

# Influence du sevrage et de l'addition de levures vivantes sur la population bactérienne fécale chez le porcelet

Elizabeth KING (1), Philip RICHARD (1), Arnaud SAMSON (2), Eric SCHETELAT (3), Mélanie LE BON (1), Christine E.R. DODD (1), Eric CHEVAUX (4), Matthieu BAULEZ (4), Kenneth H. MELLITS (1)

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

(2) Invivo NSA, Rue de l'Eglise, CS 90019, 02402 Château-Thierry Cedex, France

(3) INZO° SAS, 1 rue de la Marébaudière, BP 96669, 35766 Saint-Grégoire Cedex, France

(4) Lallemand SAS, Blagnac, 31702, France.

echevaux@lallemand.com

## Influence of weaning and live yeast on faecal bacteria populations in pigs

The current studies describe how the diversity of faecal bacteria is affected by weaning and incorporation of live yeast into the post-weaning diet of pigs. Pigs were weaned at 28 days of age onto an experimental weaner diet with or without *Saccharomyces cerevisiae boulardii* CNCM I-1079 ( $4 \times 10^6$  CFU/g in feed, plus an extra dose of  $3 \times 10^9$  CFU delivered through oral drenching). A longitudinal analysis was performed, collecting faecal samples of the same individual pigs pre-weaning and at + 4 and + 11 days post-weaning. Culture-based and next generation sequencing (16S rDNA) approaches were used to describe the diversity and composition of the faecal bacterial community. We observed that a different and characteristic bacterial diversity depicts the faecal bacteria microbiota of individual pigs at weaning and after both 4 and 11 days post-weaning. In addition, our results show a difference in bacterial diversity and community structure between pigs fed live yeast versus control and that this difference may be attributable to changes in the composition of low abundance taxa. The specific changes on microbiota induced by adding live yeast to pig diets will then be investigated.

## INTRODUCTION

Le sevrage précoce des porcelets s'accompagne d'un ralentissement de la croissance et souvent de diarrhées, dus aux effets du changement d'alimentation radical, à la perturbation du transfert d'immunité maternelle et au mélange de porcelets de portées différentes. Ces troubles de la santé intestinale sont probablement liés au rôle complexe joué par la composition bactérienne du microbiote intestinal (la résistance à la colonisation par des pathogènes) sur l'expression d'une réponse immunitaire inappropriée aux antigènes alimentaires et microbiens. Nous décrivons ici l'effet du sevrage sur le microbiote bactérien chez le porc durant la période de sevrage et comment une levure vivante probiotique affecte la microflore fécale autour du sevrage.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Essai animal et collecte d'échantillon

Six porcs sevrés à 28 jours d'âge moyen ont reçu, à volonté pendant 14 jours, un aliment premier âge à base de blé avec ( $4 \times 10^6$  UFC<sup>1</sup>/g) (n= 3) ou sans *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1079 (LEVUCCELL® SB, Lallemand SAS, France ; SB) (n=3). Les populations bactériennes fécales étaient évaluées sur chaque

porcelet en le suivant tout au long de l'essai. Par ailleurs, les porcelets du lot SB recevaient durant les 5 premiers jours après le sevrage une dose orale supplémentaire de SB ( $3 \times 10^9$  UFC/j) afin de garantir une ingestion minimale de SB post-sevrage, les autres porcelets recevant un placebo. Des échantillons fécaux étaient collectés avant la distribution d'aliment le jour du sevrage (J0), puis 4 jours (J 4) et 11 jours après (J11). Le protocole a été validé par le comité d'éthique de l'Université de Nottingham.

### 1.2. Analyses microbiennes et moléculaires

Les entérobactéries ont été dénombrées sur gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBG) en utilisant une méthode de culture standard. L'ADN bactérien était extrait des échantillons fécaux en utilisant un Mini kit QIAamp DNA Stool (QIAGEN Ltd., UK) et en incorporant une étape de fractionnement à billes. La région variable V6-V8 du gène 16S de l'ARNr était amplifiée en utilisant une large gamme d'amorces bactériennes, puis les amplicons PCR étaient pyroséquencés sur une plateforme de titanium GS FLX (Roche 454 Life Sciences, Connecticut, US).

### 1.3. Analyse statistiques

Les séquences brutes ont été analysées à l'aide des logiciels

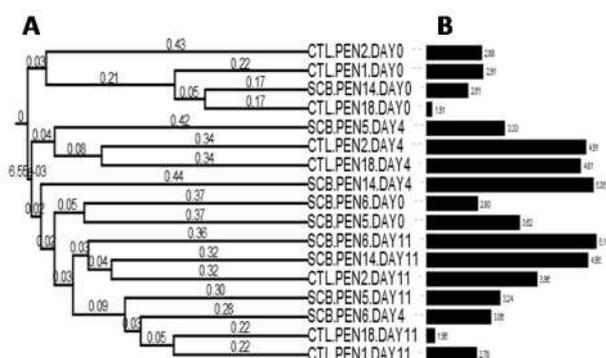
<sup>1</sup> Unité formant colonie ; CFU : colony forming unit

Mothur et Schloss 454 SOP (Schloss *et al.*, 2011). Des analyses métagénomiques ont été effectuées en calculant la  $\beta$ -diversité et en utilisant la distance UniFrac (Lozupone et Knight, 2005). La structure de la population bactérienne fécale de chaque porc (diversité  $\alpha$ ) est décrite par l'indice de Diversité de Shannon (SD), qui prend en compte la richesse des espèces et leur abondance relative. Les données obtenues par méthode culturale ont été analysées par régression linéaire (Genstat v15, VSN, Intl., UK).

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

### 2.1. Le sevrage modifie la structure du microbiote fécal

Le sevrage n'a pas influencé SD. Cependant, le microbiote fécal des porcs aussitôt après la séparation (J0) tendait à avoir un SD relativement bas (Figure 1B). Le regroupement des populations selon la méthode de Bray-Curtis (Figure 1A) indique que la structure bactérienne de pré-sevrage de quatre porcelets sur les six examinés (J0 pour cases 2, 1, 14 et 18) était différente de celle du reste des porcelets en pré-sevrage et de toutes les populations bactériennes fécales aux jours 4 et 11 de post-sevrage. De plus, les fèces des porcelets ayant à 4 et 11 jours un SD réduit par rapport aux autres porcelets du même âge présentaient une augmentation de la proportion des *Gamma Proteobacteria* (case 5 J11, case 6 J4, case 18 J11 et case 1 J11), en corrélation avec des scores diarrhéiques plus élevés (données non-présentées). Pour chaque porcelet, une augmentation significative des *Enterobacteriaceae* (incluses dans les *Gamma Proteobacteria*) dénombrées était observée entre les jours 0 et 11 ( $P < 0,05$ ; données non-présentées).

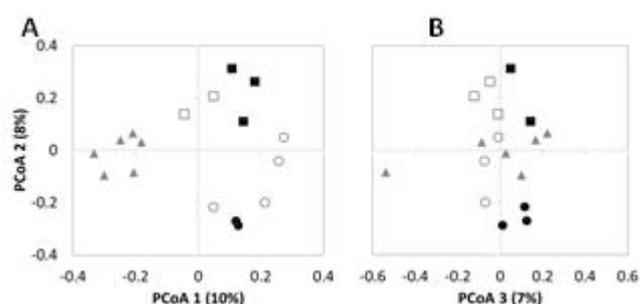


**Figure 1** – Analyse de la population microbienne des porcs en péri-sevrage (jours 0, 4 et 11) ( $n = 6$  porcelets (pen)), Traitement : CTL = Témoin, SB = *S. cerevisiae* CNCM I-1079. A : classification hiérarchique de la diversité ; B : indice de diversité de Shannon.

### 2.2. Le sevrage et la supplémentation avec SB entraînent des changements distincts du microbiote fécal

L'analyse en coordonnées principales (ACoP) de la distance

Unifrac non-pondérée a révélé qu'une plus grande similarité existe entre les populations bactériennes d'individus différents au même âge qu'entre celles du même individu à des périodes différentes (jours 0, 4 et 11) (Figure 2A). Il apparaît aussi que la supplémentation en SB engendre un changement spécifique dans la diversité bactérienne fécale des individus recevant ce probiotique, indépendamment de la période (Figure 2B) : tous les porcelets supplémentés avec SB présentent une valeur négative sur l'axe 3 de la ACoP alors que les populations provenant des porcs témoins ont une valeur positive sur cet axe. Le microbiote des individus non traités (i.e. pré-sevrage) est distribué de chaque côté des axes 2 et 3 de la ACoP.



**Figure 2** – ACoP de la communauté bactérienne (UNIFRAC non-pondéré). Chaque point correspond à la population microbienne d'un porc, les formes indiquant différentes périodes :  $\Delta$  : J0,  $\square$  : J4,  $\circ$  : J11, et la couleur indiquant le traitement : Avant traitement (gris), Témoin (noir), SB (blanc). L'axe 1 illustre l'âge du porcelet et l'axe 3 reste indéfini.

## DISCUSSION - CONCLUSION

Ces résultats indiquent que le microbiote fécal de chaque porc avant et après le sevrage se caractérise par une diversité bactérienne spécifique et variée. Ils sont en accord avec les études précédentes sur l'influence du sevrage sur le microbiote porcin (Konstantinov *et al.*, 2006). Nos données indiquent aussi qu'une forte abondance de séquences *Gamma Proteobacteria* est très liée à une diversité bactérienne faible. Il a été établi que la diminution de la diversité bactérienne, principalement due à la réduction du nombre de bactéries strictement anaérobiques, correspond à une augmentation des bactéries anaérobiques facultatives, à l'image des *Enterobacteriaceae* (Stecher *et al.*, 2007). Les populations bactériennes distinctes chez les porcs SB par rapport aux témoins suggèrent une activité réelle de la souche de levure sur l'équilibre de la flore intestinale. Les efforts méthodologiques ayant permis de déterminer de quelle façon la composition du microbiote diffère entre les groupes de traitement suggèrent que les différences sont probablement dues aux changements de familles bactériennes à faible abondance. Des travaux sont en cours pour caractériser plus précisément la nature de ces changements et leur composition bactérienne et pour déterminer le mode d'action par lequel *S. cerevisiae* CNCM I-1079 influence ces changements

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Konstantinov S.R., Poznanski E., Fuentes S., Akkermans A.D.L., Smidt H., de Vos W.M., 2006. *Lactobacillus sobrius* sp. nov., a novel isolate abundant in the intestine of weaning piglets. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 56, 29–32.
- Lozupone C., Knight R., 2005. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 8228–8235.
- Schloss P.D., Gevers D., Westcott S.L., 2011. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PLoS ONE*. 6:e27310 (accessed 22/09/2014).
- Stecher B., Robbiani R., Walker A.W., Westendorf A.M., Barthel M., Kremer M., Chaffron S., Macpherson A.J., Buer J., Parkhill J., Dougan G., von Mering C., Hardt W.D., 2007. *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS*

