

Viabilité et quantification d'une levure probiotique dans le système digestif du porc

Melanie LE BON (1), Fernando BRAVO DE LAGUNA (2), Eric CHEVAUX (2), Kenneth H. MELLITS (3)

(1) Nottingham Trent University, School of Animal, Rural and Environmental Sciences, Southwell, NG25 0QF, UK

(2) Lallemand SAS, Blagnac, 31702, France

(3) University of Nottingham/Lallemand Monogastric Centre of Excellence, Loughborough, LE12 5RD, UK

echevaux@lallemand.com

Viability and colonisation of a probiotic yeast in the digestive tract of piglets

Probiotics have been defined as « live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host » (WHO, 2001). This definition implies that viability is an important factor and that the probiotic needs to reach its target site alive and in significant number in order to confer beneficial properties. Therefore, we investigated the survival and the level of the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1079 (SB) along the gut of pigs and in faeces. For this purpose, 3 piglets from SB supplemented sows were orally dosed with SB for a week before sacrifice at 21 days of age. Faecal samples were collected as well as intestinal tract compartment content for yeast count and characterization. We have used advanced techniques to be able to identify and enumerate accurately SB from other yeasts according to morphology and biomolecular profile criteria. We have demonstrated that SB remains viable and in proportionally high number along the gut of pigs and in faeces, suggesting that both sites of main actions for probiotics (small intestine and hindgut) can benefit from the presence of live yeast cells at a biologically significant level.

INTRODUCTION

Le terme probiotique est défini comme des « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels » (FAO/WHO, 2002). Cette définition implique que la viabilité est un facteur important et que pour conférer des effets bénéfiques, ces micro-organismes doivent atteindre leurs sites actifs vivants et en nombre suffisant. Cependant, les défenses naturelles du système digestif ainsi que son micro-environnement peuvent influencer négativement la survie des micro-organismes probiotiques. La détermination du nombre de probiotiques viables dans l'intestin est donc un préalable à l'étude de leurs modes d'action. Dans cette étude, nous avons étudié la survie et le dénombrement d'une levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae boulardii* CNCM I-1079 chez le porc.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Supplémentation et prélèvements

Les truies (n=3) et les porcelets (n=12 x3 lots) ont été supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae boulardii* CNCM I-1079 (LEVUCCELL® SB, Lallemand SAS, France, ci-après noté SB) dans un élevage commercial (Mansfield, GB) (dosages et modes d'administration en Tableau 1). Les fèces de porc ont été collectées avec un écouvillon rectal stérile et le contenu gastro-intestinal de 3 porcelets sacrifiés (âgés de 3 semaines et

traités pendant 1 semaine avec 3×10^9 UFC/jour) ont été collectés pour la numération de SB le long du tube digestif.

1.2. Analyse microbiologique et identification

Les échantillons ont été dénombrés sur gélose Rose Bengale Chloramphénicol. Les colonies SB présentent un phénotype caractéristique (colonie ronde, rose pâle et lisse) qui les différencie morphologiquement des autres types de levure. Dans le but de confirmer que les colonies observées étaient bien SB, une technique moléculaire a été développée. L'ADN a été extrait à partir de colonies fraîches et a subi une RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) - PCR avec des amorces spécifiques : amorce avant : CAAAATTCACCTATAATCTCA ; amorce arrière : GTGGATTTTATTCCAACA.

L'empreinte génétique par électrophorèse est sur la Figure 1. Le protocole a été validé par le comité d'éthique de l'Université de Nottingham.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Caractéristiques de SB

En plus d'être différenciable morphologiquement, nous montrons ici que SB est une souche de levure aussi identifiable moléculairement d'autres levures afin d'obtenir un comptage précis (Figure 1). Bien que *S. boulardii* et *S. cerevisiae* soient étroitement liées sur le plan phylogénique, elles se différencient sur des critères génétique, métabolique et physiologique tels que croissance à 37°C, résistance aux stress acides, etc. (van der

Aa Kuhle *et al.*, 2005) qui sont des critères importants pour la survie de SB le long du tube digestif (TD).

SB n'est naturellement pas présent dans les fèces ou le TD des porcs et il n'adhère pas aux parois intestinales, tel que démontré chez l'homme et le rat (Bléhaut *et al.*, 1989). Nous avons aussi établi que SB était éliminé des fèces 1 à 3 jours après l'arrêt de la distribution et que pour atteindre un niveau stable, un apport continu était nécessaire.

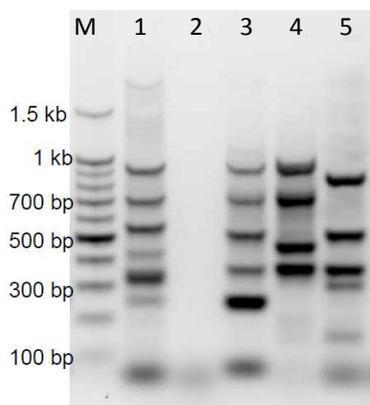


Figure 1 – RAPD de *S. cerevisiae boulardii* CNCM I-1079 (SB) et d'autres souches *S. cerevisiae* et *S. boulardii*. M: marqueur moléculaire, 1: *S. boulardii* I-3799; 2: témoin négatif, 3: SB, 4: *S. cerevisiae* BY4741, 5: *S. boulardii* DBVPG6765.

2.2. Dénombrement de SB le long du tractus gastro-intestinal

Les levures SB ont été dénombrées le long de l'intestin des porcelets (Figure 2). Elles ont été retrouvées vivantes dans chaque site testé. La population de SB augmente en densité graduellement le long du tube digestif pour atteindre son plus haut niveau dans le colon ($\sim 10^{5-6}$ UFC/g).

Dans l'intestin grêle, le niveau de SB atteint 10^{3-4} UFC/g représentant une proportion significative de la communauté microbienne dans ce site (densité du microbiote du jéjunum $\sim 10^4$ UFC/g). L'intestin grêle est probablement le site principal d'action des probiotiques sur le système immunitaire de l'hôte : la couche de mucus relativement moins épaisse que dans le colon et une population endogène microbienne moins dense permettent un contact et des interactions entre les probiotiques et la surface épithéliale de l'hôte.

Contrairement à l'intestin grêle, le gros intestin héberge une population microbienne dense et diversifiée (10^{11-12} UFC/g). Ici aussi la densité de SB augmente pour représenter une part minoritaire mais non négligeable de la communauté microbienne (10^{5-6} UFC/g). Plusieurs études suggèrent que dans ce site, les probiotiques agissent principalement sur la composition et l'activité du microbiote (Hemarajata and Versalovic, 2013). Un dénombrement a également été effectué dans les fèces des mêmes animaux avant l'abattage et montre que le niveau fécal de SB était proche du niveau de SB dans la partie distale du TD (Figure 2).

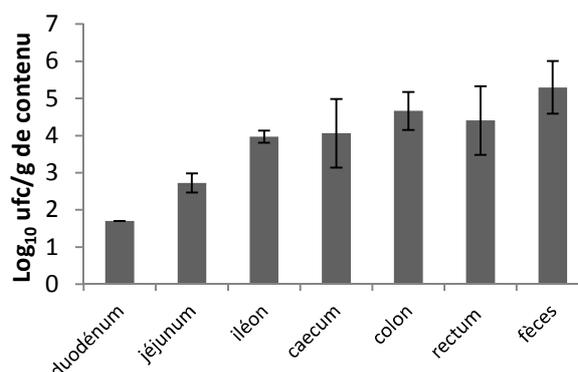


Figure 2 – Dénombrement de SB dans le TD du porcelet (n=3)

2.3. Dénombrement de SB dans les fèces des porcs

Les résultats du dénombrement fécal de SB sont présentés dans le tableau 1. Un niveau élevé de SB est retrouvé à chaque stade physiologique testé (10^{4-6} UFC/g fèces). En élevage, SB est normalement apporté par l'aliment ; cependant, durant certaines étapes de production, l'ingéré peut devenir irrégulier et très variable selon les individus. Par conséquent, en vue de contrôler le niveau de SB ingéré dans cette étude, nous avons mis en place d'autres méthodes d'administration (i.e. : bolus pour les truies ou dosage oral pour les porcelets en pré-sevrage) afin de réduire cette variabilité.

Tableau 1 – Mode d'administration, dosage et niveau dans les fèces de levures SB (ET : écart-type)

Critères	Truie (n=3)	Porcelet ¹ (n=6)	Porcelet ² (n=3x12)
Administration	Bolus	Dosage oral	Aliment (<i>ad lib</i>)
Dosage	4×10^{10} UFC/j	3×10^9 UFC/j	2×10^6 UFC/g
SB: UFC/g fèces		$7,48 \times 10^5$	$8,56 \times 10^4$
(Valeur \log_{10} \pm ET)	$1,02 \times 10^6$ (6,01 \pm 0,98)	(5,87 \pm 0,77)	(4,93 \pm 0,31)

1 : pré-sevrage (à 20 jours d'âge) après 5 jours de dosage oral

2 : moyenne sur 4 semaines post-sevrage de 3 lots de 12 porcelets

CONCLUSION

De nombreuses études révèlent que le mode d'action des probiotiques est spécifique à une espèce, et parfois même à une souche. Le but de cet article est d'affirmer que SB est une levure unique et spécifique avec une prédisposition naturelle à la survie dans le tube digestif. Nous avons développé et utilisé des techniques permettant d'identifier et d'énumérer avec précision SB dans le TD des porcs. Enfin, nous avons établi que SB reste viable et en nombre élevé tout au long de l'intestin des porcs. Ainsi, SB, administré dans l'aliment ou directement par voie orale, peut atteindre des concentrations importantes dans les fèces.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Blehaut, H., Massot J., Elmer G.W. and Levy R.H., 1989. Disposition kinetics of *Saccharomyces boulardii* in man and rat. *Biopharm. Drug Dispos.* 10(4): 353-364.
- FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, Ontario, Canada, 30 April and 1 May. 2002, pp 1-50.
- Hemarajata P., and Versalovic J., 2013. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therap Adv Gastroenterol* 6(1), 39-51.

- van der Aa Kuhle A., Skovgaard K., Jespersen L., 2005. In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int. J. Food. Microbiol.*, 101,29-39.