

Microflore digestive des volailles : Importance pour l'animal et état actuel des connaissances (version longue, cours)

Irène Gabriel

▶ **To cite this version:**

Irène Gabriel. Microflore digestive des volailles : Importance pour l'animal et état actuel des connaissances (version longue, cours). 3ème cycle. Certificat d'Etude Approfondies Vétérinaires (formation à destination de professionnels), Gestion de la Santé et de la qualité en production avicoles et cunicoles, Module : particularité morphologiques et fonctionnelles des oiseaux, Application à l'autopsie et au diagnostic lésionnel, Nantes (Ecole Nationale Vétérinaire), France. 2008, 83 diapo. hal-03370705

HAL Id: hal-03370705
https://hal.inrae.fr/hal-03370705

Submitted on 8 Oct 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MICROFLORE DIGESTIVE des VOLAILLES :

Importance pour l'animal et état actuel des connaissances

Unité de Recherches Avicoles

Irène GABRIEL

Equipe Dynamiques Nutritionnelles

Certificat d'Etudes Approfondies Vétérinaires
Gestion de la Santé et de la Qualité en Productions Avicoles et Cunicoles,
ENV, Nantes, 26 Février 2008

~~Antibiotiques facteurs~~ de croissance (janv. 2006)

Microflore → Conséquences zootechniques

→ Conséquences économiques

→ Alternatives

→ **Mieux connaître la microflore**

La microflore digestive des volailles et ses conséquences pour l'animal

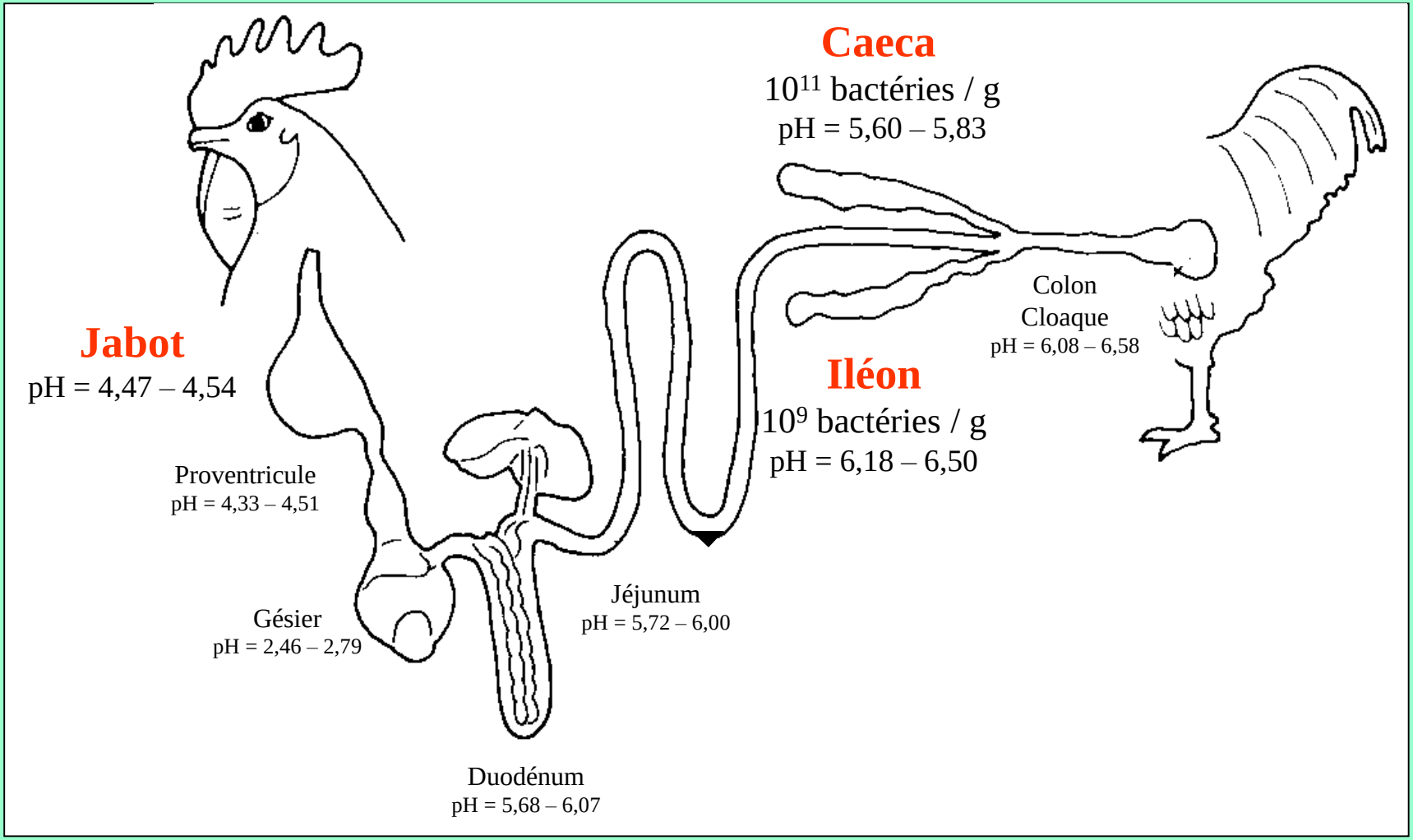
I. Effet de la flore digestive

1. Impact sur la physiologie digestive
2. Conséquence sur la valeur nutritionnelle de l'aliment
3. Rôle sur la santé de l'animal
4. Conséquences pour les productions animales

II. Etat des connaissances de la flore digestive

1. Caractérisation de la flore
    - 1.1. Approches conventionnelles
    - 1.2. Approches moléculaires
2. Facteurs de variations

Localisation de la flore digestive dans le tractus digestif des volailles



I. Effet de la flore digestive

FLORE

Métabolites utiles ou nuisibles

Physiologie digestive

Anatomie et physiologie
Production et hydrolyse du mucus
Modification du transit

↓

Valeur nutritionnelle de l'aliment

Digestion des aliments
Métabolisme azoté et énergétique

Santé de l'animal

Protection contre les micro-organismes néfastes
Stimulation du système immunitaire
Développement de pathologies

↓

Performances de croissance

Qualités des produits animaux (viande, oeuf)

PRODUCTION DE METABOLITES

1. Bénéfiques

Vitamines B, K, E (seule vit B9 serait disponible)

Substances antimicrobiennes

Acide lactique (jabot) produit par les lactobacilles

Favorable aux lactobacilles

Défavorables aux coliformes et aux autres bactéries

Bactériocines (ex : réutérine de *L. reuteri*)

Efficace contre les salmonelles, les coliformes et les campylobactères

Composés oxygénés

Péroxyde d'hydrogène / radicaux libres

Péroxyde d'hydrogène ⟶ Inhibiteurs

Bactériostatique pour les lactobacilles
Bactéricides pour les bactéries à Gram négatif

PRODUCTION DE METABOLITES

2. Néfastes

Acide cholique ⟶ Accélère le renouvellement cellulaire intestinal

Enzymes déconjuguant les sels biliaires

Produits toxiques issus de certains acides aminés

Tryptophane ⟶ Indole / scatole

Cystéine ⟶ Mercaptan d'éthyl et de méthyl

Endotoxines produites par des bactéries à Gram négatif

⟶ Pyrogènes endogènes ⟶ Fièvre

Toxines ⟶ Motricité intestinale ⟶ Diarrhées

Substances mutagènes / carcinogènes

Oligopeptides potentiellement inflammatoires

PRODUCTION DE METABOLITES

3. Produits à effets mixtes (1)

Acides gras volatils

Jabot : acide acétique

Caeca : acide acétique (acide propionique et butyrique)

Effet positif

Source d'énergie potentielle (entérocytes, animal)

Fonctionnement des viscères

- Prolifération de la muqueuses intestinale
- Motricité intestinale
- Stimulation de l'absorption (eau, minéraux, glucose, acides aminés)

Immunomodulation (butyrate)

Bactériostatiques ou bactéricides

- Effet négatif sur la croissance des Entérobactériaceae, entérocoques
- Sans effet sur la croissance des lactobacilles

Effet négatif

Favorables (±) à *Salmonella Typhimurium*

PRODUCTION DE METABOLITES

3. Produits à effets mixtes (2)

Ammoniac (issus de composés azotés alimentaires et urinaires)

Effet positif Synthèse d'acides aminés non essentiels

Effet négatif Toxique cellulaire

Amines (décarboxylation d'acides aminés)

Putrescine, spermidine, spermine

Effet positif Stimulation de la croissance de la muqueuse intestinale, de l'absorption

Effet négatif Histamine ⟶ Réaction inflammatoire

1. IMPACT SUR LA PHYSIOLOGIE DIGESTIVE

Anatomie et physiologie digestive

Interaction microflore / muqueuse digestive

⟶ Modification de la structure et du fonctionnement du tube digestif

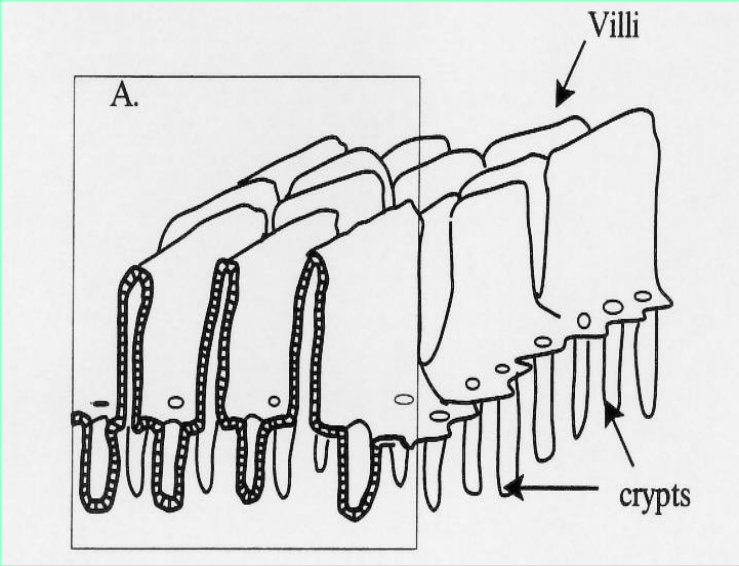
Ex : *Bacteroides thetaiotaomicron* (flore commensale intestinale de la souris et de l'homme)

⟶ Modulation de l'expression de gènes impliqués dans plusieurs fonctions intestinales importantes

- Absorption de nutriments
- Fonction de barrière de l'épithélium
- Métabolisme des xénobiotiques
- Angiogénèse
- Maturation intestinale

1. IMPACT SUR LA PHYSIOLOGIE DIGESTIVE

Anatomie et physiologie digestive



Intestin grêle

Tissus ↗ Longueur relative

↗ Epaisseur de la paroi

Tissus connectif (*Lamina propria*)

Villosité ↗ Hauteur (jéjunum, iléon)

↘ Régularité de la forme

Microvillosité ↘ Surface développée / unité de surface

Crypte ↗ Profondeur (du duodénum à l'iléon)

↗ Nombre de cellules en division (↗ renouvellement cellulaire)

Entérocyte ↘ Maturité (plus rapidement en haut des villosités)

↘ Activité (/g tissus) Maltase, saccharase (mais similaire / pds animal)

Absorption de nutriments non modifiée

1. IMPACT SUR LA PHYSIOLOGIE DIGESTIVE

Anatomie et physiologie digestive

Caeca Tissus ↗ Poids relatif

↗ Epaisseur de la paroi

↘ Temps renouvellement cellulaire dans partie distale (plus riche en flore)
% partie proximale (moins riche en flore)

Contenus digestif ↘ pH

↘ Potentiel d'oxydo-réduction

1. IMPACT SUR LA PHYSIOLOGIE DIGESTIVE

Production et hydrolyse du mucus

↗ Production de mucines

Modification des proportions des différents types de glycoprotéines

Source de carbone et d'énergie pour certaines bactéries

Modification du transit

↗ Vitesse de transit avec un probiotique dans un régime orge/maïs/soja, mais pas maïs/soja (Nahashon et al, 1994)

2. VALEUR NUTRITIONNELLE DE L'ALIMENT

Digestion des aliments

Effet positif : Bactéries → Nutriments → Hôte

Effet négatif : Compétition hôte / bactéries (Aliments peu digestibles)

Glucides

Digestibles par l'hôte : Amidon : digestibilité non modifiée

Non digestible par l'hôte → Fermentation par la flore (caeca)

Lipides

Effet négatif : Déconjugaison des sels biliaires

→ ↘ Solubilisation des lipides (acides gras saturés à longue chaîne)

→ ↘ Digestibilité acides gras saturés à longue chaîne

Chez les jeunes poulets

Protéines

Effet positif : Protéines difficilement hydrolysable par l'hôte

Effet négatif : Pertes endogènes (mucus, débris cellulaires, biomasse bactérienne)

Globalement : peu d'effet

2. VALEUR NUTRITIONNELLE DE L'ALIMENT

Métabolisme azoté et énergétique

Effet négatif Flore → ↗ Intestin Consommateur d'énergie et protéines (renouvellement rapide 24-48h)

→ ↗ Besoin (Energie, Protéines)

Métabolisme azoté

Effet positif

Composés N (alimentaire, urinaire (a. urique))

→ Bactéries (caeca) → NH3 → Absorption → Acides aminés non essentiels

Effet négatif ↗ Synthèse protéique totales (6-8%)

+ 25% au niveau du foie (métabolisme et détoxification des produits bactériens)

+ 45% au niveau de l'intestin

↘ Utilisation protéique (régimes pauvres en énergie)

→ ↘ Protéines retenues / Protéines consommées

2. VALEUR NUTRITIONNELLE DE L'ALIMENT

Métabolisme azoté et énergétique

Métabolisme énergétique

Effet positif : Fermentation (glucides non disp.) → AGV → Absorption (caeca) → Energie

Effet négatif :
- ↘ Digestibilité lipides
- Fermentation des glucides disponibles pour l'animal
- ↗ Pertes endogènes
- Détoxification de produits de la flore

→ ↗ Besoins énergétiques

2. VALEUR NUTRITIONNELLE DE L'ALIMENT

Minéraux

Effet positif ↗ Absorption Na (AGV)

Effet négatif ↘ Absorption / transport Ca

↘ Absorption Mn

↗ Besoin Mg et P

Vitamines

Effet positif Synthèse de vitamines (Acide folique Vit B9)

Effet négatif ↗ Besoin (Vit B5 : détoxification)

↘ Absorption Vitamines B *in vitro*

↘ Absorption Vitamines liposolubles (sels biliaires)

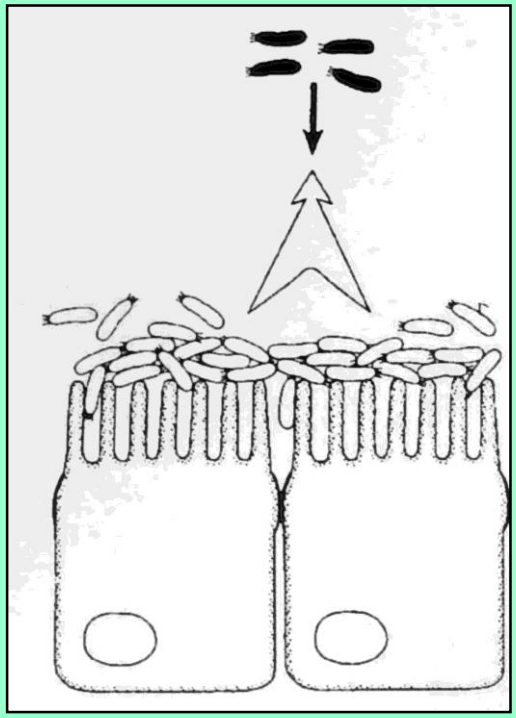
3. ROLE SUR LA SANTE DE L'ANIMAL

Protection contre les micro-organismes néfastes

La flore autochtone empêche l'implantation de la flore pathogène

'Effet barrière' : la 1ère flore implantée empêche l'installation d'une autre flore

Mise en place avant la maturité du système immunitaire du tube digestif



Mécanismes

Création par des bactéries bénéfiques d'un micro-environnement hostile aux autres espèces bactériennes

Substances antimicrobiennes

Acides gras à chaîne courte

Bactériocines

Composés oxygénés (Péroxyde d'hydrogène)

Modification de récepteurs

Utilisation compétitive de nutriments essentiels

Stimulation du système immunitaire intestinal

3. ROLE SUR LA SANTE DE L'ANIMAL

Stimulation du système immunitaire

Développement et maintien du **Système Immunitaire Intestinal**

Influence le nombre, la distribution, le degré d'activation des populations cellulaires du SII

Source majeure de stimuli antigéniques

→ Maturation / migration des cellules lymphoïdes des plaques de Peyer

Régulation de la réponse immunitaire

Stimulation de l'immunité **non spécifique**

↗ Synthèse de cytokines → Réponse inflammatoire

Fonctionnelle

Excessive → ↗ Catabolisme protéique

Activation continue du SI → ↘ Réduction des performances zootechniques

Modulation de l'immunité **spécifique** au niveau **local** et **systémique**

→ Tolérance orale aux protéines Alimentaires / Bactériennes

→ Modulation de la réponse aux pathogènes

Bactéries : propriétés immunomodulatrices spécifiques

→ **Réponse immunitaire** = f (composition de la flore)

3. ROLE SUR LA SANTE DE L'ANIMAL

Développement de pathologies

Fermentation

Acides aminés → Ammoniac → Conjonctivites

→ Problèmes respiratoires

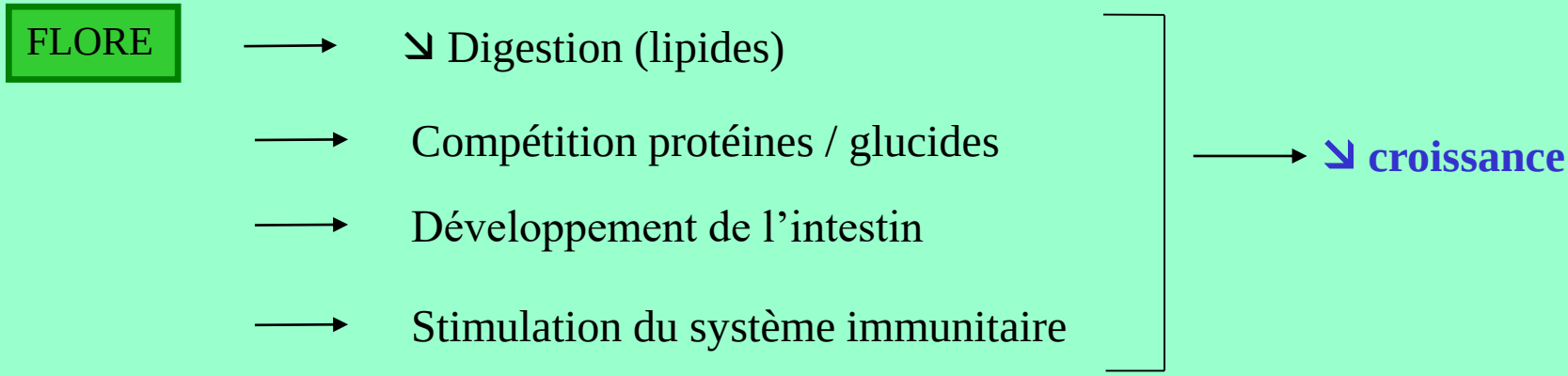
Humidité de la litière → Problèmes locomoteurs

→ Développement de pathogènes dans la litière

4. CONSEQUENCES POUR LES PRODUCTIONS ANIMALES

Performances de croissance

Hypothèse d'action de la flore digestive sur la croissance



Action spécifique de certains micro-organismes

Streptococcus faecium (*Enterococcus hirae*)

Clostridium perfringens

4. CONSEQUENCES POUR LES PRODUCTIONS ANIMALES

Qualités des produits animaux

Qualité sanitaire — **Pathogènes** : Salmonelles, *Campylobacter jejuni*, …

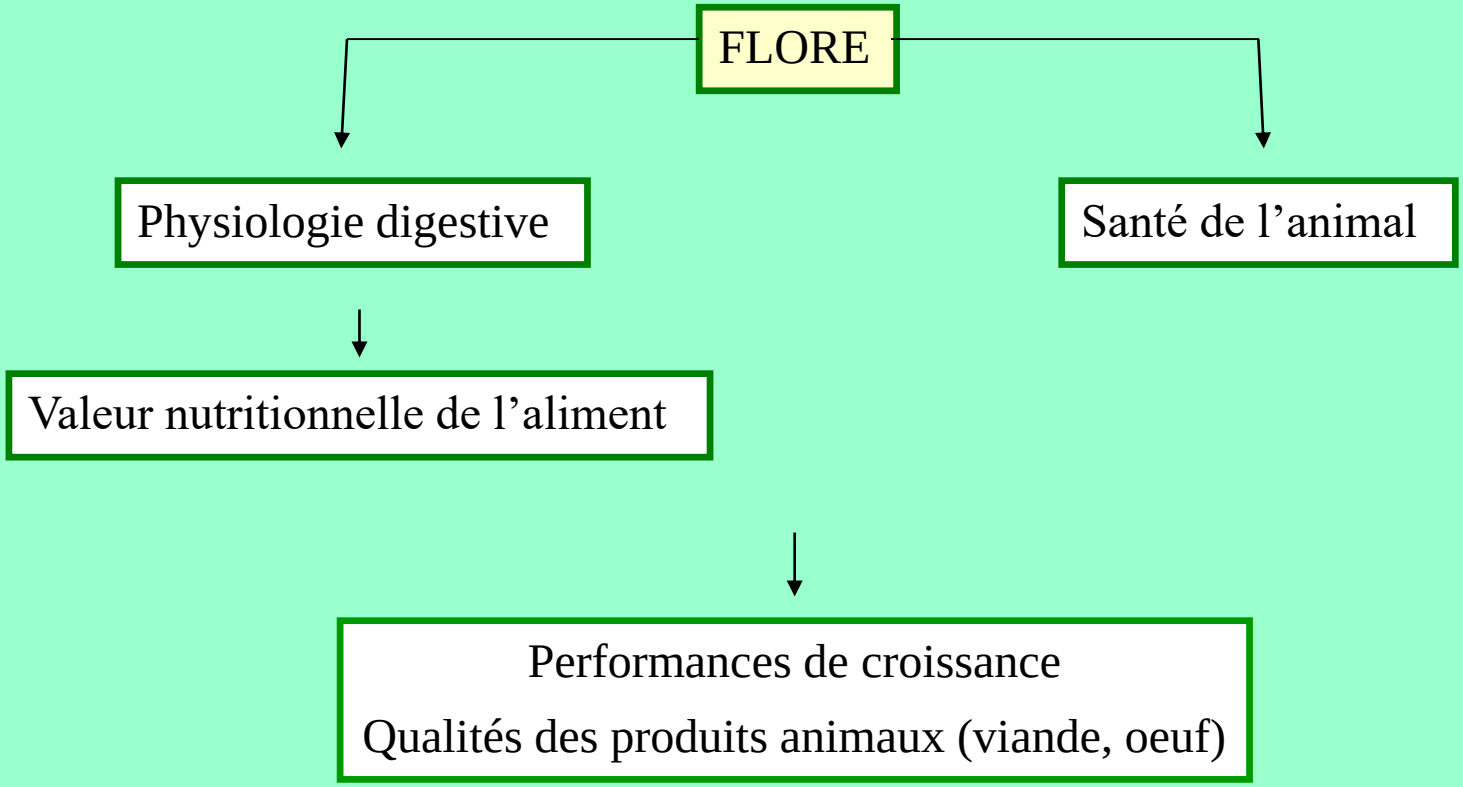
Composition / qualité organoleptique — Viande / Oeuf

Ex : Faisandage des viandes ⟶ Flaveur

Ex : Mauvais goût des jaunes des œufs à coquille colorée

Colza / Farine de poisson

Bactéries à Gram positif : choline ⟶ Triméthylamine



→ **Mieux connaître la flore et ses facteurs de variations**

La microflore digestive des volailles

I. Effet de la flore digestive

1. Impact sur la physiologie digestive

2. Conséquence sur la valeur nutritionnelle de l'aliment

3. Rôle sur la santé de l'animal

4. Conséquences pour les productions animales

II. Etat des connaissances de la flore digestive

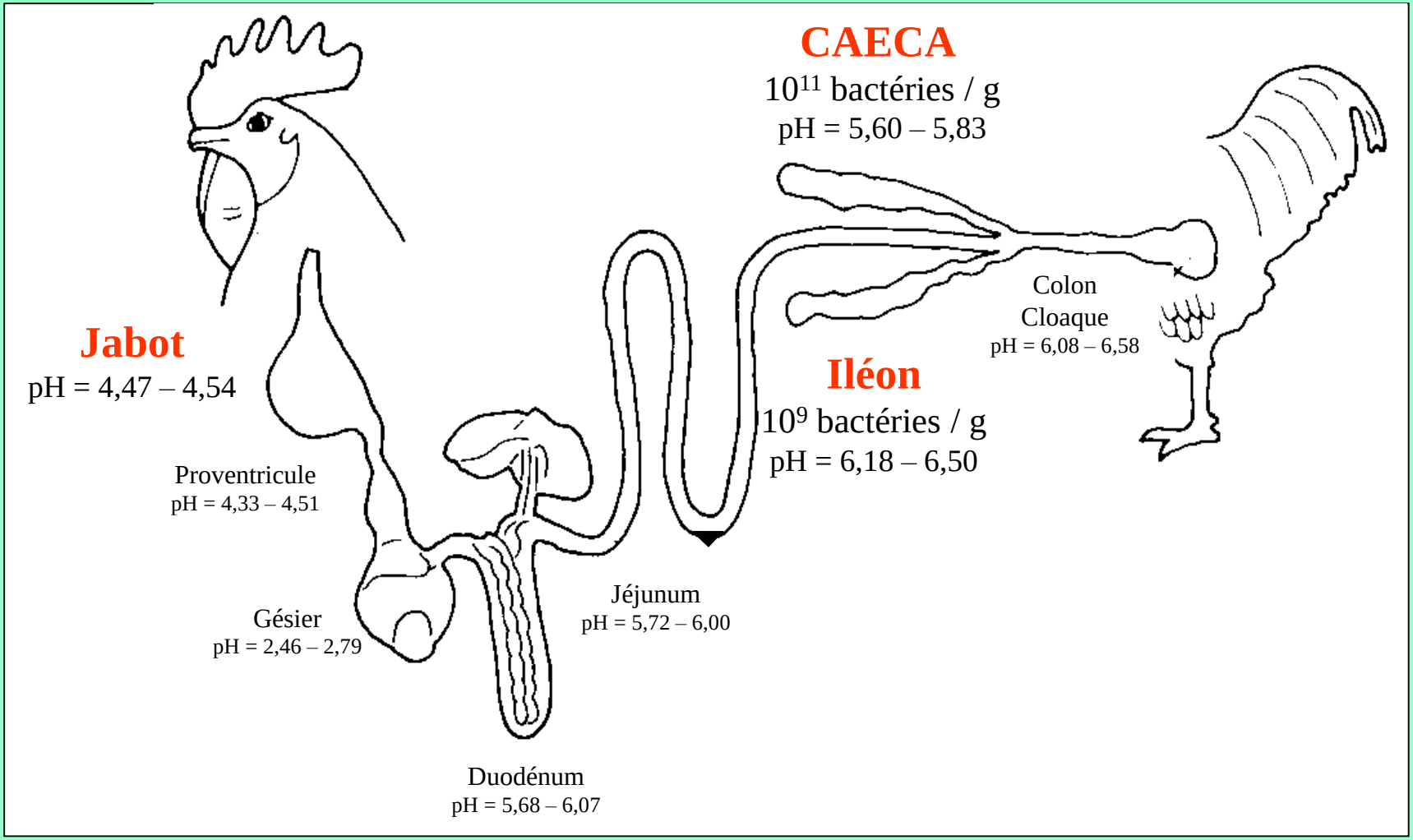
1. Caractérisation de la flore

1.1. Approches conventionnelles

1.2. Approches moléculaires

2. Facteurs de variations

Localisation de la flore digestive dans le tractus digestif des volailles



1. CARACTERISATION DE LA FLORE

1.1. Approches conventionnelles

Principalement Gram positif

Jabot à l'iléon terminal : anaérobies facultatives

Jabot : lactobacilles (streptocoques, coliformes)

Gésier, proventricule : chute des populations bactériennes (pH)

Duodénum : population faible (enzymes, PO_2, sels biliaires, reflux)

Intestin grêle : lactobacilles (streptocoques, coliformes)

Caeca : diversité plus importante

Anaérobies facultatives

Principalement anérobies strictes (*Eubacterium*, bifidobacteries, clostridies)

Souches identifiées

29 genres bactériens, 3 à 4 espèces, 3 à 4 types métaboliques ⟶ 200 souches

Selon les estimations, jusqu'à 90% non cultivables

⟶ **Approches moléculaires**

1. CARACTERISATION DE LA FLORE

1.2. Approches moléculaires

Avantages Indépendantes des conditions de viabilité

→ Image plus complète de la flore digestive

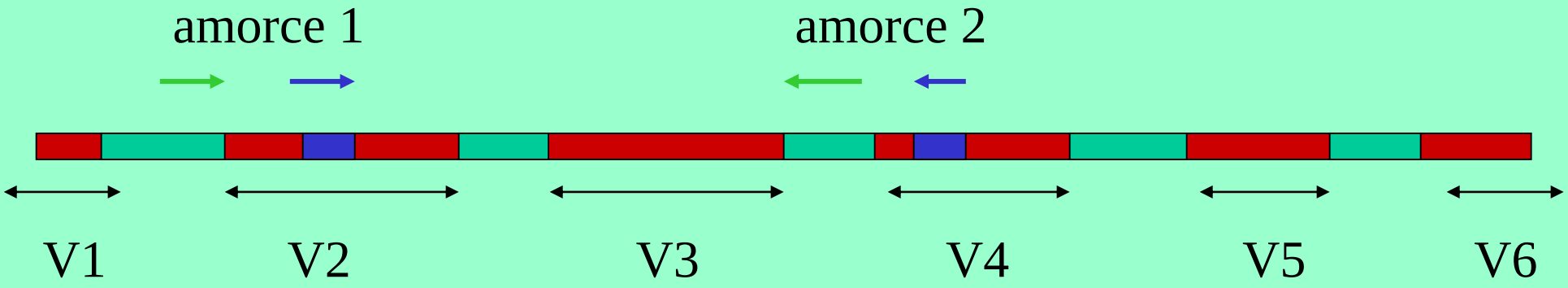
→ 640 espèces (Apajalahti et al, 2004)

1. CARACTERISATION DE LA FLORE

1.2. Approches moléculaires

Généralement basées sur l'étude des séquences des ADN ribosomaux

Raisons
- Présents dans toutes les cellules
- Evolution génétique très lente
- Structure primaire : succession de domaines conservés et variables



Séquences **conservées = identiques dans tous les ADN ribosomaux** bactériens

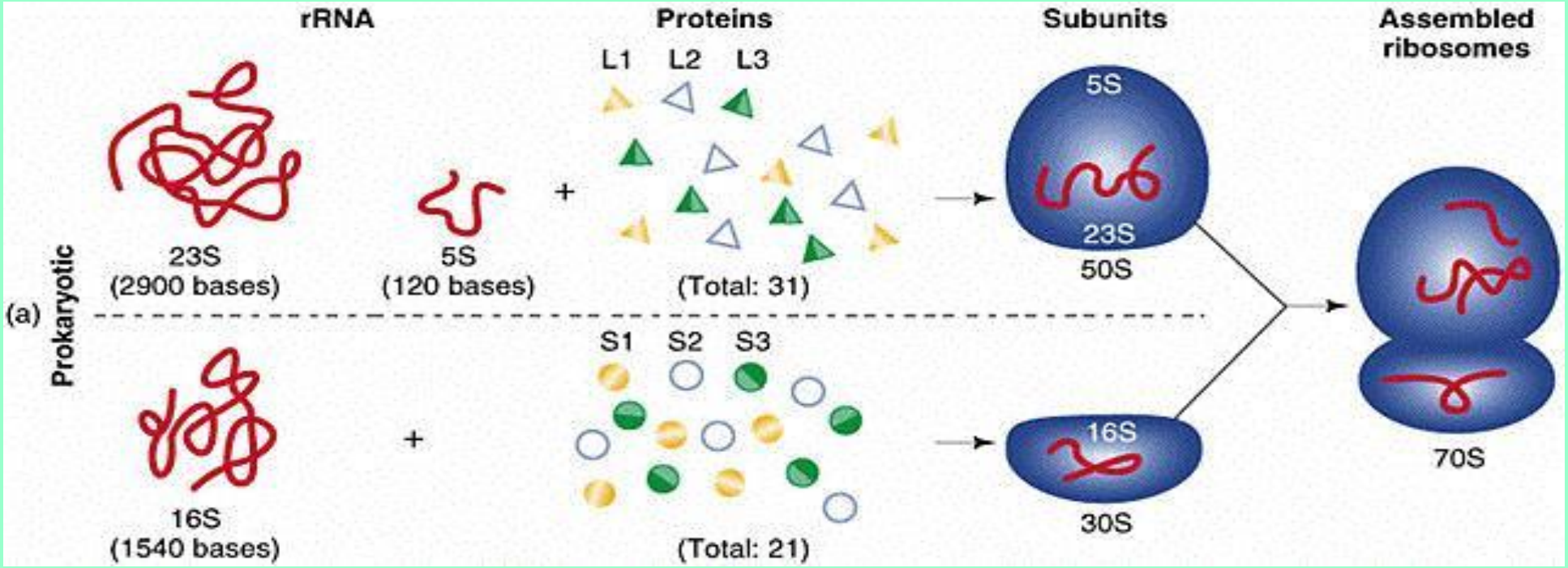
Séquences identiques entre bactéries d'un même **genre** bactérien

Séquences variables

→ Facilite la détection et l'identification des espèces microbiennes

→ Cibles permettant la construction d'amorces / sondes

Composition du ribosome procaryote



ARNr 5 S : 120 nucléotides → Etude rapide de sa séquence, mais trop peu informative

ARNr 23 S : 2 900 nucléotides → Plus informatif, mais séquence longue à déterminer

ARNr 16 S : 1 500 nucléotides → Intermédiaire

1. CARACTERISATION DE LA FLORE

1.2. Approches moléculaires

PoultryflorGut (Programme européen, 2005-2008)

Estimation de la diversité par empreinte moléculaire (profil, identification des bandes)

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis TGGE / TTGE

SSCP : Single Strand Conformation Polymorphism (gel, électrophorèse capillaire)

RFLP / T-RFLP : (Terminal) Restriction Fragment Length Polymorphism

ARISA : Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis

Identification des espèces présentes par inventaires moléculaires

Clonage / Séquençage

Quantification

FISH : Fluorescence in Situ Hybridization

PCR quantitative

Empreinte moléculaire

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis TGGE / TTGE

Principe

Technique permettant de séparer des fragments d'ADN double brin

de taille identique

en fonction de leur dynamique de dénaturation

qui dépend principalement de la teneur en GC

Région riche en GC :

nécessite des conditions de dénaturation importantes

Région riche en AT :

nécessite des conditions de dénaturation moins importantes

Empreinte moléculaire

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis TGGE / TTGE

Les différentes étapes (1)

Echantillon
(contenu digestif)

↓ Extraction de l'ADN bactérien

ADN bactérien

↓ Amplification par PCR
d'une région variable
de l'ADNr16S (Ex : V6-V8)

Fragments d'ADNr 16S

De taille identique (Ex :473 pb)

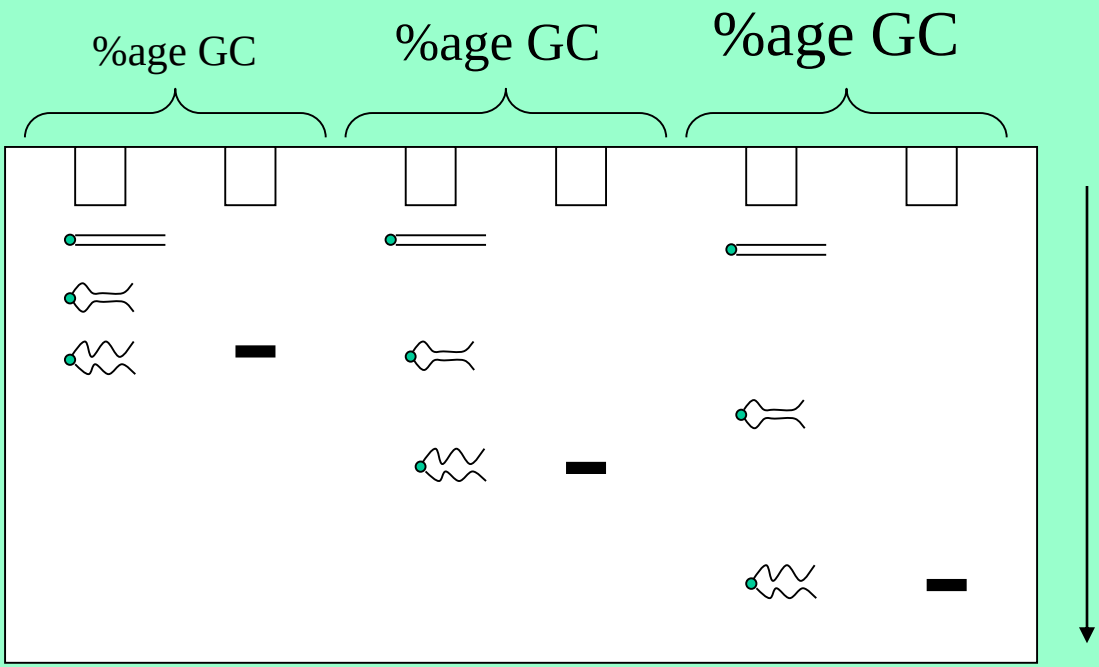
De dynamique de dénaturation différente

Empreinte moléculaire

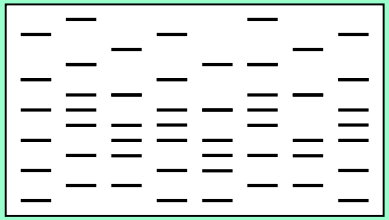
DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis TGGE / TTGE

Les différentes étapes (2)

Séparation sur un gel d'acrylamide dénaturant



Gradient de dénaturant
ou de température



Coloration (Sybr Green : large gamme de coloration (+ 3 Log))

→ Empreinte moléculaire

1 bande ≈ 1 espèce bactérienne

Sensibilité : bactéries représentant + 1% (Amorce de groupe : 10^{-3}%)

Empreinte moléculaire

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis TGGE / TTGE

Les différentes étapes (3)

Analyse des gels

Comparaison de profils (Logiciel d'analyse d'image : Fingerprint, GelCompar..)

Coefficient de similarité

Corrélations de Pearson (nombre, position et intensité des bandes)

Dendrogramme construit avec l'algorithme UPGMA

(Unweighted Pair Group Method using Arithmetic average)

Identification de bandes apparaissant ou disparaissant selon un contexte particulier

Excision des bandes

Séquencage

Empreinte moléculaire

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis TGGE / TTGE

Avantages

Méthode reconnue
Relativement facile à mettre en œuvre
Coût relativement faible
Applicable à des fragments jusqu'à 500 pb
Analyse de communauté non connue
Possibilité d'identification des bandes

Inconvénients

Biais liés à l'extraction d'ADN / PCR
Faible sensibilité : amorce universelle (espèces représentant + 1% population totale)
amorce spécifique (espèces représentant + 10^{-3}% population totale)
Co-migration d'amplicons différents
Pas de possibilité de haut débit
Problème de reproductibilité (gradient d'acrylamide)
Difficulté d'identification des bandes

Empreinte moléculaire

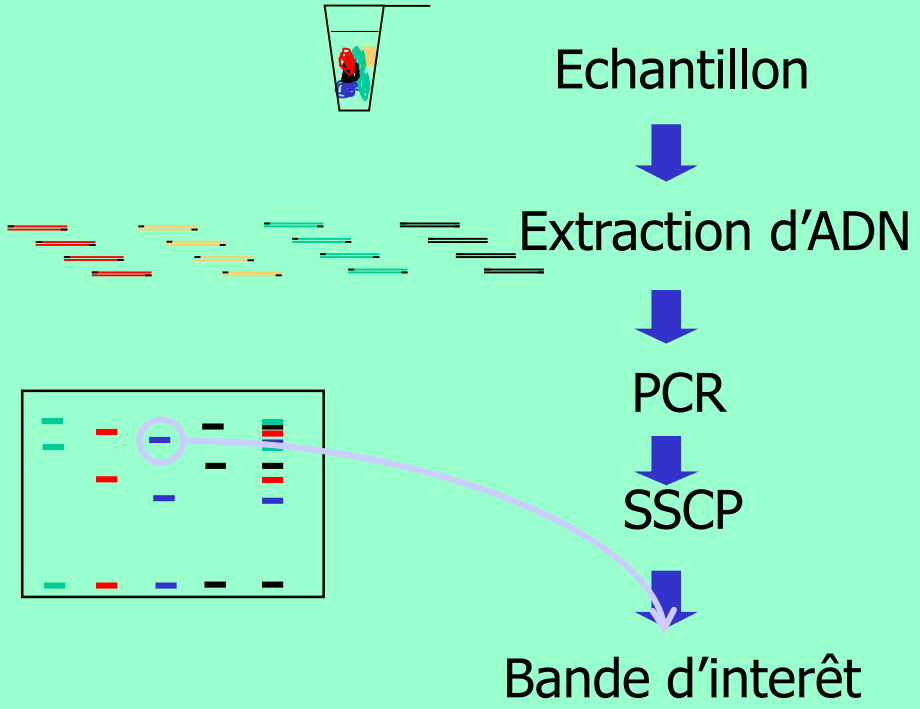
SSCP : Single Strand Conformation Polymorphism

CE-SSCP : Capillary Electrophoresis SSCP

Principe

Extraction en amplification de l'ADN
Dénaturation de l'ADN (94°C) , d'où ADN simple brin
Refroidissement brusque, d'où formation d'une structure II
Migration (gel ou séquenceur capillaire)
Détection par fluorescence (1 fluorochrome / brin ADN)

→ Empreinte moléculaire



Avantages

Méthode à haut débit
Répétable

Inconvénients

Matériel coûteux (CE-SSCP)
Personnel spécialisé
Pas d'identification direct des pics (clonage/séquençage)

Clonage + séquencage

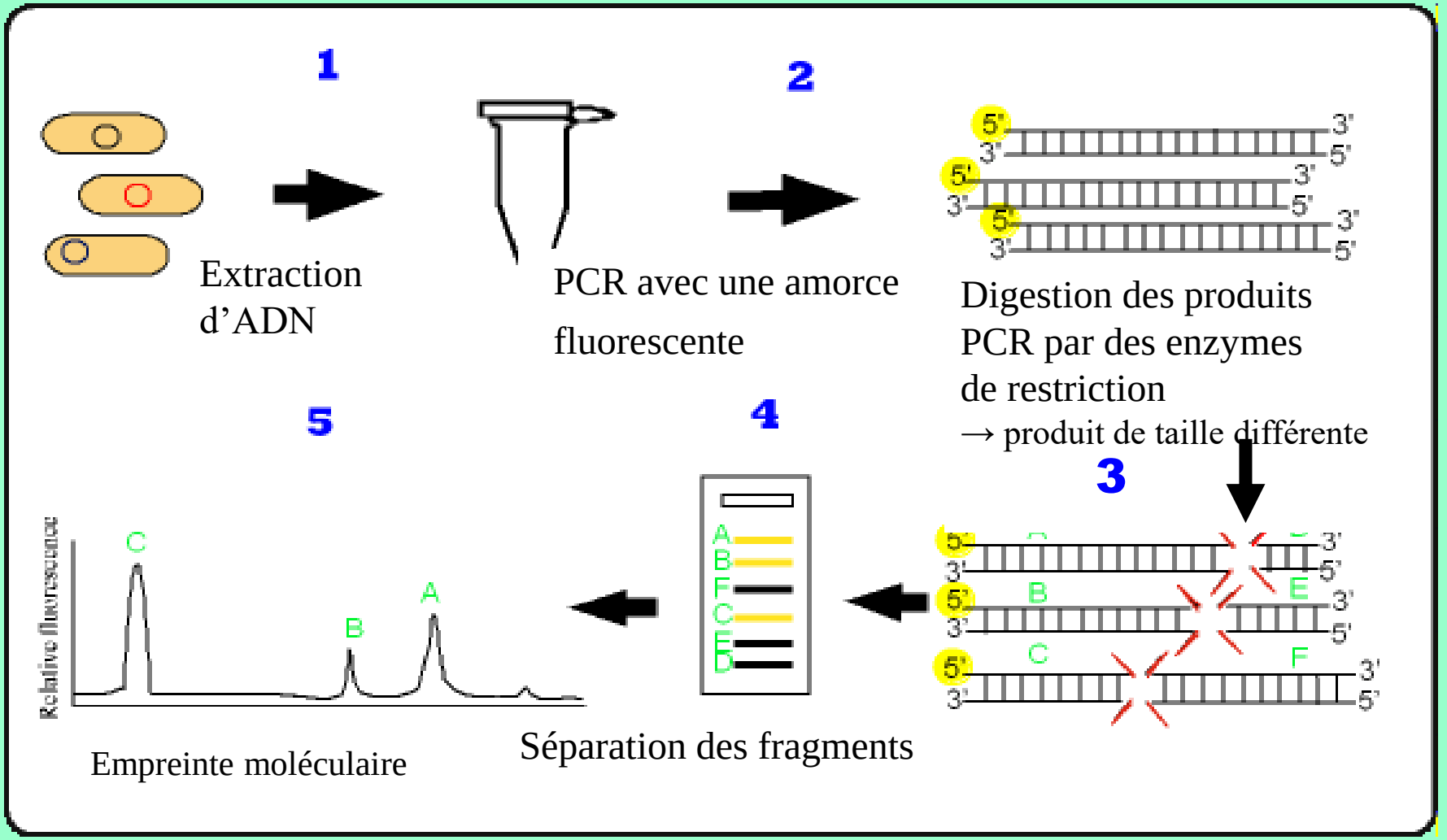


Bases de données

Empreinte moléculaire

T-RFLP : Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

Principe



Avantages
- Méthode à haut débit
- Haute sensibilité (espèce représentant 0.5% de la population totale)

Inconvénients
- Pic non récupérable pour identification

Quantification

FISH (Fluorescent in Situ Hybridization targeting rRNA) : Hybridation in situ

Principe

- Muqueuse intestinale / Contenu digestif
- Hybridation in situ avec une sonde d'oligonucléotides (15 à 20 pb) marquée par fluorescence
- Comptage bactérien avec un microscope à fluorescence → détection visuelle ou caméra CCD

Avantages

Indépendant des biais d'amplifications (PCR)
Haut débit : en cytométrie de flux (solution)
Visualisation spatiale si en microscopie (pas en cytométrie de flux)

Inconvénients

Traitement rapide des échantillons après les prélèvements (dans le mois suivant)
Cible doit être connue
Disponibilité des sondes
Application dans des milieux biologiques complexes
Normalement quantitatif, mais problèmes de préparation de l'échantillon pour une réelle quantification
Faible sensibilité - microscopie : bactérie présente à + de 1%
- cytométrie de flux : bactérie présente à + de 0.1%

Quantification

PCR quantitative ou en temps réel

Principe

- Extraction d'ADN
- Amplification par PCR (amorce spécifique)
- Suivie de la formation des produits de PCR au cours du temps
- Recherche du début de la phase exponentielle de la courbe montrant la formation des amplicons (PCR : phase d'attente / phase exponentielle / plateau)

Avantages

Haute sensibilité (10^4>x <10^2 CFU/g, soit 10^{-5}% de la population)
Haut débit

Inconvénients

Biais d'extraction d'ADN
Cibles doivent être connues
Coût élevé

Approches moléculaires

	Avantages	Inconvénients
DGGE (TGGE, TTGE)	Méthode reconnue Facile à mettre en œuvre Coût relativement faible Identification des bandes	Biais : extraction d'ADN / PCR Sensibilité (+ 1% → 10^{-3}%) Pas de possibilité de haut débit Reproductibilité (gradient d'acrylamide)
SSCP CE-SSCP (capillaire)	Possibilité de haut débit (CE-SSCP)	Biais : extraction d'ADN / PCR Mise en œuvre, Coût Identification indirecte (clonage, séquençage)
T-RFLP	Possibilité de haut débit Sensibilité (0.5%)	Biais : extraction d'ADN / PCR Pas d'identification des bandes
Clonage / Séquençage	Identification	Grand nombre de clones (laborieux)
FISH	Pas de biais extraction / PCR Possibilité de haut débit (cytométrie de flux) Visualisation spatiale (microscopie)	Cibles connues Disponibilité des sondes Sensibilité (microscopie : +1%; cytométrie de flux : + de 0.1%
PCR quantitative	Haute sensibilité (10^{-5}%) Haut débit	Biais d'extraction d'ADN Cibles connues Coût élevé

1.2. Approches moléculaires

Composition de la flore des contenus digestifs (clonage, séquencage; Lu et al., 2003)

Régime maïs soja, sans antibiotique, animaux de 3 à 49 j

Groupe	Classe	% de classe	
		Jéjunum[1]	Caeca[2]
Gram +, faible G+C	Lactobacillaceae	68.7	8.2
	Clostridiaceae	10.8	65.6
	Bacillaceae	0.7	1.4
	Staphylococcaceae	1.0	0
	Streptococcaceae	6.6	0.7
	Enterococcaceae	6.4	1.0
Gram +, fort G+C	Fusobacteriaceae	0.7	13.9
	Bifidobacteriaceae	0.2	0
Gram -, protéobactéries		2.3	2.8
Gram -	Flavobacteriaceae	0	0.2
	Bacteroïdaceae	0.6	5.0

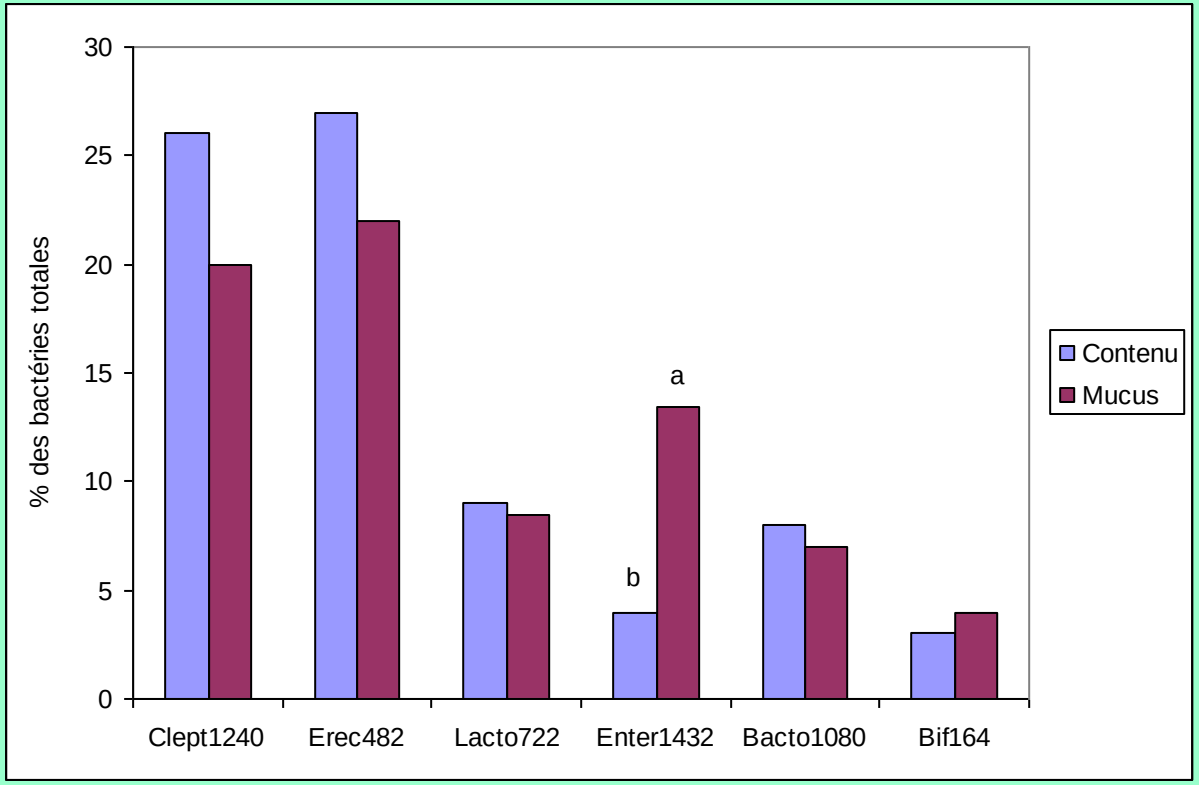
[1] 614 séquences ; [2] 616 séquences

1.2. Approches moléculaires

Différence de composition de la flore digestive caecale entre les contenus et le mucus

(FISH, Zhu et Joerger, 2003)

Broiler, 6 semaines



Clep1240 : sous groupe *Clostridium leptum*
Erec482 : *Clostridium coccoides – Eubacterium rectale*
Lacto722 : *Lactobacillus/Streptococcus/Enterococcus*
Enter1432 : Entériques
Bacto 1080: groupe *Bacteroides*
Bif164: Bifidobacteries

Contenu ∑6 : 78 %
Mucus ∑6 : 77%

⟶ D'autres sondes sont nécessaires

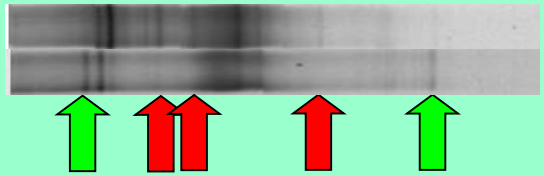
1.2. Approches moléculaires

Caractérisation de la flore active

FLORE PRESENTE / FLORE ACTIVE

Comparaison des profils TTGE obtenus à partir des ADNr 16S et des ARNr 16S

Flore digestive humaine : Sokol et al (2006)



ADN : flore présente
ARN : flore active

La microflore digestive des volailles

I. Effet de la flore digestive

1. Impact sur la physiologie digestive

2. Conséquence sur la valeur nutritionnelle de l'aliment

3. Rôle sur la santé de l'animal

4. Conséquences pour les productions animales

II. Etat des connaissances de la flore digestive

1. Caractérisation de la flore

1.1. Approches conventionnelles

1.2. Approches moléculaires

2. Facteurs de variations

2. Facteurs de variation

2.1. Individu

2.2. Segment digestif

2.3. Age

2.4. Alimentation

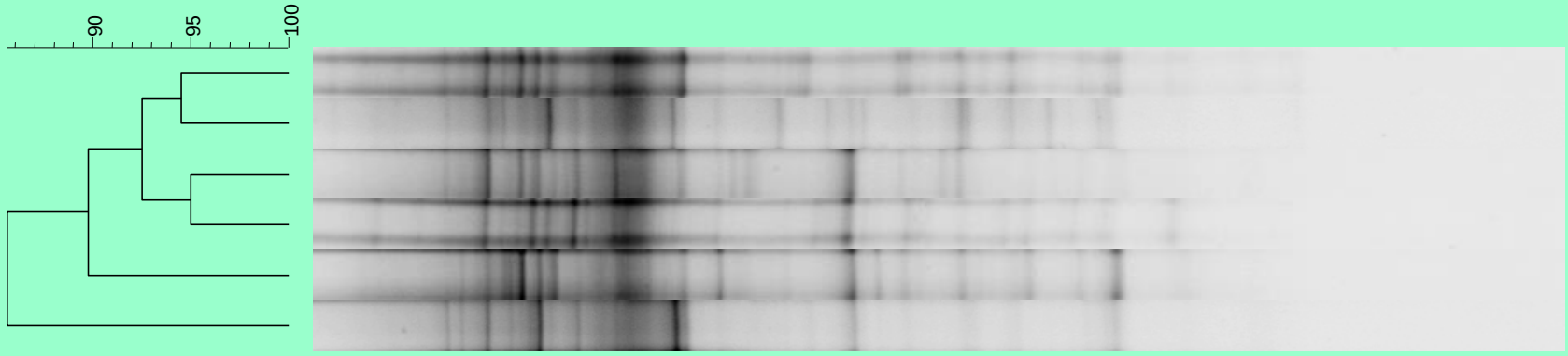
2.5. Elevage

2.6. Présence de pathogènes

2.1. Effet de l'individu

Broiler de 30 j / Contenus caecaux / Profils électrophorétiques (TTGE, amorce Bacteria)
(SRA-UEASM)

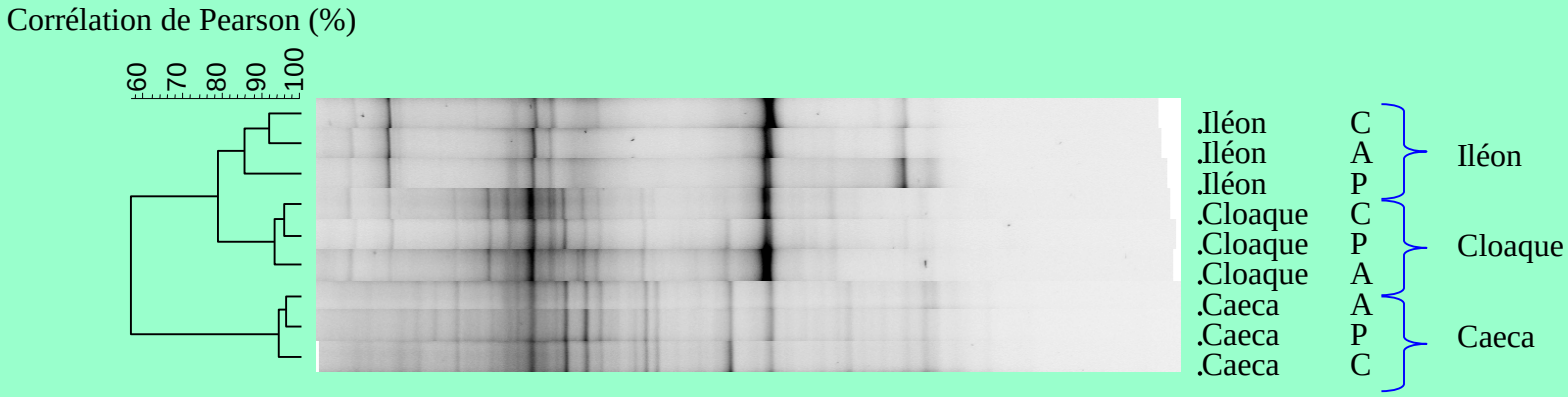
Correlation de Pearson (%)



2.2. Variation selon le segment digestif

Poulet (Broiler) : 26 j Pool (30 animaux) C : Contrôle négatif / A : Avilamycine / P: Probiotique

(PoultryFlorgut 2005-2008)



⇨ Flore nettement différente selon le segment digestif

2.3. Effet de l'age

Eclosion : tube digestif stérile

1er jour : Iléon 10^8 bactéries / g

Caeca 10^{10} bactéries / g

3ème jour et plus : Iléon 10^9 bactéries / g

Caeca 10^{11} bactéries / g

(Apajalahti et al, 2004)

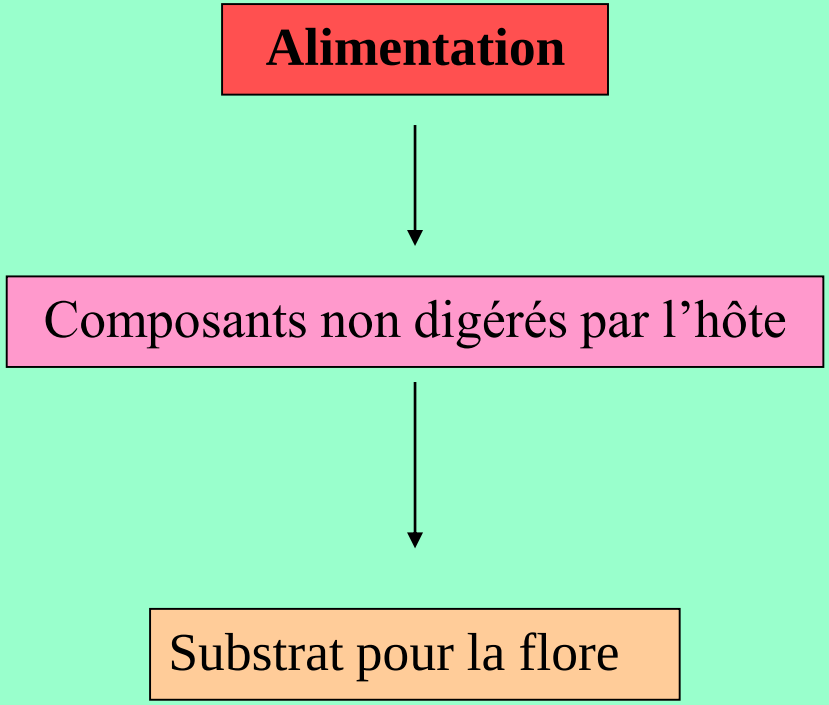
Diversification avec l'âge

2.3. Effet de l'age

Régime maïs soja, sans antibiotique / contenus caecaux / Clonage, séquencage (Lu et al., 2003)

Groupe	Classe	% de classe					
		3 j	7 j	14 j	21 j	28 j	49 j
Gram +, faible G+C	Lactobacillaceae	25.7	4.3	9.9	1.0	0.9	7.2
	Clostridiaceae	51.4	85.0	73.0	56.6	56.1	74.2
	Bacillaceae			2.7	4.0	1.8	
	Streptococcaceae	2.9					1.0
	Enterococcaceae	1.9	2.2	0.9			2.0
Gram +, fort G+C	Fusobacteriaceae		2.2	9.0	27.3	35.1	7.2
Gram -, protéobactéries		15.2	2.2	9.9	27.3	35.1	7.2
Gram -	Flavobacteriaceae	1.0					
	Bacteroïdaceae	1.0	5.4	3.6	10.1	5.3	5.2
Bactéries inconnues		1.0	1.1		1.0	0.9	3.1

2.4. Effet de l'alimentation



2.4. Effet de l'alimentation

1. Mode de présentation Graines entières de céréales

Granulation

2. Glucides Type de céréales

Polysaccharides non amylacés hydrosolubles

Amidon

Fructo-oligosaccharides (FOS)

3. Lipides

4. Protéines

5. Minéraux et vitamines

6. Probiotique

2.4. Effet de l'alimentation

1. Mode de présentation Graines entières de céréales

Approches conventionnelles : comptages microbiens

Gésier

- ↘ Bactéries anaérobies (Engberg et al, 2004)
- ↘ Entérobactéries lactose négatives (Engberg et al, 2004)

Intestin

- ↘ bactéries anaérobies facultatives (Gabriel et al, 2007)
- ↘ Coliformes (Glünder, 2002; Gabriel et al, 2003)
- ↘ Entérobactéries lactose négatives (Engberg et al, 2004)
- ↘ Bactéries pathogènes : *Salmonella spp*., *C. perfringens* (Engberg et al, 2003 et 2004)

- ↗ Certaines espèces de lactobacilles (Engberg et al, 2004)

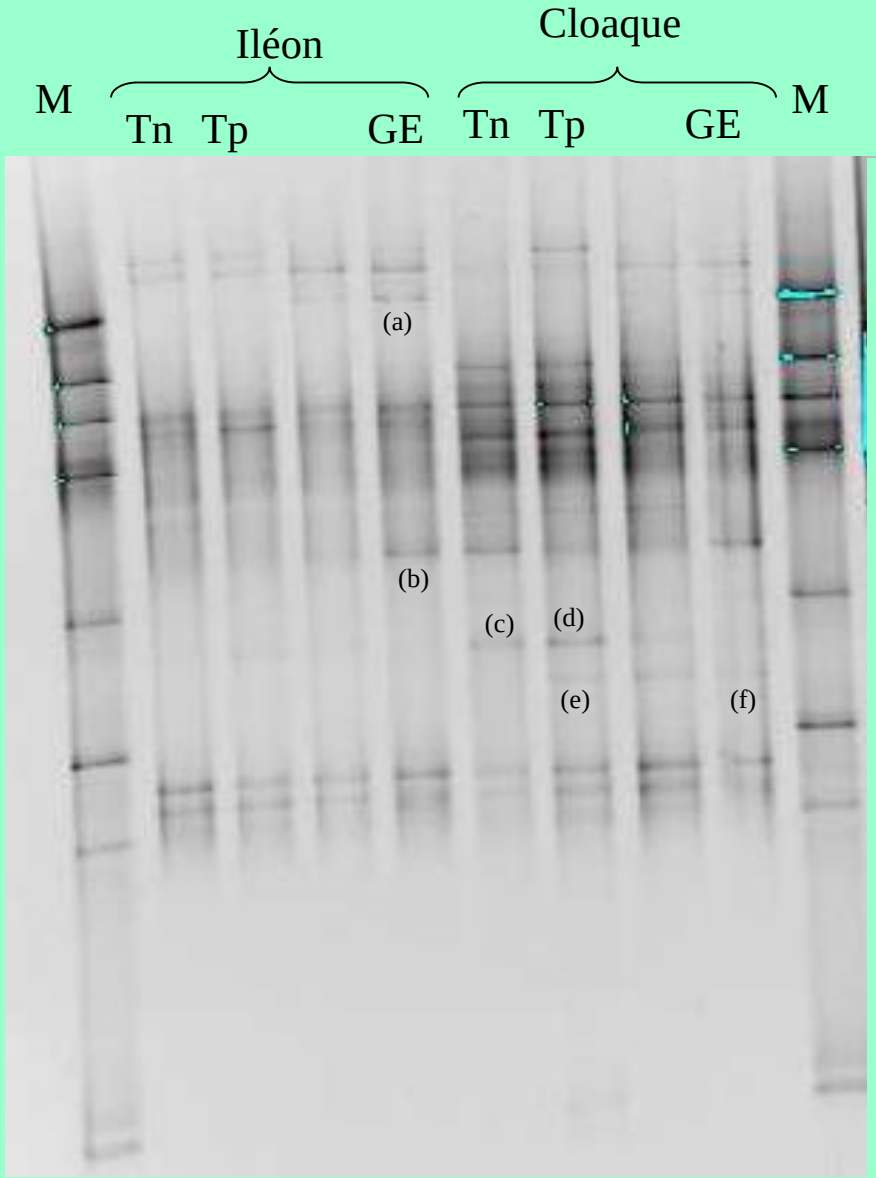
Hypothèse : Augmentation de l'activité du gésier (baisse du pH, amélioration de la digestion)

Augmentation de la vitesse de transit intestinal (Svihus et al, 2002)

2.4. Effet de l'alimentation

1. Mode de présentation Graines entières de céréales

Empreinte moléculaire (TTGE) (PoultryFlorgut 2005-2008) Poulets de 3 semaines (pool de 36 animaux)



Tn: témoin négatif
Tp : témoin positif (Avilamycine 10 ppm)
GE : Graines entières de blé (40%)

(a) Segmented filamentous bacterium (98%)
(b) *Lactobacillus salivarius* (99%)
(c,d) *Escherichia coli* (99%) (homologie 99%)
(e, f) Clone bactérien non cultivé, appartient à l'ordre des Clostridiales (98-99%)

2.4. Effet de l'alimentation

1. Mode de présentation Graines entières de céréales

Empreinte moléculaire (TTGE) (PoultryFlorgut 2005-2008)

Poulet (Broiler) : 3 semaines 6 Pools (6 animaux) / traitement

Coefficient de similarité (Pearson, %)

	Traitements alimentaires		SEM	Probabilité
	Contrôle négatif	Avilamycine		
Iléon	46	39	8.4	0.5202
Cloaque	34	47	7.7	0.2661
Caeca	92	94	0.7	0.0240
	Contrôle négatif	Blé entier		
Iléon	43	62	6.1	0.0382
Cloaque	44	59	4.9	0.0405
Caeca	91	94	0.6	0.0033

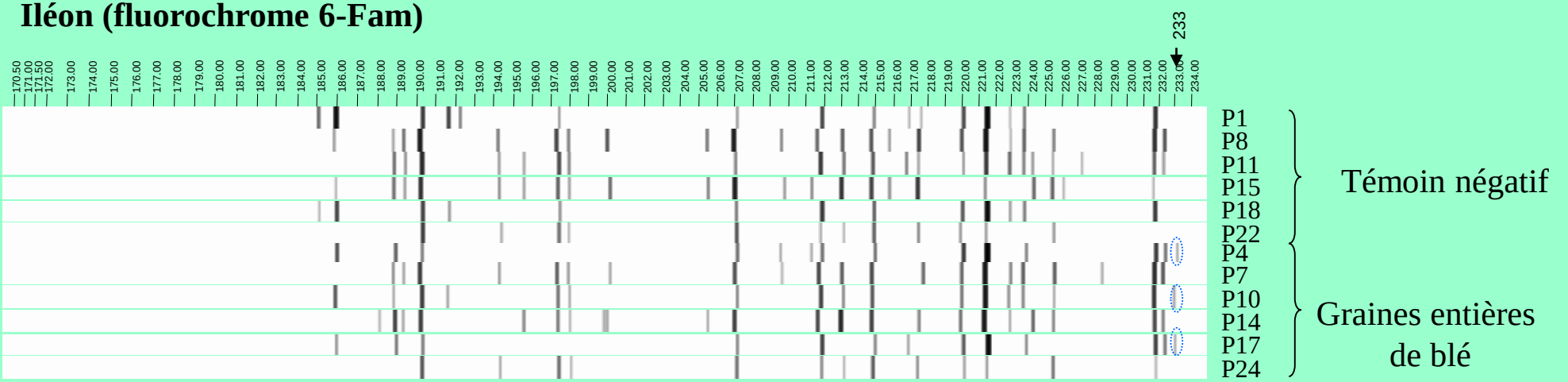
2.4. Effet de l'alimentation

1. Mode de présentation Graines entières de céréales

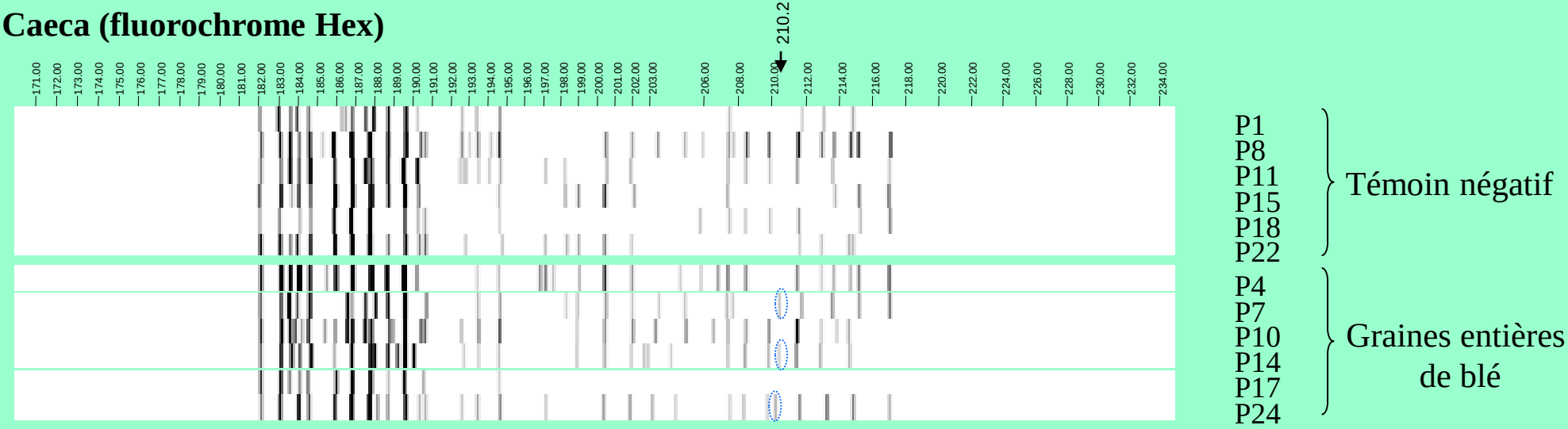
Empreinte moléculaire (CE-SSCP) (PoultryFlorgut 2005-2008)

Poulet de 3 semaines (pool de 6 animaux)

Iléon (fluorochrome 6-Fam)



Caeca (fluorochrome Hex)



2.4. Effet de l'alimentation

1. Mode de présentation Graines entières de céréales

Empreinte moléculaire (CE-SSCP, TTGE) (PoultryFlorgut 2005-2008)

Poulet (Broiler) : 3 semaines

Iléon : - Augmentation de similarité entre les flores (TTGE)
- Détection d'une bactérie filamenteuse segmentée (TTGE)
- Détection d'un *Lactobacillus salivarius* (TTGE)
- Détection d'une espèce bactérienne supplémentaire (CE-SSCP)

Cloaque : - Augmentation de similarité entre les flores (TTGE)
- Détection d'une espèce bactérienne supplémentaire (TTGE)
- Absence de détection d'un *E. coli* (TTGE)

Caeca : - Augmentation de similarité entre les flores (TTGE)
- Détection d'une espèce bactérienne supplémentaire (CE-SSCP)

2.4. Effet de l'alimentation

1. Mode de présentation Granulation

Approches conventionnelles

Comptage microbien (Engberg et al, 2002)

⇗ Coliformes, entérocoques (iléon)
⇘ *C. perfringens*, lactobacilles (caeca, rectum)

Fermentation microbienne (Concentration en AGV)

⇗ Dans les caeca

2.4. Effet de l'alimentation

2. Glucides Types de céréales

Approches conventionnelles

Seigle : ⇗ Populations anaérobies (iléon) (Wagner et Thomas, 1978)

⇗ Population aérobies adhérant à l'iléon, mais ⇘ dans les contenus (Untawale et al, 1978)

⇗ Contamination par *C. perfringens* (Craven, 2000)

Seigle / blé (iléon, Apajalahti et al, 2004) :

⇗ Streptocoques et entérocoques, *E. coli*

⇘ Lactobacilles

Blé et orge : ⇗ Populations anaérobies facultatives dont lactobacilles et coliformes (Mathlouti et al, 2002)

2.4. Effet de l'alimentation

2. Glucides Types de céréales

Clonage, séquençage d'ADNr 16 S (Apajalahti, 2004)

(contenus caecaux)

Groupe phylogénétique (%)	Maïs	Sorgho	Orge	Avoine	Seigle
Bifidobacterium	-	-			
Enterococcus	+	+			
Lactobacillus			+		
Escherichia				+	
Lactococcus				+	
Streptococcus					+
Inconnus					-

2.4. Effet de l'alimentation

2. Glucides Fibres : sources et quantité

Empreinte moléculaire (DGGE) (Denayrolles et al, 2007)

Poulet (21 j)

Modification de la flore principalement dans l'iléon

Régimes moins riches en fibres (3.1-4.7% au lieu de 5.4-5.7%)

Plus de *Lactobacillus reuteri, L. mucosae, L. antri*

Un des régimes riche en fibre (5.4% au lieu de 3.1-4.7%)

Présence de *C. perfringens*

Légère modifications dans les caeca

2.4. Effet de l'alimentation

2. Glucides Polysaccharides non amylacés hydrosolubles

Pectine hautement méthylée (Langhout et al, 1999)

⇗ Dans l'intestin grêle Coliformes
Clostridies
Entérocoques
Bacteroidaceae

Gomme de guar (Dahiya et al, 2004)

⇗ *C. perfringens* (caeca)
⇗ Anaérobes(caeca)

Limitation de la digestion, ralentissement du transit

⟶ Favorise les fermentations microbiennes

2.4. Effet de l'alimentation

2. Glucides Amidon

Approches conventionnelles

Sources **d'amidon lentement digestible** (maïs waxy, pois, sorgho)
(≠ sources d'amidon rapidement digéré : tapioca, maïs classique)

↘ *C. perfringens* (caeca) (Weurding, 2002)

2.4. Effet de l'alimentation

2. Glucides Fructo-oligosaccharides (FOS)

Approches conventionnelles

Bactéries commensales

⇗ Populations anaérobies (Caeca) (Xu et al, 2003)
⇗ Bifidobactéries (Caeca) (Xu et al, 2003)
⇗ Lactobacilles (Intestin grêle; Caeca) (Xu et al, 2003)

⇘ Coliformes (Intestin grêle; Caeca) (Xu et al, 2003)
⇘ Clostridies (Zhan et al, 2003)

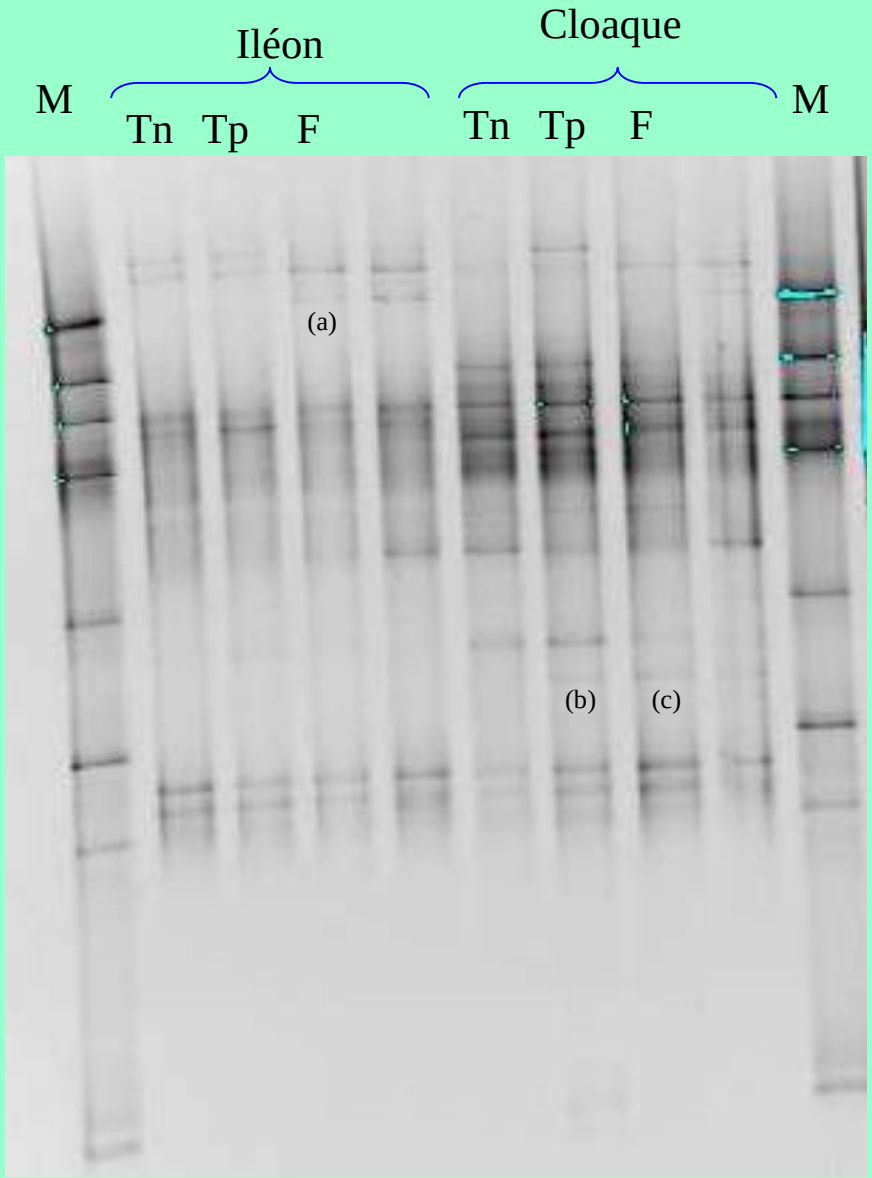
Bactéries pathogènes

⇘ Salmonelles (Bailey et al, 1991 , Yusrizal et Chen, 2003)
⇘ Campylobactères (Yusrizal et Chen, 2003)

2.4. Effet de l'alimentation

2. Glucides Fructo-oligosaccharides (FOS)

Empreinte moléculaire (TTGE) (PoultryFlorgut 2005-2008)



Poulets de 3 semaines (Pool de 36 animaux)

Tn: témoin négatif
Tp : témoin positif (Avilamycine 10 ppm)
F : FOS à courte chaîne (0.06%)

(a) Bactérie filamenteuse segmentée (98%)
(b,c) Clone bactérien non cultivé, appartient à l'ordre des Clostridiales (98%)

2.4. Effet de l'alimentation

2. Glucides Fructo-oligosaccharides (FOS)

Empreinte moléculaire (TTGE) (PoultryFlorgut 2005-2008)

Poulet (Broiler) : 3 semaines 6 Pools (6 animaux) / traitement

Coefficient de similarité (Pearson, %)

	Traitements alimentaires		SEM	Probabilité
	Contrôle négatif	Avilamycine		
Iléon	46	39	8.4	0.5202
Cloaque	34	47	7.7	0.2661
Caeca	92	94	0.7	0.0240
	Contrôle négatif	FOS		
Iléon	45	67	7.0	0.0304
Cloaque	47	52	6.0	0.5171
Caeca	93	98	0.5	<0.0001

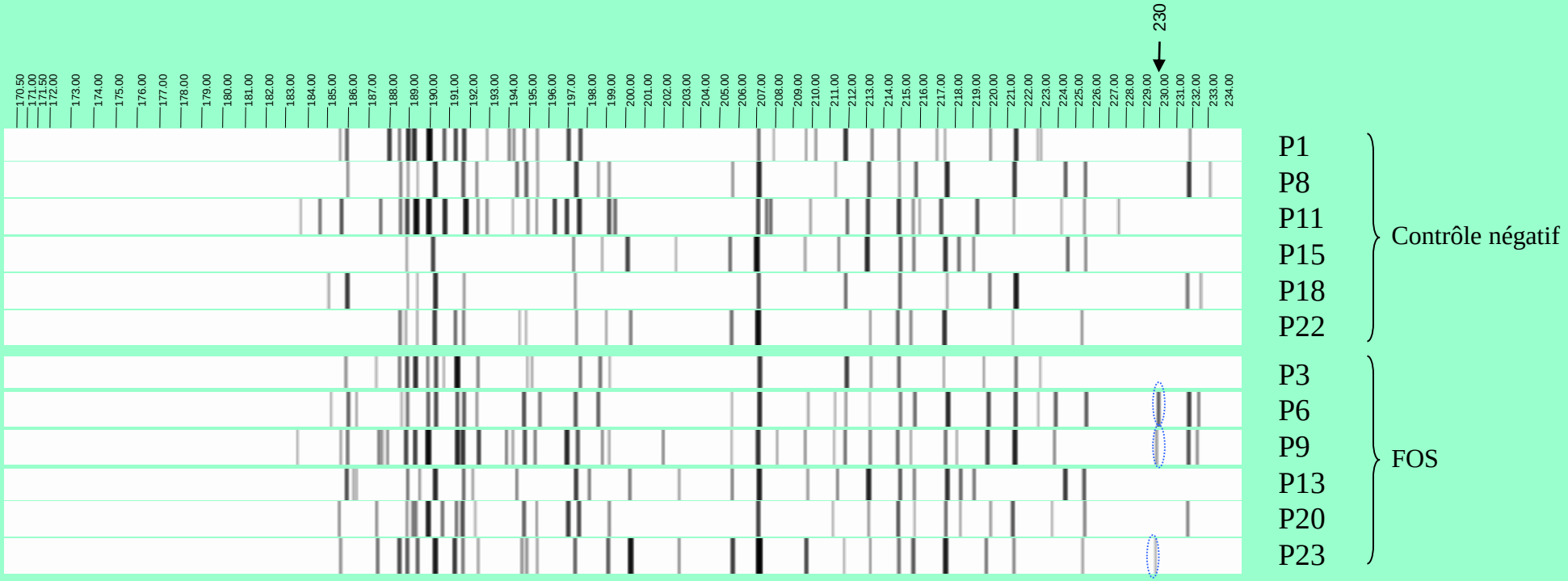
2.4. Effet de l'alimentation

2. Glucides Fructo-oligosaccharides (FOS)

Empreinte moléculaire (CE-SSCP) (PoultryFlorgut 2005-2008)

Poulet (Broiler) : 3 semaines 6 Pools (6 animaux) / traitement

Cloaque (fluorochrome 6-Fam)



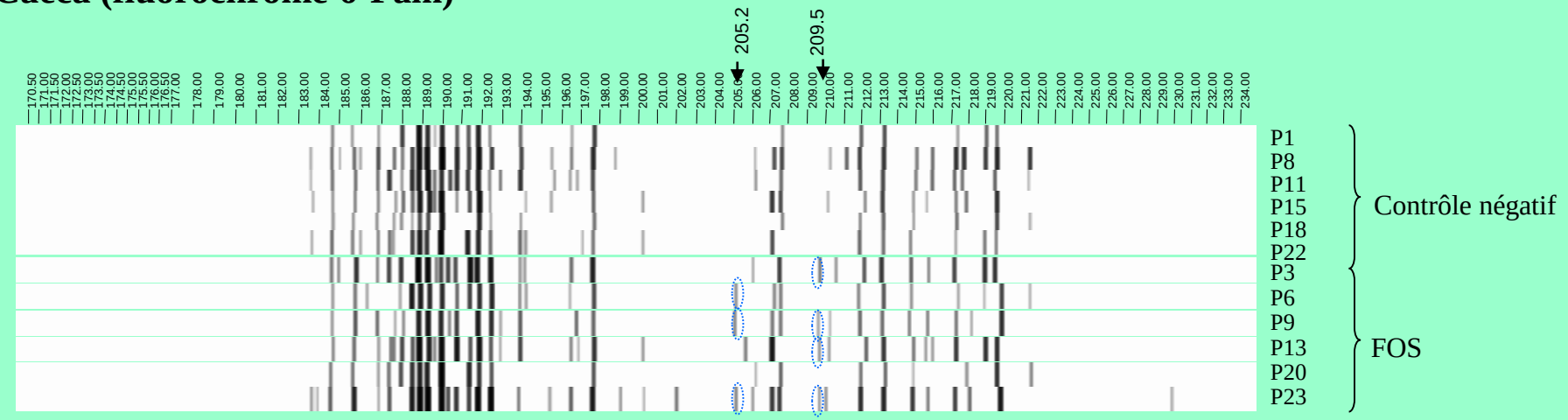
2.4. Effet de l'alimentation

2. Glucides Fructo-oligosaccharides (FOS)

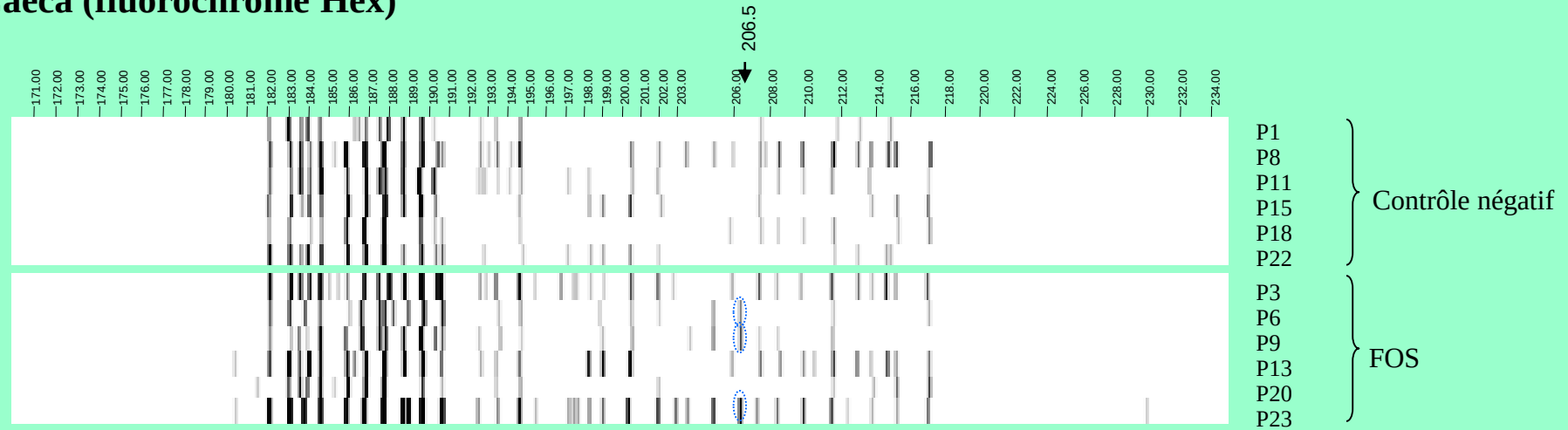
Empreinte moléculaire (CE-SSCP) (PoultryFlorgut 2005-2008)

Poulet (Broiler) : 3 semaines 6 Pools (6 animaux) / traitement

Caeca (fluorochrome 6-Fam)



Caeca (fluorochrome Hex)



2.4. Effet de l'alimentation

2. Glucides Fructo-oligosaccharides (FOS)

Empreinte moléculaire (CE-SSCP, TTGE) (PoultryFlorgut 2005-2008)

Iléon : - Augmentation de similarité entre les flores (TTGE)
- Détection d'une bactérie filamenteuse segmentée (TTGE)

Cloaque : - Détection d'une espèce bactérienne supplémentaire (TTGE)
- Détection d'une espèce bactérienne supplémentaire (CE-SSCP)

Caeca : - Augmentation de similarité entre les flores (TTGE)
- Détection de 3 espèces bactériennes supplémentaires (CE-SSCP)

2.4. Effet de l'alimentation

2. Glucides Fructo-oligosaccharides (FOS)

Empreinte moléculaire (DGGE) (Massias et al, 2007)

Dinde de 4 et 7 semaines

Modification d'intensité de bandes en présence de FOS ⟶ Modulation de la microflore

Lactobacilles : augmentation ou diminution d'intensité (iléon, 4 et 7 sem)

Clostridies : augmentation d'intensité (caeca, 4 et 7 sem)

Bifidobactéries : diminution d'intensité (caeca, 4 sem)

2.4. Effet de l'alimentation

3. Lipides

Approches conventionnelles

Graisses oxydées (Dahiya et al, 2006)

⇗ Coliformes

⇘ Lactobacilles

Graisses végétales (par rapport à graisses animales)

Régime à base de seigle (bactéries adhérentes à l'épithélium intestinal; Danicke et al, 1999)

⇗ Entérobactéries

⇘ Coques à Gram positif, Entérocoques

Régime blé / soja (contenu de l'iléon; Knarreborg et al, 2002)

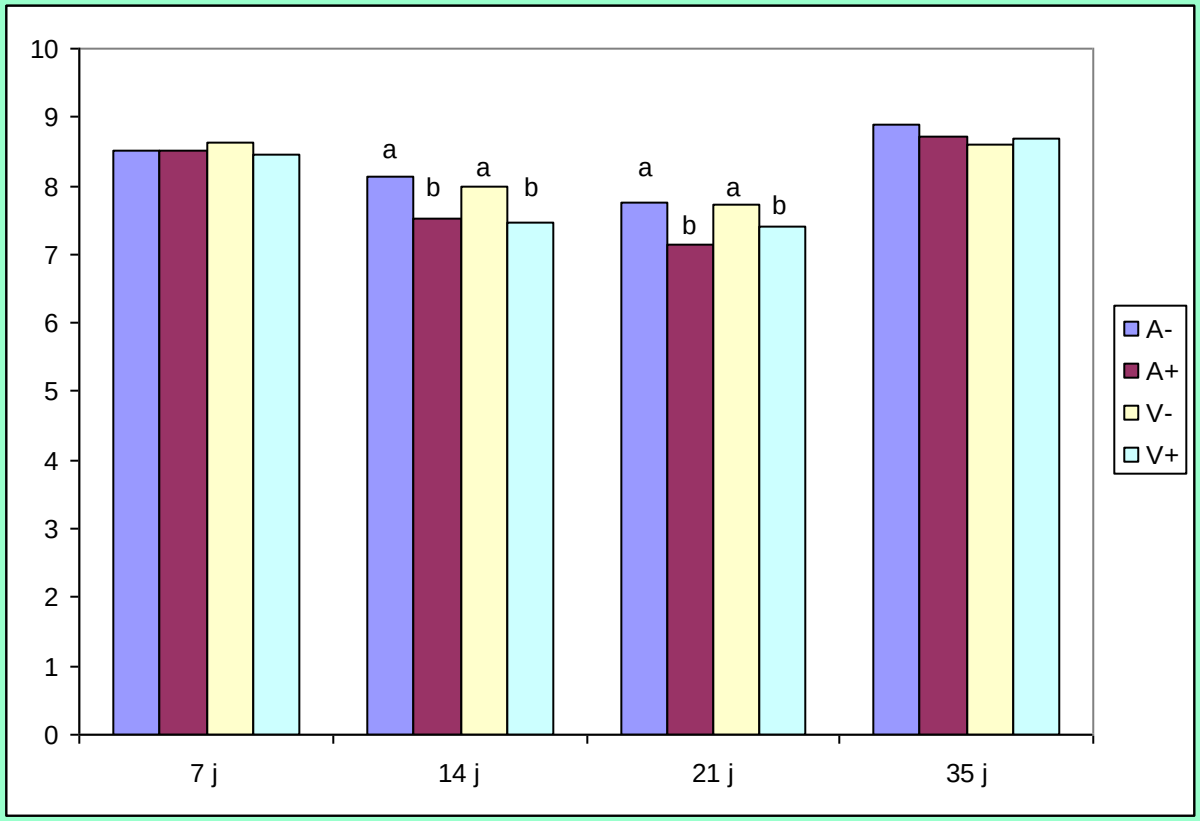
⇘ *C. perfringens*

2.4. Effet de l'alimentation

3. Lipides

Comptage microbien de lactobacilles (Knarreborg et al, 2002)

Contenu iléal



Matière grasse

A: animale

V: végétale

Antibiotique

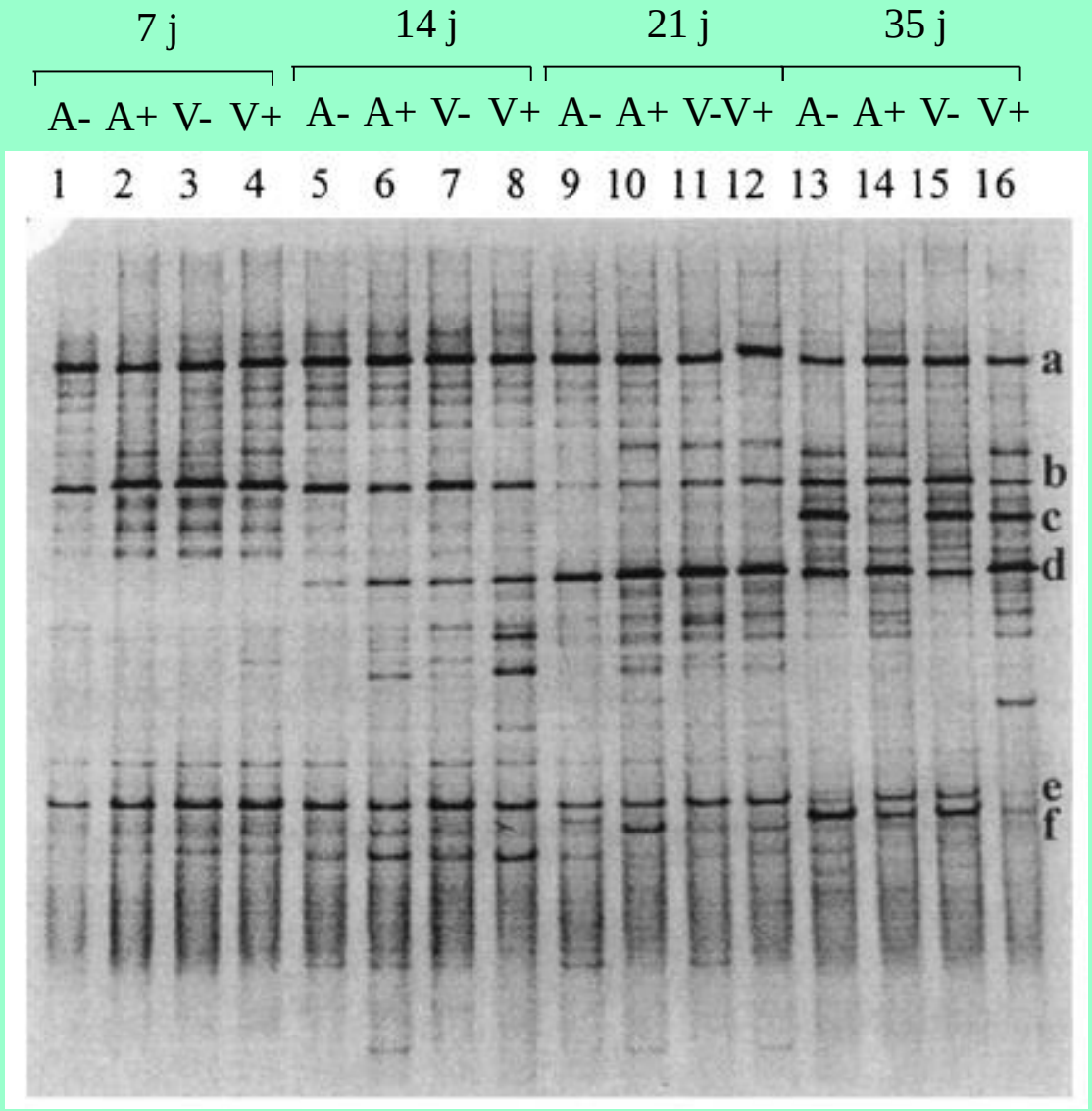
- : sans

+ : avec

2.4. Effet de l'alimentation

3. Lipides

Empreinte moléculaire (DGGE, amorce Bacteria) (Knarreborg et al, 2002)



Contenu iléal

Matière grasse
A: animale
V: végétale

Antibiotique
- : sans
+ : avec

L. johnsonii

L. crispatus

L. salivarius

Streptococcus

L. reuteri

C. perfringens

2.4. Effet de l'alimentation

4. Protéines : teneur et source

Ou

Teneur élevée en protéines (24 à 25% au lieu de 18 à 19%)

Farine de poisson

⟶ ⇗ Concentration ATP (iléon, Jansman et al, 2003)

Et

Régime riche en protéines (40% au lieu de 23%)

Protéines animales (farine de poisson au lieu de protéines de soja)

⟶ ⇗ *C. perfringens* (iléon, caeca) (Drew et al, 2004)

Hydrolyse des protéines alimentaires par les protéases endogènes

⟶ Petits peptides à activité antibactérienne (Pierzynowski et al, 2006)

2.4. Effet de l'alimentation

5. Minéraux et vitamines

⇗ Minéraux et vitamines (1% au lieu de 0.5%)

⟶ ⇗ Bifidobactéries (caeca) (Orban et al, 1997)

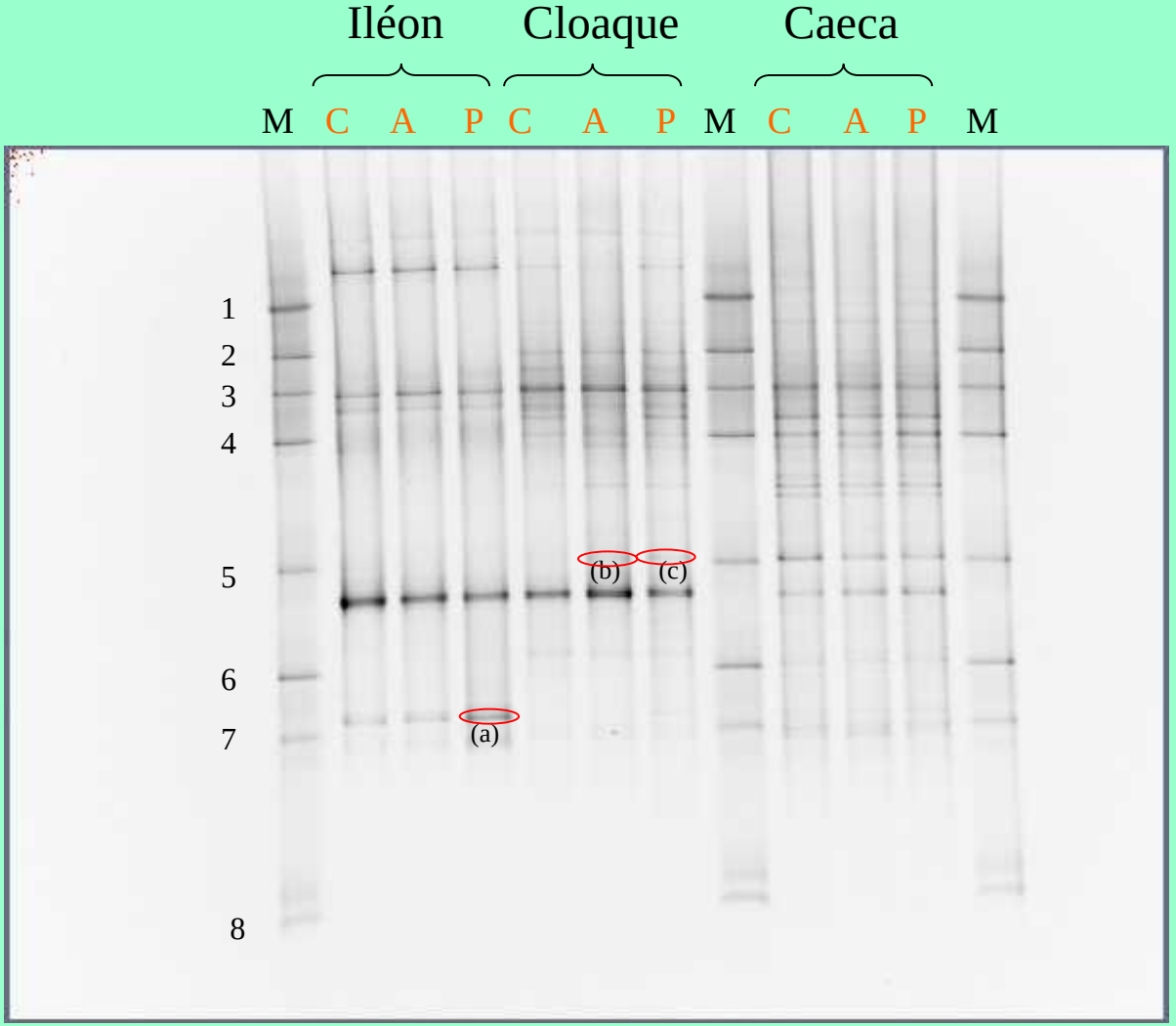
Cu + montmorillonite

⟶ ⇘ Clostridies et coliformes (intestin, caeca) (Xia et al, 2004)

2.4. Effet de l'alimentation

6. Probiotique

Empreinte moléculaire (TTGE) (PoultryFlorgut 2005-2008) Poulets de 26 j (Pool de 30 animaux)



C : Contrôle négatif
A : Avilamycine (10 ppm)
P : Probiotique

(a) *Lactobacillus johnsonii* (100%)
(b,c) Bactérie non cultivée, appartenant à l'ordre des Clostriales

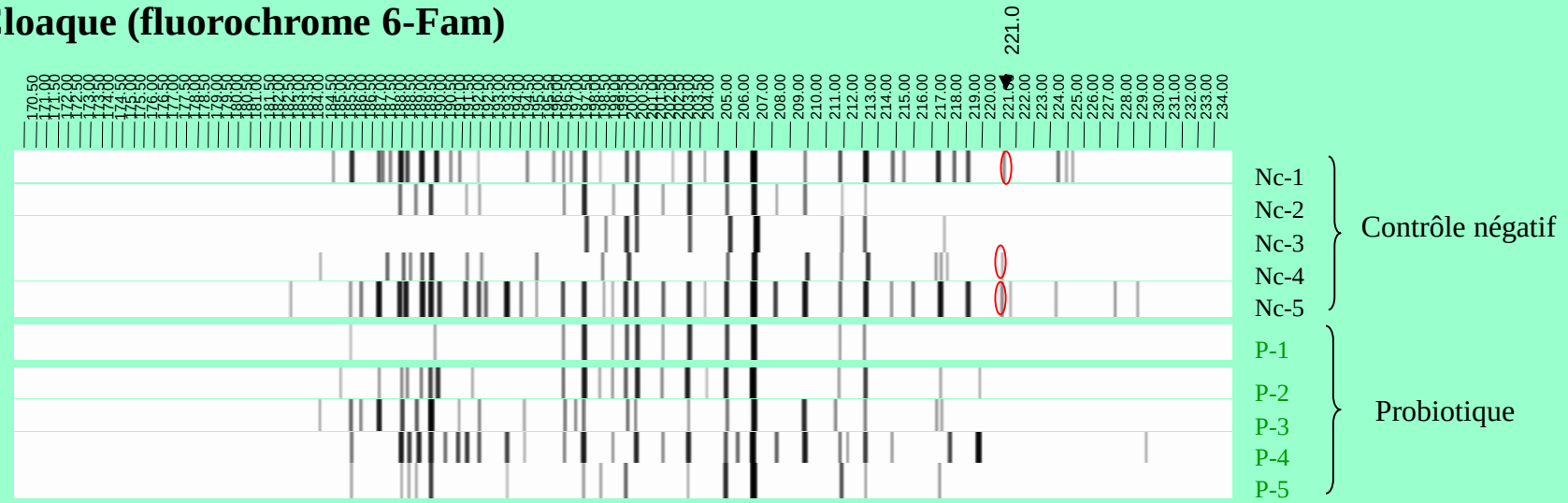
2.4. Effet de l'alimentation

6. Probiotique

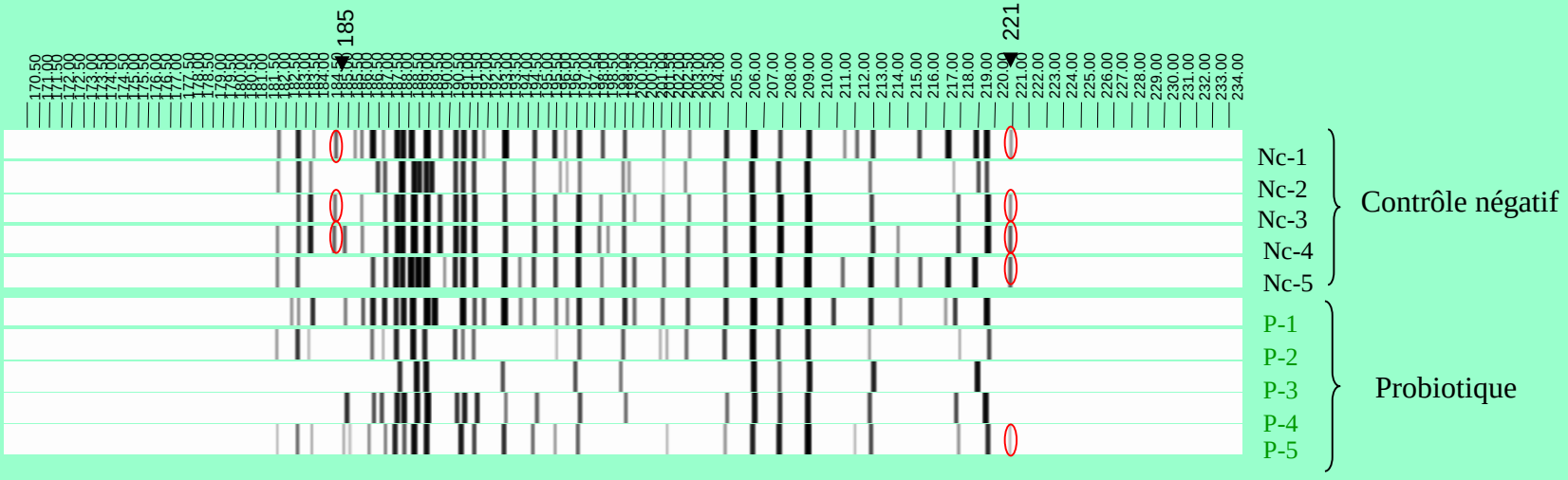
Empreinte moléculaire (CE-SSCP) (PoultryFlorgut 2005-2008)

Poulet de 26 j (5 pools de 6 animaux / traitement)

Cloaque (fluorochrome 6-Fam)



Caeca (fluorochrome 6-Fam)



2.4. Effet de l'alimentation

6. Probiotique

Empreinte moléculaire (CE-SSCP, TTGE) (PoultryFlorgut 2005-2008)

Iléon : - Augmentation de la présence de *Lactobacillus johnsonii* (TTGE , Amorce universelle)
- Détection d'une espèce bactérienne supplémentaire (CE-SSCP, Amorce universelle)

Cloaque : - Détection d'une espèce bactérienne supplémentaire (TTGE , Amorce universelle)
- Disparition d'une espèce bactérienne (CE-SSCP, Amorce universelle)
- Détection d'une espèce bactérienne supplémentaire (CE-SSCP, Amorce bactéries lactiques)

Caeca : - Disparition de 2 espèces bactériennes (CE-SSCP, Amorce universelle)
- Détection de 2 espèces bactériennes supplémentaires (CE-SSCP, Amorce bactéries lactiques)

Fientes au sol : - Détection de une espèce bactérienne supplémentaire (CE-SSCP, Amorce universelle)
- Détection d'une espèce bactérienne supplémentaire (CE-SSCP, Amorce bactéries lactiques)

2.4. Effet de l'alimentation

Variabilité de réponse

- Conditions de milieu (environnement)

Réponse plus importante en conditions dégradées (Orban et al, 1997; Postollec et al, 2007)

- Composition du régime

Présence de polysaccharides non amylacés hydrosolubles

Présence d'oligosaccharides dans les MP

Farine de soja : 4-6 % MS d'oligosaccharides (Karr-Lilienthal et al, 2005)
Blé : 0.136 % MS d'oligofructose (Flickinger et Fahey, 2002)

2.5. Effet du type d'élevage

Elevage conventionnel ou 'organique'/ Clonage, séquençage (Bjerrum et al, 2006)

Groupe phylogénétique (%)	Conventionnel [A]		Organique [B]	
	Iléon[1]	Caeca[2]	Iléon[3]	Caeca[4]
Proteobactéries		3.5		
Groupe *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides*		4.4		
Mycoplasma et apparentés		1.8		3.3
Streptocoques	3.5	0.9		
Enterocoques	0.7	1.3		
Lactobacilles	**93.8**	5.3	100	7.8
Staphylocoques	0.7			
Eubacterium et apparentés		15.5		35.6
Sporomusa et apparentés	1.4	4.9		
Clostridium et apparentés		62.4		53.3

[1] 144 clones, [2] 226 clones, [3] 97 clones, [4] 90 clones

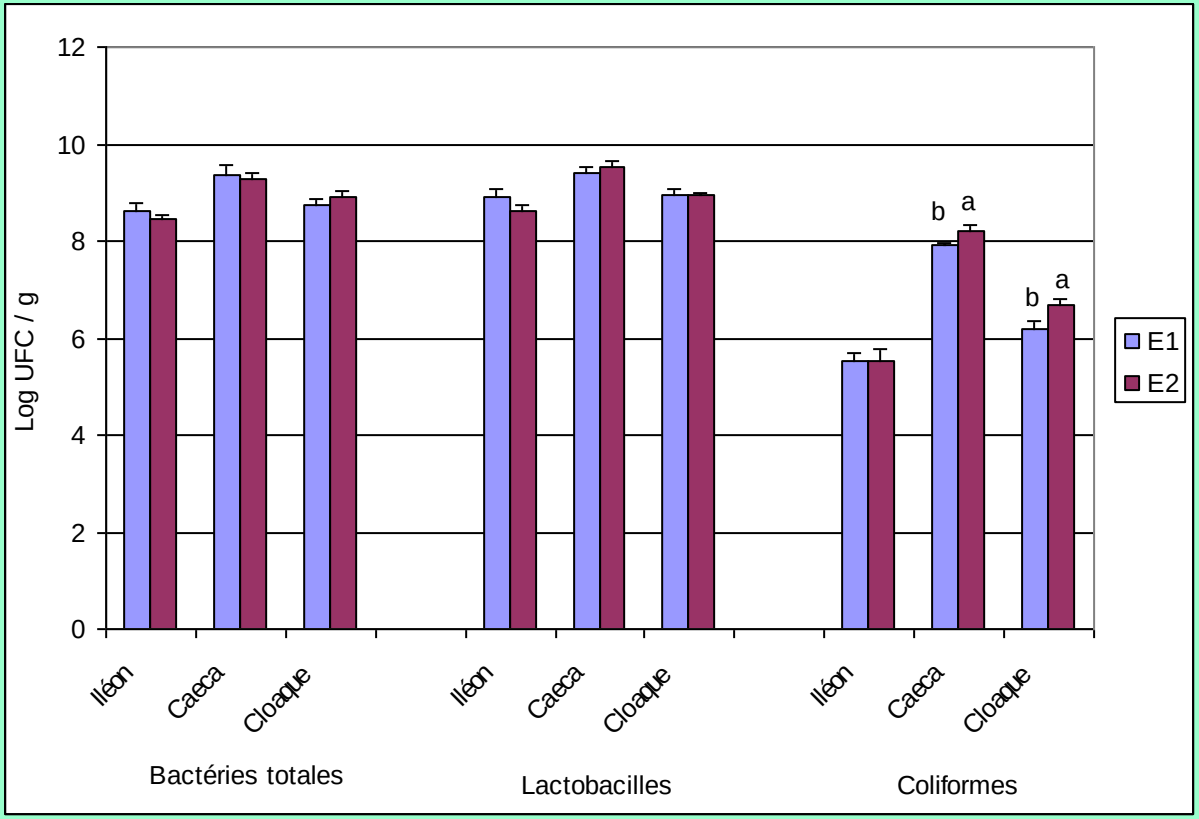
[A] Ross 208, 40 j, aliment (enzymes, salinomycine), élevage conventionnel

[B] Scan Labelle 657, 41 j, aliment (90% 'bio', sans acide aminé synthétique, enzyme ou anticoccidien), élevage organique (densité faible, parcours extérieur)

2.5. Effet du type d'élevage

Elevages (E1, E2) conduits de façon similaire (animaux, aliment)

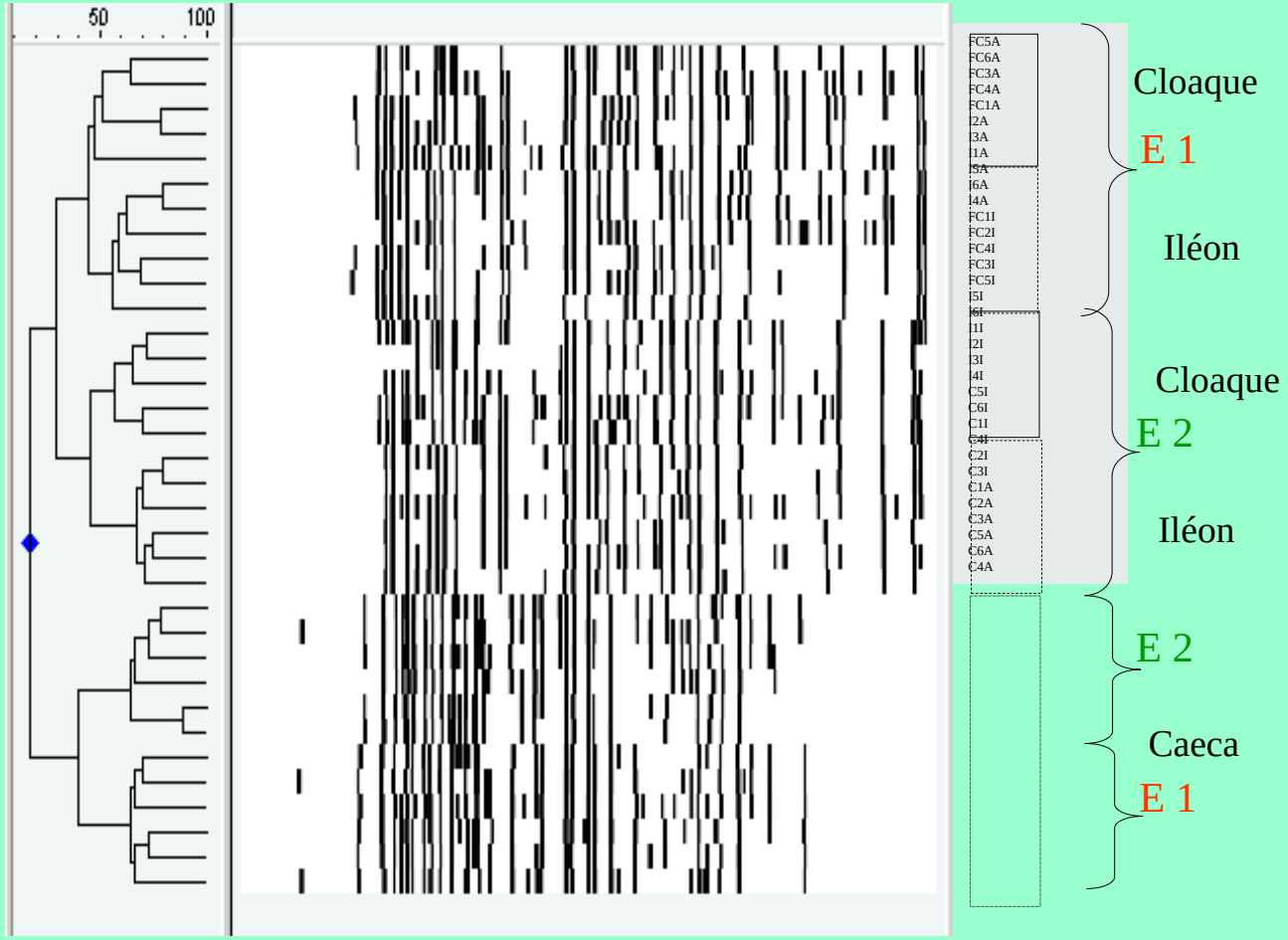
Comptage en milieu aérobie (Poultryflorgut 2005-2008)



2.5. Effet du type d'élevage

Deux élevages (E1, E2) conduits de façon similaire (animaux, aliment)

Profil CE-SSCP (Poultryflorgut 2005-2008)
Contenu de l'iléon (--), des caeca (…) et du cloaque (_)



2.6. Effet de la présence de pathogènes

Campylobacter jejuni / Flore caecale (2 j) / Profils électrophorétiques (DGGE)
(Johansen et al, 2006)

Dendrogramme

⟶ Regroupement des animaux ‘contrôle’ / animaux infectés

Observation des pistes

⟶ 2 bandes présentes chez les animaux ‘contrôle’

Absente chez les animaux infectés

Lactobacillus reuteri

Non identifiée

La microflore digestive des volailles

CONCLUSIONS

Flore intestinale

⟶ Nombreuses conséquences sur l'animal (Effets négatifs / Positifs)

⟶ Nombreux facteurs de variation

⇨ Equilibre complexe et difficile à maîtriser

Antibiotiques ~~facteurs~~ de croissance (janv. 2006)

⟶ Augmentation de l'importance du rôle de la flore digestive

⟶ **Améliorer sa connaissance**

Approches conventionnelles ⟶ Approches moléculaires

⟶ **Alternatives** aux antibiotiques facteurs de croissance

Gabriel, I., Mallet, S., Sibille, P., 2005. La microflore digestive des volailles : facteurs de variation et conséquences pour l'animal. INRA Productions Animales 18, 309-322.