porcelets après le sevrage (ABE et al, 1995 ; SIMON et al, 2003 ; HUANG et al, 2004). Cependant, les effets sur la croissance ne sont pas toujours marqués puisque parmi plus d'une vingtaine d'études, seuls quelques travaux rapportent des effets significatifs sur les performances de croissance (SIMON et al, 2001). Un des inconvénients avec l'utilisation des probiotiques est l'hétérogénéité des résultats engendrés, sachant que l'efficacité relative des souches peut être grandement affectée par le contexte sanitaire. En effet, il semble que les bienfaits des probiotiques sur la santé sont supérieurs lorsque les animaux sont gardés dans des conditions sanitaires sous-optimales (FULLER, 1999). Des résultats similaires ont été rapportés chez des animaux ayant reçu un aliment médicamenteux (DRITZ et al, 2002). Ainsi, il est fort possible que l'absence d'effet sur les performances des animaux soit due en partie aux conditions sanitaires de très haut niveau qui sont maintenues dans nos installations expérimentales. D'autre part, l'hétérogénéité des résultats obtenus dans les divers travaux peut également s'expliquer par la grande variation de la

réponse individuelle des animaux à ce type d'additifs alimentaires.

Il est connu que les bactéries commensales jouent un rôle important dans le développement des fonctions immunitaires de l'intestin (KELLY et KING, 2003). Cependant les mécanismes précis par lesquels ces bactéries potentialisent et régulent les fonctions immunitaires de l'intestin durant la lactation et après le sevrage sont largement inconnus. Un des objectifs de la présente étude était donc d'évaluer l'influence de l'administration de probiotiques dès la naissance sur l'établissement dans l'iléon de cellules immunitaires qui débutent dès les premières semaines de vie et jouent un rôle important dans le développement et la régulation de réactions immunitaires innées et spécifiques (BAILEY et al, 2004). Les résultats obtenus montrent que l'administration de probiotiques a peu d'effet sur l'implantation des macrophages, des lymphocytes B et des lymphocytes T CD4⁺ au niveau de l'iléon puisque les pourcentages de ces populations de cellules étaient comparables entre les différents groupes expérimentaux. Les mêmes observations ont été faites pour les cellules isolées des ganglions mésentériques et les PBMC. Il est toutefois intéressant de noter qu'il y a une interaction entre les effets traitement et jour en ce qui concerne les cellules CD8⁺ dans l'iléon et les cellules CD8^{+,high} dans les ganglions mésentériques. Ce résultat suggère que l'administration de PA peut stimuler l'établissement de cellules CD8⁺ avant le sevrage alors qu'après le sevrage cette population revient à des niveaux comparables à ceux observés chez les porcs des autres groupes.

Suite à l'épreuve d'infection avec une souche d'*E. coli* entérotoxigène, une baisse significative des monocytes, des lymphocytes T CD8⁺ et des lymphocytes B survient dans le sang indépendamment des probiotiques ou de l'antibiotique ajoutés dans la ration alors que le nombre de lymphocytes T CD4⁺ augmente. Ces résultats suggèrent que l'administration de *E. coli* entérotoxigène par voie orale stimule l'immunité intestinale et la production de facteurs chimiotactiques qui peuvent provoquer la migration de certaines populations de cellules du sang périphérique vers les sites d'infection. À notre connaissance il n'y a pas de données disponibles sur les changements de populations leucocytaires suite à une infection avec *E. coli*. Cependant, une telle déplétion de différentes populations de leucocytes du sang a aussi été observée chez des porcs infectés avec le virus de la peste porcine classique dès les premiers jours (SUMMERFIELD et al, 2001). Dans cette expérience, il aurait été intéressant de caractériser les populations de leucocytes de l'iléon et des ganglions mésentériques mais les conditions expérimentales utilisées ne nous permettaient pas de préparer et de traiter convenablement les échantillons pour des fins d'analyse en cytométrie.

La présente étude montre également que le nombre de bactéries ayant transloqué vers les ganglions mésentériques après l'infection avec *E. coli* est fortement réduit chez les animaux traités avec les probiotiques ou l'antibiotique. Ce résultat supporte ceux obtenus dans d'autres travaux faits chez le rat indiquant que l'administration de probiotiques peut diminuer la translocation bactérienne (EIZAGUIRRE et al, 2002 ; SEEHOFER et al, 2004) et suggère que *P. acidilactici* et

S. cerevisiae boulardii peuvent protéger l'hôte contre l'invasion bactérienne et pourraient potentiellement être une approche à considérer pour réduire l'utilisation d'antibiotiques.

3.2. Effet du sevrage sur l'immunité intestinale

Il est intéressant de noter que le sevrage a un effet marqué sur les pourcentages des différentes populations de cellules. Les résultats montrent que le nombre de lymphocytes T CD8⁺ au niveau de l'iléon a diminué trois jours après le sevrage alors que celui des lymphocytes B et des macrophages, respectivement, augmente ou demeure inchangé comparativement aux nombres observés avant le sevrage. Suite au sevrage, il est donc probable qu'il y ait une perte importante de cellules immunitaires au sein de la muqueuse intestinale. Cette diminution des populations de cellules quelques jours après le sevrage peut être une conséquence de la baisse volontaire de la prise alimentaire qui alors prive l'intestin d'une quantité suffisante de digesta nécessaire au bon fonctionnement et au développement de l'intestin (PLUSKE, 2001). Cependant, ces résultats contrastent avec d'autres qui suggèrent que la privation de nourriture provoque non seulement une perte d'intégrité de la muqueuse intestinale, caractérisée par une diminution de la hauteur des villosités intestinales et de la profondeur des cryptes, mais induit aussi chez des porcs alimentés par voie parentérale ou sevrés avec différents régimes une augmentation du nombre de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ dans la lamina propria et les villosités du jéjunum et de l'iléon (GANESSUNKER et al, 1999; Mc CRACKEN et al., 1999). Quant au nombre de macrophages dans l'iléon qui demeure inchangé, ce résultat contraste avec celui de VEGA-LOPEZ et al (1995) qui ont rapporté une augmentation significative des macrophages/granulocytes dans les villosités de la région proximale de l'intestin alors que l'augmentation en lymphocytes B après le sevrage corrobore les résultats obtenus précédemment par BROWN et BOURNE (1976) et ROTHKÖTTER et al, (1991). Les différences observées entre nos résultats et ceux publiés par d'autres groupes de recherche peuvent être attribuées d'une part à une méthodologie différente utilisée pour mesurer les

différentes populations au niveau de la muqueuse intestinale et d'autre part au temps de prélèvement après le sevrage, puisque plusieurs changements peuvent survenir au cours des jours subséquents au sevrage dans les différentes populations de cellules qui s'établissent dans l'intestin. D'autres travaux sont donc nécessaires pour caractériser avec précision les changements qui surviennent au sein des différentes populations de leucocytes après le sevrage. Au niveau des ganglions mésentériques et des PBMC, des résultats similaires ont été observés pour les lymphocytes CD8⁺, les lymphocytes B et les monocytes sanguins et suggèrent que ces différentes populations de leucocytes sont affectées dans divers tissus en réponse au sevrage. Ces résultats corroborent ceux rapportés précédemment par SOLANO-AGUILAR et al (2001) qui indiquent également que d'importants changements surviennent dans les populations leucocytaires de différents tissus après le sevrage.

CONCLUSION

Les résultats suggèrent que l'administration de *P. acidilactici* et de *S. cerevisiae*, ensemble ou séparément, dès la naissance à des porcelets a peu d'influence sur l'implantation des macrophages, des lymphocytes B et des lymphocytes T CD4⁺ au niveau de l'iléon. Toutefois, ils indiquent que ces deux probiotiques ont le potentiel de stimuler l'établissement des cellules CD8⁺ dans l'iléon et les ganglions mésentériques et d'inhiber le passage des bactéries vers les ganglions mésentériques après une épreuve d'infection avec *E. coli*. D'autre part, d'importants changements surviennent dans les différentes populations de leucocytes du sang, des ganglions mésentériques et de l'iléon après le sevrage et l'administration de *E. coli* entérotoxigène. Les mécanismes d'action demeurent toutefois inconnus.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier l'Institut Rosell-Lallemand, la COOP fédérée et Agriculture et Agroalimentaire Canada pour avoir supporté financièrement le projet.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABE F., ISHIBASHI N., SHIMAMURA S., 1995. *J. Dairy Sci.*, 78, 2838-2846.
- BAILEY M., HAVERSON K., INMAN C., HARRIS C., JONES P., CORFIELD G., MILLER B., STOKES C., 2004. In "Proceeding of the 7th International veterinary immunology symposium" p. 83. National Research Council of Canada.
- BROWN P.J., BOURNE F.J., 1976. *Am. J. Vet. Res.*, 37, 1307-1314.
- DRITZ S.S., TOKACH M.D., GOODBAND R.D., NELSEN J.L. 2002. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 220, 1690-1695.
- DUGAS B., MERCENIER A., LENOIR-WIJNKOOP I., ARNAUD C., DUGAS N., POSTAIRE E. 1999. *Immunology Today.*, 9, 387-390.
- EIZAGUIRRE I, URKIA NG, ASENSIO AB, ZUBILLAGA I, ZUBILLAGA P, VIDALES C, GARCIA-ARENZANA JM, ALDAZABAL P., 2002. *J. Pediatr. Surg.*, 37, 699-702.
- FULLER R. 1999. In "Probiotics: a general review", pp 15-22. G. W. Tannock (éditeur). Horizon Scientific Press, Wymondham UK.
- GANESSUNKER D., GASKINS H.R., ZUCKERMANN F.A., DONOVAN S.M., 1999. *J. Parenter. Enteral Nutr.*, 23, 337-344.
- HUANG C.H., QIAO S.Y., LI D.F., PIAO X.S., REN J.P., 2004. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 17, 401-409.
- ISOLAURI E., SUTAS Y., KANKAANPAA P., ARVILOMMI H., SALMINEN S. 2001. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73, 444S-450S.
- KELLY D., KING T.P., 2001. In "Gut environment of pigs". 113-131. Nottingham University Press, 260 p.
- MALLARD B.A., WAGTER L.C., IRELAND M.J., DEKKERS J.C., 1997. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 60, 61-76.
- MC CRACKEN B.A., SPURLOCK M.E., ROOS M.A., ZUCKERMANN F.A., GASKINS H. R. 1999. *J. Nutr.*, 129, 613-619.

- PLUSKE, J.J., 2001. In "Gut environment of pigs". 1-27. Nottingham University Press, 260 p.
- ROTHKÖTTER H.J., ULBRICH H., PABST R., 1991. *Pediatr. Res.*, 29, 237-242.
- SOLANO-AGUILAR G.I., VENGROSKI K.G., BESHAN E., DOUGLASS L.W., LUNNEY J.K., 2001. *Dev. Comp. Immunol.*, 25, 245-263.
- SEEHOFFER D, RAYES N, SCHILLER R, STOCKMANN M, MULLER AR, SCHIRMEIER A, SCHAEFER F, TULLIUS SG, BENGMARK S, NEUHAUS P., 2004. *J. Surg. Res.*, 117, 262-271.
- SIMON O., JADAMUS A., VAHJEN W., 2001. *J. Anim. Feed Sci.*, 10 (suppl 1), 51-67.
- SIMON O., VAHJEN W., SCHAREK L. 2003. In "Proceeding of the 9th international symposium on digestive physiology in pigs", Volume 1, pp 295-318. Edited by R. O. Ball. Publié par l'University of Alberta.
- SUMMERFIELD A., MCNEILLY F., WALKER I., ALLAN G., KNOETIG S.M., MCCULLOUGH K.C., 2001. *Vet Immunol Immunopathol.*, 78, 3-19.
- VEGA-LOPEZ M.A, BAILEY M., TELEMEO E., STOKES C.R., 1995. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 44, 319-327.
- YANG H., PARKHOUSE R.M., 1996. *Immunology*, 89, 76-83.