

Effets d'une supplémentation en carbohydrases sur les paramètres morphologiques et immunologiques iléaux de porcs en croissance

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

(1) CRESA, Barcelone, Espagne

(2) IRTA, Mas de Bover, Reus, Espagne,

(3) Adisseo, Commeny, France

estelle.devallard@adisseo.com

Effects of carbohydrase supplementation on morphological and immunological parameters measured at the ileal level in growing pigs

The objective of this study was to investigate the effects of a non-starch polysaccharide (NSP) enzyme preparation (Rovabio™ Excel, Adisseo, France) on the ileal morphology and immunological parameters in growing pigs fed on wheat-barley-rye or maize based diets. Thirty-six pigs (25 kg b.w.) were fed during 28 days with one of 4 treatments based on the type of diet and the supplementation or not with the enzyme preparation. The pigs were slaughtered and samples of ileal mucosa, serum and bili were taken. Morphology of the ileal mucosa was modified by the supplementation with enzymes, with an increase of the villi/crypt ratio. No difference between treatments were found in the sera concentration of IgA, IgG and IgM, but enzymes supplementation increased secretory IgA in the bili of animals fed maize diet. The cellular immunity studied by immunofluorescence detection of CD3, CD4, CD163 and CD172 showed also that enzymes can modulate intestinal immunity. In conclusion, our study showed that NSP-enzymes can have effects on the ileal morphology of pigs and on their immunity, suggesting that NSP-enzymes could improve performances.

INTRODUCTION

Les enzymes exogènes de type carbohydrases, utilisées pour améliorer les performances zootechniques, hydrolysent les polysaccharides non amylacés (PNA) des substrats alimentaires (Bedford et Schulze, 1998). Une étude menée dans notre laboratoire a montré que les enzymes modifient la microflore intestinale de porcs en croissance (dos Santos et al., 2009). Cet effet sur la microflore pourrait influencer la santé intestinale, comme suggéré par les études de Kim et al. (2003) et de Mathlouthi et al. (2002).

L'objectif de l'étude rapportée ici est de déterminer l'effet de la supplémentation en enzymes sur la santé intestinale, et en particulier sur les paramètres morphologiques et immunologiques au niveau de l'iléon de porcs en croissance.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux, alimentation

Trente-six porcs en croissance ont été distribués selon leur poids vif (22 à 26 kg) entre 4 traitements (9 répétitions): régime blé-orge-seigle (24,8% blé, 24,8% orge, 22,9% seigle) et régime maïs (71,5% maïs), supplémentés ou non avec une

préparation enzymatique (Rovabio™ Excel, Adisseo, France). Les 4 groupes étaient référencés ainsi : régime T1 (régime maïs, sans enzyme), régime T2 (régime maïs, avec enzyme), régime T3 (régime blé-orge-seigle, sans enzyme) et régime T4 (régime blé-orge-seigle, avec enzyme). Les animaux, logés dans des cages individuelles, ont été nourris ad libitum pendant 4 semaines sur ces régimes distribués sous forme de farine. Après les 4 semaines expérimentales, les animaux ont été euthanasiés pour permettre les différents prélèvements et mesures.

1.2. Prélèvements

Avant euthanasie, des échantillons de sang ont été prélevés au niveau de la veine cave antérieure pour les analyses d'IgA, IgG et IgM. Environ 2 ml de bile étaient également prélevés pour l'analyse des IgA sécrétoires. Un échantillon d'environ 10 cm provenant de la partie terminale de l'iléon a été fixé par immersion dans une solution de formaldéhyde pour les analyses morphologiques. Une section d'environ 1 cm a été fixée dans une paraffine (Tissue-Tek® O.C.T., Sakura Finetek Europe B.V.) pour la détection en immunofluorescence.

1.3. Mesures

Le dosage des Ig sériques et sécrétoires a été effectué par

ELISA en utilisant un kit de dosage (Bethyl Laboratories Inc., Texas, USA). Pour les mesures morphologiques, les tissus ont été déshydratés et fixés dans une paraffine, puis colorés à l'hématoxyline/éosine. La hauteur des villosités (HV) et la profondeur des cryptes (PC), les lymphocytes intraépithéliaux (LIE), le nombre de cellules caliciformes ont été mesurés par microscopie photonique sur 10 villosités et cryptes. L'immunofluorescence a été réalisée sur des échantillons fixés pendant 30 min dans du paraformaldehyde (4%), puis traités au Triton X100 pendant 15 min et bloqués par l'albumine de sérum bovin à 3% pendant 1h. L'anticorps primaire (anti-CD3, anti CD4, anti CD163, anti-CD172a) et l'anticorps secondaire étaient appliqués pendant 1h. Les différents lavages étaient réalisés avec un tampon phosphate pH 7,4. Les différentes préparations ont été analysées en utilisant un microscope à épifluorescence (Nikon Eclipse 90i). Les effets fixes retenus pour toutes les analyses statistiques sont le régime de base (maïs vs blé), l'addition d'enzymes (sans vs avec enzymes) et l'interaction de ces 2 paramètres. Les données ont été analysées à l'aide de la procédure ProcMixed du logiciel SAS afin de tester la signification statistique des traitements.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les enzymes ont tendance à augmenter la HV et diminuer la PC et par conséquent augmentent le ratio HV/PC, en particulier pour le régime à base de blé (Tableau 1). L'utilisation d'enzymes favoriserait donc l'absorption des nutriments et une diminution de la dépense énergétique pour le renouvellement de la muqueuse intestinale (Hedemann et al., 2003). Le nombre de LIE était plus élevé pour le régime T1 que pour le régime T3 (Tableau 1), suggérant que le régime à

base de maïs présente un caractère antigénique plus important que le régime à base de blé. L'addition d'enzymes permet de diminuer le nombre de LIE, probablement par une action directe sur les composants antigéniques du régime, qui conduisent à une réponse immunitaire. Globalement, les enzymes n'ont pas d'effet sur le nombre de cellules sécrétrices de mucines. Cependant, une augmentation numérique du nombre total de ces cellules dans le cas du régime à base de blé et une augmentation des cellules produisant des mucines neutres dans le cas du régime maïs est observée (Tableau 1). Les enzymes favoriseraient la production de mucus, et donc un bon fonctionnement de la barrière intestinale (Brown et al., 2006). La réponse humorale n'était pas modifiée par le régime ou par la supplémentation en enzymes, comme observé avec les mesures de concentrations en Ig. Cependant, les résultats obtenus pour les mesures d'IgA sécrétoires montrent que le régime à base de maïs semble plus 'antigénique' que le régime à base de blé (Tableau 1). L'addition d'enzymes permettrait de réduire cette antigénicité, et permettrait donc de réduire la dépense énergétique due à la réponse immunitaire excessive. L'addition d'enzymes conduit aussi à l'augmentation du nombre de cellules CD163+ and CD172a+, cellules T responsables de la présentation de l'antigène, et précurseurs de macrophages.

CONCLUSION

L'addition d'enzymes carbohydrases permet de modifier les paramètres morphologiques et immunologiques au niveau de l'iléon de porcs en croissance, ce qui pourrait en partie expliquer l'amélioration de performances observée avec l'utilisation de ces additifs.

Tableau 1 – Paramètres morphologiques, histologiques et concentrations en Ig

	T1	T2	T3	T4	SEM	p-enzyme	p-régime	p-enzyme*régime
Hauteur des villosités (µm)	412	420	367	428	16	0,052	0,407	0,125
Profondeur des cryptes (µm)	318	319	324	300	13	0,259	0,739	0,297
HV/PC Ratio	1,31 ab	1,32 ab	1,17 b	1,46 a	0,06	0,011	0,878	0,027
Lymphocytes intra- epitheliaux*	4,76a	3,08b	2,77b	3,16b	0,25	0,014	0,001	0,001
Cellules caliciformes (total)*	9,48	9,31	7,97	9,43	0,54	0,242	0,226	0,154
Cellules caliciformes (neutres)*	1,72	2,68	2,26	2,26	0,33	0,080	0,314	0,664
IgG sériques (µg/µl)	50,9	53,1	53,8	48,9	2,62	0,988	0,891	0,188
IgM sériques (µg/µl)	35,9	33,8	35,0	35,2	0,99	0,298	0,698	0,140
IgA sériques (µg/µl)	61,1	63,4	57,7	65,9	2,7	0,090	0,919	0,266
IgA sécrétoires (µg/µl)	51,9 a	27,0 b	35,3 ab	32,1 ab	6,1	0,015	0,248	0,046

* nombre de cellules par 100 µm

Les différences significatives ($p < 0.05$) sont indiquées par les lettres a, b, c

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bedford M.R., Schulze H., 1998. Exogenous enzyme for pigs and poultry. *Nutr. Res. Rev.*, 11, 480-488.
- Brown D.C., Maxwell C.V., Erf G.F., Davis M.E., Singh S., Johnson Z.B., 2006. Ontogeny of T lymphocytes and intestinal morphological characteristics in neonatal pigs at different ages in the postnatal period. *J. Anim. Sci.*, 84, 567-578.
- Dos Santos J., Badiola I., Torrallardona D., Geraert P.A., Devillard E., 2009. Effet d'un complexe carbohydrase sur la microflore intestinale de porcs. *Journées Rech. Porcine*, 41, 159-162
- Hedemann M.S., Højsgaard S., Jensen B.B., 2003. Small intestinal morphology and activity of intestinal peptidases in piglets around weaning. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 87, 32-41.
- Kim S.W., Knabe D.A., Hong K.J., Easter R.A., 2003. Use of carbohydrases in corn-soybean meal-based nursery diets. *J. Anim. Sci.*, 81, 2496-2504.
- Mathlouthi N., Saulnier L., Quemener B., Larbier M., 2002. Xylanase, β-glucanase, and other side enzymatic activities have greater effects on the viscosity of several feedstuffs than xylanase and β-glucanase used alone or in combination. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5121-5127.