

# Identification de marqueurs représentatifs des adaptations morphologiques et physiologiques du tube digestif chez le porcelet au sevrage

Lucile MONTAGNE (1, 2), Gaëlle BOUDRY (2), Isabelle Le HUEROU-LURON (2), Bernard SEVE (2), Jean-Paul LALLES (2)

(1) Agrocampus Rennes, Sciences et productions animales, 65 rue de Saint-Brieuc, 35042 Rennes Cedex

(2) Institut National de la Recherche Agronomique, UMR SENAH, 35590 Saint-Gilles

montagne@agrocampus-rennes.fr

## Identification de marqueurs représentatifs des adaptations morphologiques et physiologiques du tube digestif chez le porcelet au sevrage

Les adaptations morphologiques et physiologiques du tube digestif sont analysées pendant les quinze jours suivant le sevrage, dans l'objectif de proposer des variables marqueurs de ces modifications digestives post-sevrages. Soixante porcelets sont mis à jeun pendant 48h, puis alimentés par voie intra-gastrique avec un aliment à teneur modérée ou élevée en blé, et abattus en cinétique après le sevrage. Cinquante neuf variables se rapportant aux concentrations plasmatiques des hormones digestives, aux enzymes pancréatiques, aux poids des segments et contenus digestifs ainsi qu'à la morphométrie, aux enzymes, aux capacités sécrétoires et absorbatives et à la fonction de barrière de l'intestin sont étudiées par analyse en composantes principales. Les modifications temporelles induites par le sevrage, sur la structure et les fonctions digestives, se décomposent en une phase aiguë et immédiate après le sevrage, suivie d'une phase plus progressive d'adaptation et de maturation digestives. Les facteurs moteurs des changements observés sont la ré-alimentation et le temps, la composition de l'aliment n'ayant pas eu d'effet significatif dans notre expérience. La hauteur des villosités et la perméabilité aux macromolécules du jéjunum proximal, l'activité lactasique intestinale et la concentration plasmatique en cholécystokine peuvent être considérés comme des marqueurs de la réponse aiguë post-sevrage. Les variables mesurant les fonctions d'hydrolyse enzymatique, de sécrétion et d'absorption de la muqueuse iléale caractérisent la phase d'adaptation à l'aliment post-sevrage. En conclusion, les marqueurs retenus peuvent être des outils pour évaluer la capacité de stratégies alternatives aux antibiotiques à limiter les désordres digestifs post-sevrages.

## Identification of markers of the post-weaning changes in gut morphology and physiology in piglets

We analysed the sequence of events concerning the morphology and physiology of the gut of piglets during two weeks following weaning, with the aim of providing a limited number of variables that could be considered as relevant markers of gut changes post-weaning. An experiment was conducted with 60 piglets, 21 days-aged, subjected to fasting for two days, then administered a diet with a moderate or a high content of wheat using controlled gastric feeding, and slaughtered kinetically post-weaning. Variables dealing with digestive hormones plasma concentration, pancreatic enzymes activity, gut and digesta characteristics, intestinal morphometry, enzymes activity, secretory and absorptive capacities, and barrier function, were analysed by principal components analysis. The results showed that temporal changes induced by weaning on the gut structure and function can be divided into an acute period happening immediately after weaning followed by a more progressive adaptative and maturational phase, from day 5 to day 15. The main factors of this adaptation were the re-feeding process and time, while the diet per se had little incidence here. Villus length, permeability to macromolecules in the proximal jejunum, intestinal lactase activity and plasma cholecystokin could be considered as markers of the post-weaning acute phase. Variables measuring enzymatic activity, secretion and absorption of the distal ileum, were more characteristic of the later adaptative phase to the weaning diet. In conclusion, the most relevant markers of gut changes identified here might be helpful to design suitable diets to limit post-weaning gut disorders in pigs.

## INTRODUCTION

Le sevrage du porcelet comprend une période d'adaptation à l'aliment post-sevrage pendant laquelle l'ingestion spontanée est faible. Le déficit nutritionnel qui en résulte se traduit par un arrêt de la croissance de l'animal et par une susceptibilité accrue aux désordres digestifs. D'un point de vue physiologique, ces perturbations sont liées à la détérioration de l'intégrité du tube digestif (revues de Vente-Spreuwenberg et Beynen, 2003 et Lallès et al., 2004). Elles sont caractérisées par une atrophie villositaire et une diminution de l'expression des enzymes intestinales (Pluske et al., 1997), par des perturbations des échanges hydro-minéraux et de la perméabilité de l'épithélium intestinal (Boudry et al., 2004), par la surexpression des gènes de cytokines inflammatoires (McCracken et al., 1999 ; Pié et al., 2004), par une surexpression des protéines de stress (David et al., 2000), et par une diminution de la densité des cellules à mucus (Brown et al., 1988) dans la muqueuse intestinale.

L'introduction, dans les aliments post-sevrages d'antibiotiques facteurs de croissance et de minéraux (Cu et Zn) a permis pendant de nombreuses années, de limiter les troubles du sevrage tout en maintenant des niveaux de croissance compétitifs. L'augmentation des résistances bactériennes aux antibiotiques et la toxicité de minéraux vis-à-vis des sols ont conduit l'Union Européenne à interdire, depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2006, l'usage des antibiotiques facteurs de croissance dans les aliments. Cette réglementation a stimulé, depuis plusieurs années, d'une part le développement des recherches sur la physiopathologie du sevrage et d'autre part la commercialisation de substances alternatives permettant de limiter les problèmes de croissance et de santé en post-sevrage.

Bien que les effets du sevrage aient été largement étudiés, il n'existe pas, à notre connaissance, d'études globales intégrant les changements morphologiques et physiologiques du tube digestif sur des périodes de temps relativement longues après le sevrage. Or des études intégratives peuvent permettre de proposer des marqueurs pertinents permettant des mesures objectives de l'efficacité des substances alternatives aux antibiotiques et des nouvelles stratégies d'alimentation post-sevrage.

L'objectif du présent travail est de présenter les changements temporels, structuraux et fonctionnels, à différents sites du tube digestif, pendant les 15 jours suivant le sevrage. L'étude des données par analyse en composantes principales (ACP) nous permet d'avoir une vision globale des phénomènes et de proposer des variables pouvant servir de marqueurs des événements post-sevrages.

## 1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1.1. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental de cette étude a été décrit en détail par Boudry et al (2004). En résumé, 60 porcelets Piétrain x(Landrace x Large White) sont utilisés au cours de 6 répétitions, comprenant chacune 5 paires de porcelets. Les porcelets de chaque paire proviennent de la même portée, ont un

poids de sevrage similaire, et reçoivent l'un ou l'autre des deux aliments expérimentaux. Le premier aliment contient de l'orge, du blé, de la poudre de lactosérum et des maltodextrines (respectivement 245, 243, 150 et 40 g/kg d'aliment sec). Le second contient majoritairement du blé (680 g/kg d'aliment sec) et est supposé entraîner plus de désordres digestifs que le premier. Les deux aliments ont des teneurs en protéines totales et énergie nette similaires, respectivement 215 g et 10 MJ/kg de matière sèche. Ils sont distribués sous forme de soupe, selon un plan d'alimentation précis.

Les porcelets sont sevrés à 21 jours à un poids vif moyen de  $6.16 \pm 0.26$  kg. Ils sont munis d'un cathéter gastro-oesophagien, placés en cage individuelle et subissent un jeûne de 48 h (jours 0 à 2). Ils sont ensuite alimentés via le cathéter au cours de 6 repas journaliers répartis entre 6 et 21 h. A chaque jour d'abattage, à savoir le jour du sevrage (jour 0) et 2, 5, 8 et 15 jours après le sevrage, 12 animaux (1 paire/répétition) sont euthanasiés.

### 1.2. Mesures à l'abattage, prélèvements, et analyses de laboratoire

Les animaux sont pesés et abattus. Des prélèvements de sang sont réalisés pour le dosage radio-immunologique des concentrations plasmatiques de gastrine et de cholécystokinine (CCK) (Marion et al., 2003). Le tube digestif est immédiatement prélevé et chaque segment est pesé plein et vide de contenu digestif. Le pH des contenus digestifs stomacaux, caecaux et du colon proximal est mesuré. Le pancréas est prélevé en vue du dosage des activités de l'amylase, de la trypsine, et de la lipase (Marion et al., 2003). Des prélèvements de muqueuse intestinale sont réalisés dans les parties proximale (jéjunum) et distale (iléon) pour l'analyse des activités de la lactase, de la maltase, de la dipeptidyl-peptidase 4 et de l'aminopeptidase N (Marion et al., 2005). L'expression, dans la muqueuse jéjunale, des ARNm codant pour ces mêmes enzymes est déterminée par RT-PCR (reverse transcription polymérase chain reaction) (Petersen et al., 2001). Des échantillons de muqueuses jéjunale et iléale sont fixés dans du formol en vue des mesures des paramètres morphologiques (Goodlad et al., 1991). Des segments de muqueuse jéjunale, iléale et du colon proximal sont prélevés et immédiatement montés dans des chambres d'Ussing pour étudier les caractéristiques électriques basales (Isc basal) ou stimulées par des secrétagogues (sérotonine et théophylline), des propriétés d'absorption du glucose, de sécrétion et de perméabilité aux macromolécules de l'épithélium (Boudry et al., 2004).

### 1.3. Analyse des données

Les données obtenues pour les 59 variables mesurées sont soumises dans un premier temps à une analyse de variance (procédure GLM de SAS). Une première analyse est réalisée sur les données mesurées aux jours 5, 8 et 15 pour tester les effets du régime, du temps, de la paire et de la répétition, et les interactions régimexrépétition, et régimextemps. L'effet du régime n'étant pas significatif pour la plupart des variables, le facteur régime est exclu du modèle et une seconde analyse est réalisée sur les données des jours 0, 2, 5, 8 et 15. Les

différences entre les moyennes ajustées sont testées à l'aide du test t de Student.

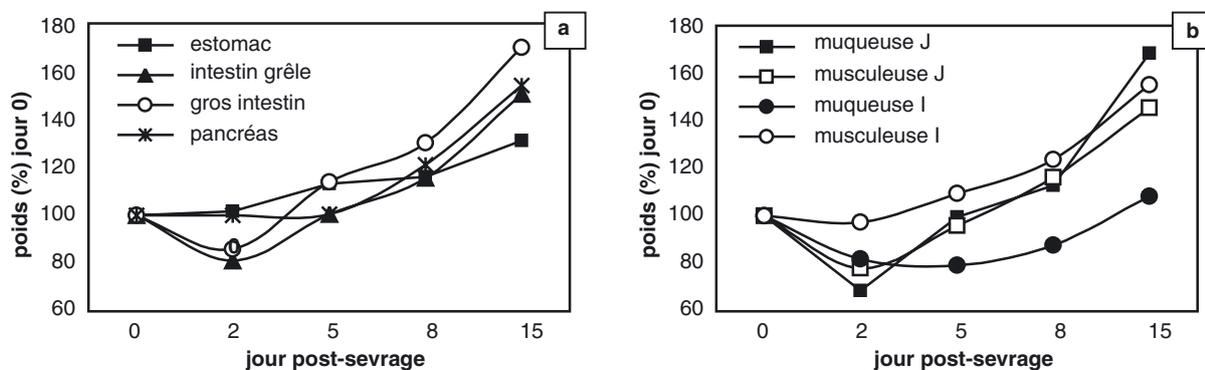
Les données sont dans un deuxième temps analysées par ACP (logiciel Spad). L'ACP permet de réduire la complexité du jeu de données en créant de nouvelles variables synthétiques, appelées composantes principales ou axes factoriels, qui maximisent la variabilité et sont des combinaisons linéaires des variables originales. Elle permet de plus de rechercher des variables caractéristiques de groupes d'individus. Deux ACP sont effectuées. L'ACP1 concerne les données mesurées aux jours 0, 2 et 5 et l'ACP2, celles des jours 5, 8 et 15. Afin d'optimiser les analyses, les variables mal représentées par les principaux axes et/ou corrélées entre elles sont exclues de l'analyse.

## 2. RÉSULTATS

Quatre porcelets sont exclus de l'étude en raison de nombreuses valeurs manquantes.

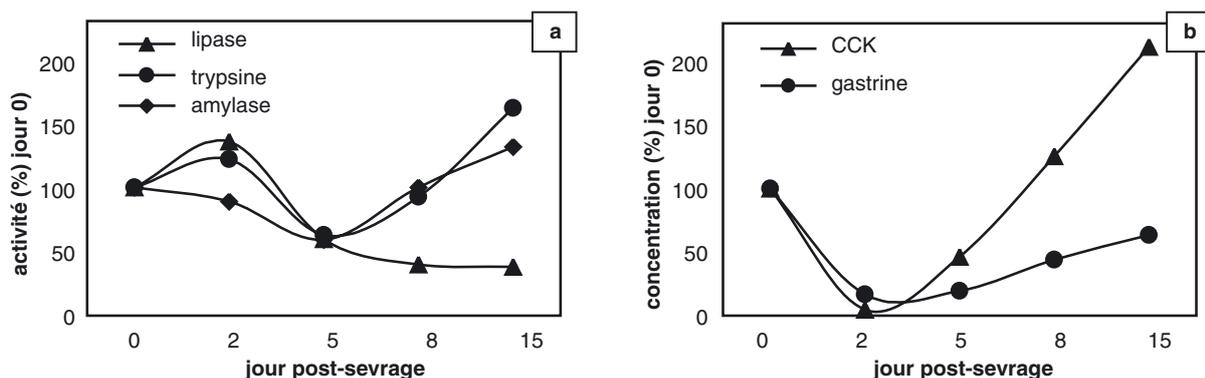
### 2.1. Influence de la composition l'aliment et du temps post-sevrage sur chacune des variables

Le régime alimentaire n'influence ni la croissance et l'état sanitaire des animaux, ni l'architecture et les fonctions du tube digestif (résultats non présentés). Seul le pH des contenus digestifs caecaux est plus acide chez les animaux recevant le régime formulé à base de blé, comparativement au régime orge/blé (5,67 vs. 5,97 en moyenne entre les jours 5 et 15,  $P=0,02$ ).



**Figure 1** - Caractéristiques anatomiques du tube digestif en relation avec le temps post-sevrage.

a. Poids des segments digestifs. b. Densité de la muqueuse et de la musculature du jéjunum proximal (J) et de l'iléon distal (I). Valeurs moyennes exprimées en % des valeurs observées le jour du sevrage (jour 0)



**Figure 2** - Activités des enzymes pancréatiques (a.) et concentration plasmatique en CCK et gastrine (b.)

en relation avec le temps post-sevrage. Valeurs moyennes exprimées en % des valeurs observées le jour du sevrage (jour 0)

L'architecture et les fonctions du tube digestif sont affectées par le temps post-sevrage. Le poids de l'intestin grêle (rapporté au poids vif avant abattage) diminue de 20 % entre les jours 0 et 2 (Figure 1a ;  $P<0,0001$ ) alors que celui des autres segments n'est pas significativement affecté. Il augmente ensuite et atteint, au jour 15, une valeur égale à 150 % de celle mesurée le jour du sevrage. L'augmentation de la masse intestinale résulte essentiellement de l'accroissement de la densité de la muqueuse et de la musculature du jéjunum proximal (Figure 1b). L'augmentation post-sevrage du poids des tissus de l'iléon distal est plus faible et retardée au jour 8.

Les activités spécifiques de la lipase et de la trypsine dans le pancréas augmentent respectivement de 33 et 25 % entre les jours 0 et 2 (Figure 2). Entre les jours 2 et 5, toutes les activités des enzymes pancréatiques diminuent. Après le jour 5, les activités de la trypsine et de l'amylase sont stimulées alors que l'activité lipasique continue à diminuer. Les teneurs plasmatiques en CCK et gastrine diminuent pendant la période de jeûne post-sevrage ( $P<0,01$ ) et augmentent ensuite ( $P<0,001$ ).

Le tableau 1 présente les résultats obtenus à l'échelle de la muqueuse intestinale. La hauteur des villosités jéjunales diminue entre les jours 0 et 2. Elle augmente ensuite mais sans ré-atteindre, au jour 15, les valeurs observées le jour du sevrage. Les villosités iléales sont peu affectées par le sevrage. L'activité lactasique diminue de 90 % entre les jours 0 et 5, aux deux sites de prélèvements intestinaux, et reste ensuite faible jusqu'au jour 15. L'activité de la maltase est peu affectée par le jeûne mais tend à augmenter dans l'iléon entre les

**Tableau 1** - Caractéristiques structurales et fonctionnelles de la muqueuse intestinale en relation avec le temps post-sevrage

| Variable   | Site <sup>1</sup> | Jour post-sevrage |                   |                   |                   |                   | SEM  | P <sub>jour</sub> |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|-------------------|
|  |                   | 0                 | 2                 | 5                 | 8                 | 15                |      |                   |
| <b>Morphométrie (µm)</b>   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |      |                   |
| hauteur des villosités   | J                 | 597 <sup>a</sup>  | 356 <sup>c</sup>  | 359 <sup>c</sup>  | 377 <sup>c</sup>  | 457 <sup>b</sup>  | 27   | <0,0001           |
|  | I                 | 340               | 295               | 268               | 329               | 317               | 20   | 0,128             |
| largeur des villosités   | J                 | 151 <sup>b</sup>  | 143 <sup>b</sup>  | 150 <sup>b</sup>  | 161 <sup>a</sup>  | 184 <sup>a</sup>  | 7    | <0,001            |
|  | I                 | 113 <sup>c</sup>  | 104 <sup>c</sup>  | 119 <sup>bc</sup> | 132 <sup>b</sup>  | 149 <sup>a</sup>  | 5    | <0,0001           |
| profondeur des cryptes   | J                 | 216 <sup>c</sup>  | 211 <sup>c</sup>  | 367 <sup>a</sup>  | 304 <sup>b</sup>  | 308 <sup>b</sup>  | 13   | <0,0001           |
|  | I                 | 156 <sup>c</sup>  | 146 <sup>c</sup>  | 194 <sup>b</sup>  | 204 <sup>b</sup>  | 240 <sup>a</sup>  | 10   | <0,0001           |
| largeur des cryptes  | J                 | 31 <sup>b</sup>   | 29 <sup>b</sup>   | 31 <sup>b</sup>   | 31 <sup>b</sup>   | 34 <sup>a</sup>   | 1    | 0,012             |
|  | I                 | 29 <sup>ab</sup>  | 27 <sup>b</sup>   | 29 <sup>ab</sup>  | 31 <sup>a</sup>   | 31 <sup>a</sup>   | 1    | 0,037             |
| <b>Fonction d'hydrolyse</b> Activité spécifique des enzymes (U <sup>2</sup> /mg protéines) |                   |                   |                   |                   |                   |                   |      |                   |
| lactase  | J                 | 59 <sup>a</sup>   | 48 <sup>a</sup>   | 17 <sup>b</sup>   | 17 <sup>b</sup>   | 12 <sup>b</sup>   | 5    | <0,0001           |
|  | I                 | 11 <sup>a</sup>   | 4 <sup>a</sup>    | 2 <sup>b</sup>    | 3 <sup>b</sup>    | 1 <sup>b</sup>    | 2    | <0,0001           |
| maltase  | J                 | 42                | 37                | 31                | 43                | 43                | 5    | 0,399             |
|  | I                 | 29                | 27                | 33                | 48                | 45                | 7    | 0,105             |
| aminopeptidase N   | J                 | 51 <sup>a</sup>   | 26 <sup>b</sup>   | 28 <sup>b</sup>   | 31 <sup>b</sup>   | 31 <sup>b</sup>   | 4    | 0,001             |
|  | I                 | 48 <sup>a</sup>   | 21 <sup>b</sup>   | 24 <sup>b</sup>   | 31 <sup>b</sup>   | 27 <sup>b</sup>   | 5    | 0,002             |
| dipeptidyl-peptidase 4   | J                 | 19 <sup>a</sup>   | 7 <sup>b</sup>    | 6 <sup>b</sup>    | 7 <sup>b</sup>    | 7 <sup>b</sup>    | 3    | 0,066             |
|  | I                 | 30 <sup>a</sup>   | 14 <sup>b</sup>   | 9 <sup>b</sup>    | 12 <sup>b</sup>   | 10 <sup>b</sup>   | 4    | <0,001            |
| Niveau relatif des ARNm codant pour les enzymes (rapport de densité, UA <sup>3</sup> )     |                   |                   |                   |                   |                   |                   |      |                   |
| lactase  | J                 | 1,25              | 0,95              | 0,83              | 0,73              | 0,82              | 0,16 | 0,187             |
| maltase  | J                 | 0,28 <sup>b</sup> | 0,44 <sup>b</sup> | 1,32 <sup>a</sup> | 1,26 <sup>a</sup> | 1,43 <sup>a</sup> | 0,18 | <0,0001           |
| aminopeptidase N   | J                 | 1,46              | 1,36              | 1,28              | 1,37              | 1,26              | 0,11 | 0,770             |
| dipeptidyl-peptidase 4   | J                 | 0,50              | 0,41              | 0,45              | 0,45              | 0,34              | 0,05 | 0,335             |
| <b>Fonctions de sécrétion et d'absorption (µA/cm<sup>2</sup>)</b>                          |                   |                   |                   |                   |                   |                   |      |                   |
| sécrétion basale (Isc basal)   | J                 | 110 <sup>bc</sup> | 209 <sup>a</sup>  | 170 <sup>ab</sup> | 94 <sup>c</sup>   | 56 <sup>c</sup>   | 25   | 0,039             |
|  | I                 | 25                | 11                | 5                 | -40               | -29               | 23   | 0,296             |
| sécrétion théophylline   | J                 | 326               | 312               | 366               | 185               | 125               | 57   | 0,054             |
|  | I                 | 192               | 388               | 200               | 302               | 175               | 68   | 0,295             |
| sécrétion sérotonine   | J                 | 194               | 306               | 179               | 200               | 76                | 30   | 0,149             |
|  | I                 | 223               | 294               | 179               | 355               | 169               | 80   | 0,625             |
| absorption du glucose  | J                 | 530 <sup>b</sup>  | 945 <sup>a</sup>  | 372 <sup>bc</sup> | 300 <sup>bc</sup> | 88 <sup>c</sup>   | 122  | 0,007             |
|  | I                 | 779               | 367               | 296               | 194               | 680               | 81   | 0,068             |
| <b>Fonction de barrière intestinale</b>  |                   |                   |                   |                   |                   |                   |      |                   |
| résistance (Ω.cm <sup>2</sup> )  | J                 | 28                | 9                 | 34                | 26                | 29                | 4    | 0,111             |
|  | I                 | 15 <sup>b</sup>   | 12 <sup>b</sup>   | 32 <sup>a</sup>   | 25 <sup>ab</sup>  | 29 <sup>a</sup>   | 4    | 0,007             |
| perméabilité macromolécules (ng/cm <sup>2</sup> /h)  | J                 | 997 <sup>a</sup>  | 229 <sup>c</sup>  | 360 <sup>bc</sup> | 672 <sup>ab</sup> | 344 <sup>bc</sup> | 110  | 0,013             |
|  | I                 | 367               | 441               | 163               | 195               | 419               | 84   | 0,198             |

<sup>1</sup> J correspond à la muqueuse du jéjunum proximal et I à celle de l'iléon distal

<sup>2</sup> U pour Unités d'activités enzymatiques correspondant à des nmol de substrats hydrolysés par min

<sup>3</sup> UA pour Unités Arbitraires. La densité des produits RT-PCR spécifiques d'une enzyme est exprimée relativement à la densité en ARNr 18S

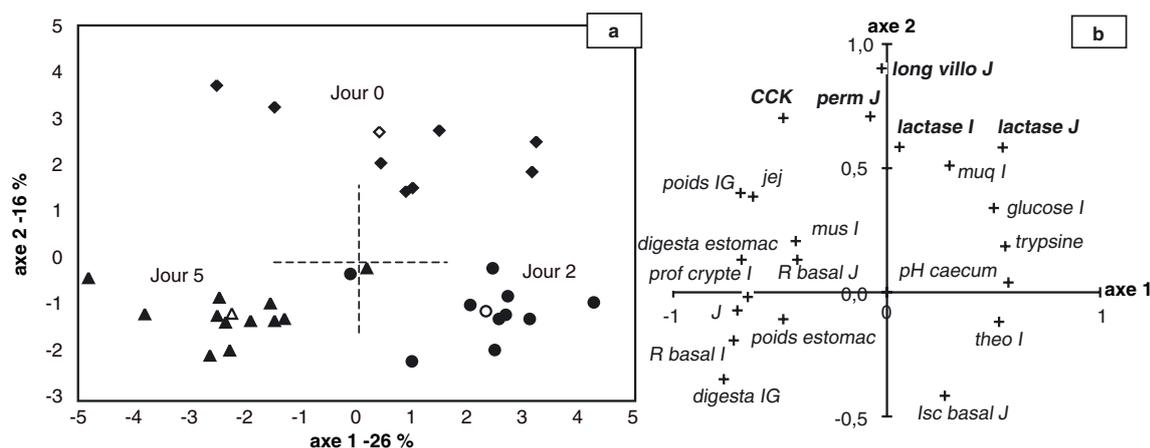
<sup>a,b,c</sup> les moyennes ajustées avec des lettres différentes sont statistiquement différentes au seuil de 5 %

jours 2 et 15 (P=0,105). Les activités de l'aminopeptidase N et de la dipeptidyl-peptidase 4 diminuent de moitié entre les jours 0 et 2. Elles restent ensuite faibles dans le jéjunum proximal et tendent à augmenter dans l'iléon distal. Le niveau relatif des ARNm codant pour la maltase augmente progressivement entre 0 et 5 jours tandis que les autres enzymes ne sont pas affectés par le sevrage. Les données obtenues en chambres d'Ussing ont été publiées par Boudry et al (2004). Dans le jéjunum, l'Isc basal augmente de 90 % entre les jours 0 et 2. Dans le même intervalle de temps, on observe une augmentation de la capacité d'absorption du glucose (+80 %) et une chute de la résistance de la muqueuse (-70 %). Au jour 5, ces paramètres atteignent à nouveau les niveaux mesurés le jour

du sevrage. Dans le jéjunum, les réponses aux sécrétagogues et la capacité d'absorption du glucose sont 60 % plus faibles au jour 15 que le jour du sevrage. La résistance de la muqueuse iléale augmente le jour 5 et se stabilise ensuite. La perméabilité aux macromolécules de la muqueuse jéjunale diminue le jour 2 et reste faible jusqu'au jour 15.

## 2.2. Analyse globale

L'ACPI optimisée (jours 0, 2 et 5) réalisée avec 23 variables met en évidence cinq axes factoriels expliquant 71 % de la variabilité entre les individus. L'axe 1 (26 % de la variance) discrimine les porcelets abattus 2 et 5 jours post-sevrage



Les signes pleins réfèrent aux individus, les signes vides au centre de gravité du jour.

Seules les variables représentées par les axes 1 et 2 (coefficient de corrélation  $\geq 0,35$ ) sont indiquées. Les variables en gras sont proposées comme marqueurs de la dégradation de l'intégrité intestinale (cf. Discussion).

I : iléon ; IG : intestin grêle ; J : jéjunum ; jej : densité du jéjunum ; long villo : hauteur des villosités ; perm : perméabilité de la muqueuse aux macromolécules ; prof : profondeur ; R : résistance de la muqueuse ; théo : sécrétion induite par la théophylline.

**Figure 3** - Plan formé par les deux premiers axes factoriels de l'ACP réalisée sur les données obtenues le jour du sevrage (jour 0), 2 et 5 jours post-sevrage (ACP1) a. Représentation des individus. b. Représentation des variables.

(Figure 3). Les variables associées à l'axe 1 sont les poids des contenus gastriques et intestinaux, et le poids de l'intestin grêle (coefficients de corrélation entre la variable et l'axe 1 = -0,68, -0,76 et -0,68, respectivement), la densité de la muqueuse et la profondeur des cryptes jéjunales (-0,63 et

-0,70), le pH des contenus caecaux (0,57) et l'activité spécifique de la trypsine (0,56). Les variables mesurant les caractéristiques structurales et fonctionnelles de la muqueuse iléale sont aussi fortement liées à l'axe 1 : -0,65, -0,72 et 0,53, respectivement pour la profondeur des cryptes, la résistance

**Tableau 2** - Description des principaux axes obtenus par ACP de 17 variables caractérisant la physiologie digestive pendant la phase d'adaptation à l'aliment post-sevrage (jours 5 à 15 post-sevrage, ACP2)

| Axe factoriel                                | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|
| % de la variabilité expliquée                | 26    | 15    | 10    | 8,9   | 8,2   |
| % cumulé                                     |       | 41    | 51    | 60    | 69    |
| <b>Coordonnées des modalités</b>             |       |       |       |       |       |
| jour 5                                       | 2,22  | -0,55 | -0,1  | 0,31  | 0,07  |
| jour 8                                       | 0,35  | 0,65  | 0,32  | -0,39 | 0,25  |
| jour 15                                      | -2,57 | -0,11 | -0,21 | 0,08  | -0,31 |
| <b>Coordonnées des variables<sup>1</sup></b> |       |       |       |       |       |
| <b>densité muqueuse - jéjunum</b>            | -0,87 |       |       |       |       |
| <b>poids du pancréas</b>                     | -0,80 |       |       |       |       |
| <b>contenu stomacal</b>                      | -0,65 |       |       |       |       |
| <b>activité de la trypsine</b>               | -0,61 |       |       |       |       |
| <b>sécrétion théophylline - jéjunum</b>      | 0,60  |       |       |       |       |
| profondeur des cryptes - iléon               | -0,53 |       |       |       |       |
| concentration CCK                            | -0,53 |       |       |       |       |
| Isc basal - jéjunum                          | 0,59  | 0,41  |       |       |       |
| sécrétion sérotonine - jéjunum               | 0,52  |       | -0,48 |       |       |
| activité maltase - iléon                     |       | 0,85  |       |       |       |
| <b>absorption glucose - iléon</b>            |       | 0,82  |       |       |       |
| <b>résistance basale - iléon</b>             |       | -0,66 | -0,36 |       |       |
| <b>résistance basale - jéjunum</b>           |       | -0,49 | 0,49  | 0,46  |       |
| largeur villosité - jéjunum                  | -0,51 |       | -0,52 |       |       |
| longueur villosité - jéjunum                 | -0,55 |       | -0,38 | 0,58  |       |
| ARNm dipeptidyl-peptidase 4 - jéjunum        |       |       | -0,52 |       | -0,64 |
| activité aminopeptidase N - jéjunum          |       |       |       | 0,61  | -0,63 |

<sup>1</sup> Correspondant aux corrélations entre les variables et les axes. Seules les valeurs pour lesquelles le coefficient de corrélation  $\geq 0,35$  et correspondant à  $P < 0,05$  sont indiquées.

Les variables en gras sont proposées comme marqueurs de la ré-alimentation, celles en gras et italiques comme marqueurs de la maturation digestive post-sevrage.

basale et la sécrétion d'électrolytes induite par la théophylline. L'axe 2 (16 % de la variance) est représentatif des porcelets abattus le jour du sevrage. Les variables qui lui sont associées sont la hauteur des villosités jéjunales (0,90), la perméabilité aux macromolécules et l'activité de la lactase, la concentration plasmatique en CCK ainsi que la densité du tissu iléal. Les axes 3, 4 et 5 expliquent respectivement 12, 10 et 7 % mais ne discriminent pas de groupes d'individus.

L'ACP2 optimisée (jours 5 à 15) réalisée avec 17 variables met en évidence cinq axes factoriels expliquant 69 % de la variabilité entre les individus (Tableau 2). L'axe 1 (26 % de la variance) discrimine les individus abattus 5 jours de ceux abattus 15 jours après le sevrage. Les variables les mieux représentées par l'axe 1 caractérisent les phénomènes mesurés dans la muqueuse proximale de l'intestin grêle. L'axe 2 (15 % de la variance), ne discrimine pas de groupe d'individus. Il est associé principalement à des variables caractérisant la muqueuse iléale.

### 3. DISCUSSION

Les modifications temporelles de la structure et des fonctions digestives induites par le sevrage peuvent être décomposées en deux phases successives : une réponse aiguë et immédiate (jours 0 à 2 ou 5 selon la variable), et une réponse tardive (jours 5 à 15) correspondant à la maturation et adaptation du tube digestif à l'aliment post-sevrage.

#### 3.1. Réponse précoce et aiguë : altération de l'intégrité intestinale

La hauteur des villosités, la perméabilité aux macromolécules et l'activité de la lactase de la muqueuse jéjunale ainsi que la concentration plasmatique en CCK, fortement liées à l'axe discriminant les porcelets abattus le jour du sevrage de ceux abattus aux jours 2 et 5 (axe 2, Figure 3), peuvent être considérées comme des variables marqueurs de la phase aiguë post-sevrage. Ces variables permettent de suivre l'altération de l'intégrité structurale et fonctionnelle de la muqueuse de l'intestin proximal., en liaison avec le jeûne subi par les animaux entre les jours 0 et 2. Les effets du jeûne sont probablement multifactoriels. Ils impliquent l'absence d'apport de substrats via la lumière intestinale aux cellules épithéliales, et la réduction de la sécrétion de facteurs de croissances (Burrin et al., 2000 ; Stoll et al., 2000) et de CCK (présente étude).

L'existence d'un axe discriminant entre les jours 2 et 5 post-sevrage (axe 1, Figure 3) indique des modifications profondes pendant ces trois jours. Les variables positivement corrélées à cet axe sont représentatives du jour 2. Elles mesurent des phénomènes qui évoluent de façon transitoire après le sevrage tels que l'augmentation du pH des contenus caecaux, l'accroissement de la l'activité trypsique dans le pancréas, et la sécrétion d'électrolytes induite par la théophylline dans l'iléon. Les variables négativement corrélées à cet axe sont représentatives du jour 5. Elles mesurent des phénomènes qui évoluent peu lors des deux premiers jours post-sevrage mais sont stimulés à partir du troisième jour, probablement en lien direct avec la ré-alimentation des porcelets.

A l'échelle de la muqueuse, les variables discriminant le jour 0 des jours 2 et 5 concernent essentiellement le jéjunum alors que les variables discriminant le jour 2 du jour 5 sont caractéristiques du jéjunum mais aussi de l'iléon. Ainsi les conséquences du jeûne semblent plus importantes et plus rapides dans les parties proximales que dans les parties distales. Ce gradient proximo-distal dans l'évolution temporelle des effets du jeûne peut être expliqué par la cinétique de la digestion, l'arrivée des nutriments étant arrêtée plus rapidement dans les parties proximales que distales. Il peut aussi résulter d'une répartition différente de l'origine (lumière intestinale ou artère mésentérique) des nutriments métabolisés par la muqueuse, et notamment des acides aminés. Ainsi les acides aminés des protéines de la muqueuse proximale proviendraient majoritairement de la lumière digestive (Stoll et al., 2000). Ce phénomène est probablement exacerbé avant le sevrage du fait de la forte digestibilité des protéines laitières et des capacités importantes d'hydrolyse et d'absorption observées dans le jéjunum (résultats au jour 0). Les parties distales de l'intestin grêle utilisent probablement plus d'acides aminés provenant du plasma que de la lumière (Reeds et al., 1999), expliquant un effet du jeûne plus atténué et retardé à ce site (Jiang et al., 2000).

#### 3.2. Réponse tardive et progressive : adaptation à l'aliment post-sevrage

Les principaux moteurs des changements observés lors de la phase tardive sont la ré-alimentation et le temps post-sevrage, la composition de l'aliment n'ayant pas d'effet marqué dans notre expérience. L'absence d'un effet du régime sur les perturbations digestives rencontrées lors du sevrage a aussi été observé par de nombreux auteurs (revue de Vente-Spreeuwenberg et Beynen, 2003).

L'ACP2 met en évidence deux groupes de variables, évoluant différemment lors de l'adaptation des porcelets à l'aliment post-sevrage, et synthétisées par les axes factoriels 1 et 2. L'axe 1 séparant les groupes d'animaux abattus au jour 5 du jour 15, interprété comme l'axe du temps, synthétise essentiellement des variables caractérisant la structure du tube digestif : densité de la muqueuse jéjunale, poids du pancréas... ainsi que l'activité trypsique et la sécrétion jéjunale induite par des sécrétagogues. Le phénomène moteur est probablement l'arrivée de nutriments dans le tube digestif. Aussi ces variables sont des marqueurs potentiels de la ré-alimentation post-sevrage.

L'axe 2 synthétise des variables mesurant les fonctions d'hydrolyse enzymatique, de sécrétion et d'absorption de la muqueuse iléale et plus particulièrement l'activité de la maltase, la capacité d'absorption du glucose, et la résistance basale de l'épithélium. L'élément moteur de l'évolution de ces variables est la ré-alimentation mais aussi un développement plus profond du tube digestif, une maturation génétiquement programmée qui pourrait être initiée par le sevrage. Ainsi l'adaptation des porcelets à l'aliment post-sevrage implique une maturation des parties distales de l'intestin. Les variables mesurant ces phénomènes et citées ci-dessus peuvent être considérées comme des marqueurs de la maturation du tube digestif.

## CONCLUSIONS

La phase aiguë post-sevrage concerne les parties proximales et prédispose l'animal à des troubles digestifs (forte perméabilité, atrophie villositaire,...). La maturation post-sevrage concerne les parties distales (iléon notamment) et comprend des modifications structurales et surtout fonctionnelles. Ainsi, les parties proximales de l'intestin grêle sont particulièrement actives pour la digestion avant le sevrage alors que les parties distales deviennent plus impliquées après le sevrage.

D'un point de vue finalisé, le présent travail permet de proposer des marqueurs biologiques de l'altération de l'intégrité du tube digestif et des événements liés à la ré-alimentation et à la maturation induite par le sevrage. Ces marqueurs sont des variables de choix pour étudier l'efficacité des solutions

alternatives aux antibiotiques à limiter des les désordres digestifs post-sevrages.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient toute l'équipe technique de l'UMR SENAH pour les soins aux animaux, l'aide aux abattages et la réalisation des analyses de laboratoire. Merci aussi aux statisticiens du laboratoire de Mathématiques appliquées d'Agrocampus Rennes.

Les auteurs remercient finalement l'Union Européenne pour son soutien financier dans le cadre du projet 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 être tenue pour responsable de l'information délivrée.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Boudry G., Péron V., Le Huërou-Luron I., Lallès J.P., Sève B., 2004. Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. *J. Nutr.*, 134, 2256-2262.
- Brown P.J., Miller B.G., Stokes C.R., Blazquez N.B., Bourne F.J., 1988. Histochemistry of mucins of pig intestinal secretory epithelial cells before and after weaning. *J. Comp. Pathol.*, 98, 313-323.
- Burrin D.G., Stoll B., Jiang R., Chang X., Hartmann B., Holst J.J., Greeley G.H., Reeds P.J., 2000. Minimal enteral nutrient requirements for intestinal growth in neonatal piglets: How much is enough ? *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 1603-1610.
- David J.C., Grongnet J.F., Lallès J.P., 2000. Weaning affects the expression of heat shock proteins in different regions of the gastrointestinal tract of piglets. *J. Nutr.*, 132, 2551-2561.
- Goodlad R.A., Levi S., Lee C., Mandir N., Hodgson H., Wright N.A., 1991. Morphometry and cell proliferation in endoscopic biopsies: Evaluation of a technique. *Gastroenterol.*, 101, 1235-1241.
- Jiang R., Chang X., Stoll B., Fan M.Z., Arthington J., Weaver E., Campbell X., Burrin D.G., 2000. Dietary plasma protein reduces small intestinal growth and lamina propria cell density in early weaned pigs. *J. Nutr.*, 130, 21-26.
- Lallès J.P., Boudry G., Favier C., Le Floch N., Luron I., Montagne L., Oswald I., Pié S., Piel C., Sève B., 2004. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Anim. Res.*, 53, 301-316.
- Marion J., Romé V., Savary G., Thomas F., Le Dividich J., Le Huërou-Luron I., 2003. Weaning and feed intake alter pancreatic enzyme activities and corresponding mRNA levels in 7-d-old piglets. *J. Nutr.*, 133, 362-368.
- Marion J., Petersen Y.M., Romé V., Thomas F., Sangild P.T., Le Dividich J., Le Huërou-Luron I., 2005. Early weaning stimulates intestinal brush border enzyme activities in piglets, mainly at the posttranscriptional level. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, in press.
- McCracken B.A., Spurlock M.E., Roos M.A., Zuckermann F.A., Gaskins H.R., 1999. Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *J. Nutr.*, 129, 613-619.
- Petersen Y.M., Burrin D.G., Sangild P.T., 2001. GLP-2 has differential effects on small intestine growth and function in fetal and neonatal pigs. *Am. J. Physiol.*, 281, 1986-1993.
- Pié S., Lallès J.P., Blazy F., Laffite J., Sève B., Oswald I., 2004. Weaning is associated with an up-regulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *J. Nutr.*, 134, 641-647.
- Pluske J.R., Hampson D.J., Williams I.H., 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livest. Prod. Sci.*, 51, 215-236.
- Reeds P.J., Burrin D.G., Stoll B., Vangoudoever J.B., 1999. Consequences and regulation of gut metabolism. In G.E. Lobley, A. White and J.C. MacRae (Eds), *Proceedings of the VIIIth International Symposium on Protein Metabolism and Nutrition*, 127-153. EAAP Publication n°96, Wageningen, NL.
- Stoll B.X., Chang X., Fan M.Z., Reeds P.J., Burrin D.G., 2000. Enteral nutrient intake determines the rate of intestinal protein synthesis and accretion in neonatal pigs. *Am. J. Physiol.* 279, 49-57.
- Vente-Spreeuwenberg M.A.M., Beynen A.C., 2003. Diet-mediated modulation of small intestinal integrity in weaned piglets. In : J.R. Pluske, J. Le Dividich and M.W.A. Verstegen (Eds), *Weaning the pig, concepts and consequences*, 145-199. Wageningen Academic Publisher, Wageningen, NL.