

## Écologie microbienne du tube digestif et modes d'action des probiotiques en nutrition animale

Robert Ducluzeau, Pierre Raibaud

**D**e leur naissance à leur mort, tous les animaux, ainsi que l'homme, vivent en équilibre avec une flore microbienne extrêmement dense et variée qu'ils abritent, pour l'essentiel, dans les cavités de leur tube digestif. Cette flore microbienne forme avec l'hôte qui l'héberge un écosystème dont l'équilibre est réglé par la nature des interactions entre les différents composants que l'on y trouve. Ce sont, d'une part, des composants biotiques : microbes établis à demeure ou en transit, cellules du tractus gastro-intestinal qui délimitent le biotope, et, d'autre part, des composants abiotiques : aliments et, en particulier, résidus ayant résisté à la digestion durant leur passage dans l'intestin grêle, composés endogènes provenant de la salive, des sécrétions et excréments gastrique, pancréatique, hépatique, intestinale, cellules résultant du renouvellement de la muqueuse. Tous ces composants biotiques et abiotiques interagissent entre eux pour aboutir, à un instant donné et entre les diverses populations microbiennes et l'hôte, à un équilibre dont les mécanismes très complexes sont actuellement bien loin d'avoir été élucidés.

On sait maintenant que la flore microbienne du tube digestif influence considérablement la santé de l'hôte. En parti-

culier, les bactéries normalement présentes dans le tube digestif s'opposent à l'installation de bactéries exogènes pouvant pénétrer dans l'écosystème. Cette fonction est particulièrement importante si les bactéries ingérées portent des caractères de pathogénicité. Quant aux nombreuses molécules résultant du métabolisme des bactéries du tube digestif, elles peuvent avoir des rôles positifs et favoriser la croissance de l'hôte ou, au contraire, des rôles négatifs comme c'est le cas pour les toxines.

Depuis très longtemps, les zootechniciens ont essayé de modifier l'équilibre de la flore du tube digestif par des moyens empiriques, en espérant favoriser les populations microbiennes les plus utiles pour l'hôte. L'utilisation d'antibiotiques à très petites doses dans l'alimentation du bétail est la pratique la plus répandue pour atteindre ce but supposé. Mais les dangers potentiels liés à l'apparition de résidus d'antibiotiques ou de bactéries résistantes dans les produits alimentaires ont amené les éleveurs à rechercher des solutions de remplacement à l'utilisation des antibiotiques. C'est ainsi qu'on a vu apparaître sur le marché les « probiotiques », préparations à base de bactéries vivantes qui sont données comme additifs alimentaires afin d'améliorer les performances zootechniques et la santé des animaux d'élevage.

Une courte synthèse des connaissances concernant l'équilibre de la flore du tube digestif des animaux monogastriques et des bases scientifiques de l'utilisation des probiotiques est présentée ici. La flore du rumen a été volontairement écartée du

champ de cette synthèse car, par sa spécificité et son importance dans la physiologie nutritionnelle de l'hôte, elle nécessiterait à elle seule une autre mise au point.

### Les caractéristiques et le rôle de l'écosystème bactérien du tube digestif

Tous les animaux homéothermes et la plupart des poïlothermes hébergent dans leur tractus intestinal une énorme masse de microbes vivants, essentiellement des bactéries. À l'état d'équilibre, c'est-à-dire chez l'adulte sevré, la flore bactérienne des parties distales du tube digestif dépasse  $5 \times 10^{10}$  cellules viables par gramme de contenu frais. Plus de cent quatre-vingt-dix espèces ont été isolées de la flore humaine [1]. La plupart des bactéries dominantes appartiennent à la catégorie des bactéries anaérobies strictes, incapables de se multiplier en présence d'air. Certaines de ces espèces n'ont toujours pas pu être cultivées aujourd'hui. Malgré quelques variations individuelles, les genres bactériens de la flore restent remarquablement stables au sein d'une même espèce animale. Chez un hôte en bonne santé, une dizaine d'espèces, toujours les mêmes chez un individu, mais différentes de celles d'un autre, cohabitent au plus haut niveau de

R. Ducluzeau, P. Raibaud : Laboratoire d'écologie et de physiologie du système digestif, Inra, 78350 Jouy-en-Josas, France.

Tirés à part : R. Ducluzeau

population. Les autres espèces qui constituent la flore sous-dominante sont présentes en nombre moins élevé.

Chez certains animaux d'élevage, comme les porcs ou les veaux, l'estomac contient également une population bactérienne élevée : de  $5 \times 10^8$  à  $5 \times 10^9$  bactéries viables par gramme de contenu frais, la plupart d'entre elles étant anaérobies facultatives, c'est-à-dire capables de se multiplier en présence d'air. Certaines d'entre elles adhèrent à l'épithélium stomacal. Le jabot des volailles et le rumen contiennent également un grand nombre de bactéries, respectivement  $10^9$  et  $10^{11}$  par gramme. Au contraire, l'intestin grêle n'est pas un organe où les bactéries peuvent se multiplier chez un sujet sain, à cause de la vitesse de transit du bol alimentaire. Lorsque les bactéries y prolifèrent, il s'agit toujours d'un phénomène pathologique très nuisible pour l'hôte [2].

La colonisation microbienne du tube digestif est un processus complexe qui commence quelques heures après la naissance et comprend différentes étapes. Il dépend de multiples facteurs dont l'un des principaux est le régime alimentaire. Ainsi, une des étapes les plus délicates de ce processus est le moment du sevrage, lorsque l'alimentation cesse d'être exclusivement lactée. On voit alors apparaître des modifications considérables dans l'équilibre de la flore, et c'est en particulier le moment où les espèces anaérobies strictes deviennent prédominantes chez la plupart des mammifères. Nos connaissances concernant cette colonisation séquentielle et ses mécanismes d'établissement sont actuellement encore très pauvres [3].

L'utilisation d'animaux axéniques (*germ free*) et d'animaux gnotoxéniques (animaux axéniques inoculés avec des souches bactériennes connues) a permis de réaliser des progrès considérables dans l'étude des fonctions exercées par la flore du tube digestif (photo 1). La comparaison entre animaux axéniques et animaux holoxéniques (associés à leur flore complexe) met en évidence le rôle de la flore. La comparaison entre animaux gnotoxéniques, axéniques et holoxéniques permet de souligner le rôle spécifique des souches bactériennes associées aux animaux gnotoxéniques. L'utilisation d'animaux gnotoxéniques permet également d'étudier les activités des enzymes bactériennes dans diverses conditions d'environnement. En effet, on constate que l'expression des gènes bactériens peut



**Photo 1.** Utilisation de porcelets gnotoxéniques élevés en isolateur pour l'étude *in vivo* des interactions microbiennes dans le tube digestif.

**Photo 1.** Use of gnotoxenic piglets reared in isolators for *in vivo* study of microbial interaction in the digestive tract.

être très différente *in vitro*, dans un tube de culture et *in vivo*, dans le tractus digestif [4]. Ainsi, on a montré que des souches d'entérobactéries, extrêmement actives pour dégrader l'urée *in vitro*, sont dépourvues de cette activité dans le tube digestif de souris gnotoxéniques associées à ces souches.

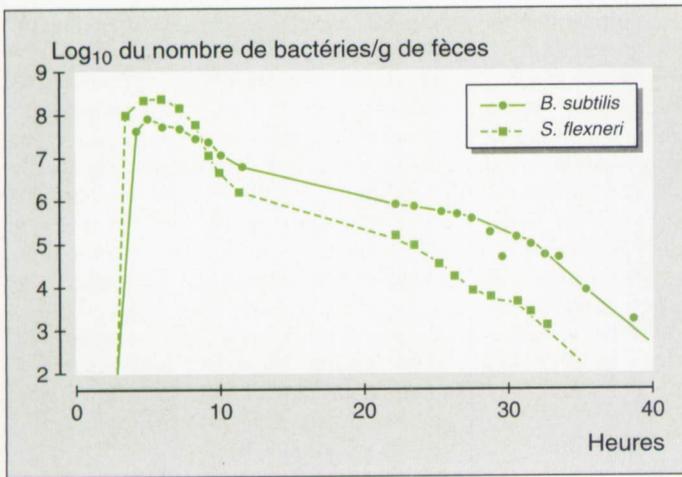
Les principales fonctions de la flore du tube digestif peuvent être résumées de la façon suivante : les populations microbiennes produisent un grand nombre de métabolites, principalement dans le gros intestin, à partir du matériel endogène et de la fraction indigestible de l'aliment. Beaucoup de ces métabolites sont absorbés par le gros intestin. Ils sont alors capables de modifier profondément l'anatomie du tube digestif aussi bien que divers paramètres physiologiques importants en nutrition comme le temps de transit dans l'intestin grêle et le temps de renouvellement des entérocytes de la muqueuse digestive. Le système immunitaire local associé à la muqueuse digestive ainsi que le système immunitaire systémique sont fortement stimulés, ou parfois inhibés, par certaines des bactéries de la flore du tube digestif. Les anta-

gonismes bactériens représentent une puissante barrière à l'égard des bactéries exogènes pénétrant dans l'écosystème [5]. Cette fonction, aussi appelée résistance à la colonisation [6], est probablement essentielle à la survie des individus car elle maintient un équilibre relativement stable, bien que fragile, dans la microflore du tube digestif.

## Interactions bactériennes dans le tube digestif

Lorsqu'on ensemence deux souches bactériennes ensemble ou successivement dans le tube digestif d'un animal axénique, deux cas sont possibles. Ou bien les deux bactéries se développent ensemble aussi bien que lorsqu'elles se trouvent seules et l'équilibre qui s'établit ainsi est généralement stable, ou bien une interaction apparaît entre les deux bactéries inoculées : l'une des bactéries l'emporte sur l'autre et, éventuellement, l'élimine totalement, quel que soit l'ordre d'inoculation. Ces simples observations permettent de faire table rase de la vieille théorie du premier occupant qui voulait que la première souche implantée occupe le terrain et, de ce simple fait, interdise la prolifération de n'importe quelle autre bactérie introduite ultérieurement.

Lorsqu'on ensemence plus de deux souches bactériennes chez un animal gnotoxénique, on peut constater une véritable réaction en chaîne, chaque modification d'équilibre entre deux souches pouvant entraîner un changement dans les populations des autres. L'observateur ne perçoit que le résultat de cet ensemble d'interactions que nous avons désigné par le terme de mécanisme intégré. Ces mécanismes atteignent un niveau de complexité maximum chez un hôte holoxénique, élevé depuis sa naissance dans un environnement microbien non contrôlé. Chez celui-ci en effet, on constate que les niveaux de population des différentes souches que l'on sait dénombrer sélectivement varient entre  $10^3$  et  $10^{11}$  par gramme. Si une souche dont le niveau de population est de  $10^3$  chez un hôte holoxénique s'établit à un niveau de  $10^9$  ou plus par gramme chez un hôte gnotoxénique nourri du même aliment que l'holoxénique, on peut en conclure que des interactions bacté-

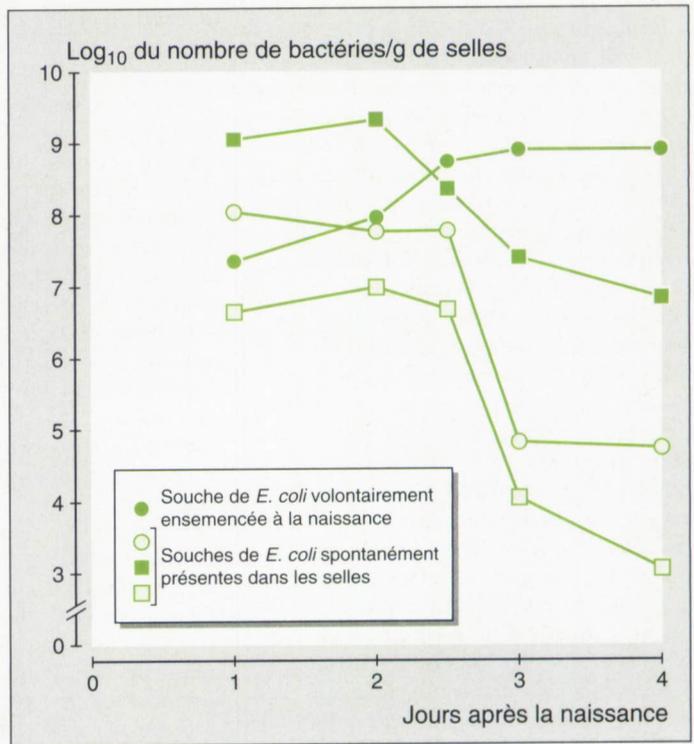


**Figure 1.** Mise en évidence d'un effet de barrière drastique. Transit comparé de spores de *Bacillus subtilis* (marqueur de transit inerte) et de *Shigella flexneri* dans le tube digestif de souris holoxéniques (d'après Ducluzeau *et al.* [5]). Un inoculum contenant environ le même nombre de cellules de *S. flexneri* et de spores de *B. subtilis* marqueur de transit ( $5 \times 10^8$  de chacun) est donné par gavage gastrique à des souris holoxéniques au temps 0. On dénombre ensuite les deux groupes de micro-organismes dans les fèces des animaux. La courbe d'élimination de la souche de *S. flexneri* est très proche de celle du marqueur de transit. Cela signifie que l'inoculum de *S. flexneri* est éliminé passivement par la flore de barrière, sans être détruit durant son passage mais sans se multiplier.

**Figure 1.** Demonstration of a drastic type of barrier effect. Comparative transit of *Bacillus subtilis* spores (inert transit marker) and *Shigella flexneri* in the digestive tract of holoxenic mice.

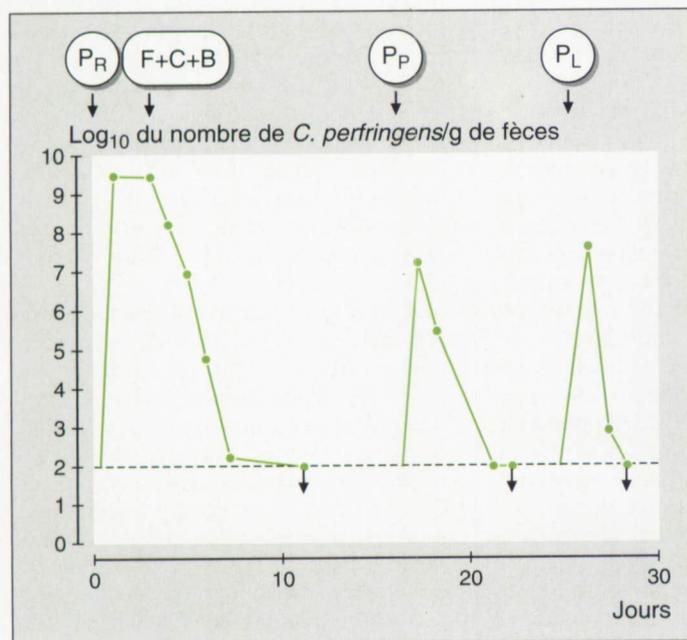
**Figure 2.** Effet de barrière intraspécifique entre souches d'*Escherichia coli* dans le tube digestif d'un nouveau-né humain (d'après Duval-Iflah *et al.* [8]). On constate que, dans les fèces du nouveau-né humain étudié ici, trois souches de *E. coli* présentant de multiples résistances aux antibiotiques étaient présentes dès la fin du premier jour de vie. La souche de *E. coli* dépourvue de plasmides, volontairement ensemencée dans le premier biberon, s'est implantée et a exercé un effet de barrière plus ou moins prononcé à l'égard des autres souches d'*E. coli* déjà présentes.

**Figure 2.** Intraspecific barrier effect between *E. coli* strains in the digestive tract of a newborn infant.



**Figure 3.** Exemple d'effet de barrière interspécifique dû à une association de bactéries connues. Barrière drastique exercée par l'association de *Fusobacterium* sp. (F), *Clostridium* sp. (C) et *Bacteroides* sp. (B) à l'égard de diverses souches de *Clostridium perfringens* isolées du rat ( $P_R$ ), du porc ( $P_P$ ) et du lièvre ( $P_L$ ) (d'après Yurdusev *et al.* [11]). Une souche de *C. perfringens* issue du rat est ensemencée chez des animaux axéniques au temps 0 (repère  $P_R$ ). Cette souche s'implante en 24 heures à un niveau élevé, mais est éliminée totalement par un mélange de trois souches anaérobies strictes appartenant à d'autres espèces que *C. perfringens* et inoculées au repère (F + C + B). Lorsque cette barrière est installée, on voit qu'elle est efficace pour éliminer deux autres inoculums de *C. perfringens* issus du porc ( $P_P$ ) et du lièvre ( $P_L$ ).

**Figure 3.** Example of an interspecific barrier effect of a known combination of bacteria. Drastic type of barrier formed by a combination of *Fusobacterium* sp. (F), *Clostridium* sp. (C) and *Bacteroides* sp. (B) against various strains of *Clostridium perfringens* isolated from the rat ( $P_R$ ), pig ( $P_P$ ) and hare ( $P_L$ ).



riennes sont responsables de la différence entre les niveaux de population. D'une façon générale, une souche introduite dans le tractus gastro-intestinal d'un hôte holoxénique ne s'y établit pas. Dans ce cas, on parle plus précisément d'effets de barrière microbiens ou de résistance à la colonisation.

L'établissement d'une souche bactérienne dans le tube digestif est défini comme la colonisation permanente après une administration unique de l'inoculum bactérien. Pour mettre en évidence l'établissement d'une souche ou, au contraire, son transit passif, on dispose d'une méthode microbiologique. Elle utilise un marqueur de transit constitué par des spores d'un *Bacillus* thermophile strict qui ne germent pas durant leur passage dans le tube digestif de l'hôte, mais qui résistent à tous les facteurs inhibiteurs qu'elles rencontrent sans perdre leur viabilité. On peut facilement les dénombrer sélectivement dans les fèces à leur température optimum de croissance (60 °C) à laquelle pratiquement aucune autre bactérie du tube digestif ne se multiplie. On associe à un inoculum de spores de *Bacillus* un nombre à peu près équivalent de cellules viables de la souche dont on veut étudier le devenir dans le tube digestif. Si la courbe d'élimination de la souche est parallèle à celle des spores de *Bacillus*, ce qui est le cas le plus général, on en déduit que cette souche ne fait que transiter passivement comme le marqueur. On voit alors que la flore de barrière exerce seulement un effet bactériostatique sur la bactérie cible qui est ensuite éliminée passivement grâce au péristaltisme du tube digestif (figure 1). Certaines bactéries disparaissent parfois plus vite du tube digestif que le marqueur de transit, ce qui indique qu'elles sont en partie détruites durant le transit. D'autres, au contraire, subsistent en petit nombre après la disparition du marqueur, ce qui indique qu'elles continuent à se multiplier à un taux faible mais suffisant pour compenser l'évacuation : on retrouve alors des « porteurs sains » [5]. Dans le cas de l'administration journalière d'une culture d'une souche qui ne s'établit pas mais qui n'est pas tuée par les bactéries résidentes, on peut observer que le niveau de population fécale de la souche se maintient à des valeurs qui dépendent du nombre de cellules viables ingérées. Dans ce cas, il s'agit d'un établissement apparent, qui diffère de l'établissement proprement dit tel qu'il a été

défini plus haut. C'est typiquement la situation de la plupart des probiotiques. L'effet de barrière exercé par les souches inhibitrices est dit drastique si la souche cible est éliminée totalement comme le sont les spores de *Bacillus*. Il est dit permissif si la souche cible se maintient à un faible niveau dans la flore sous-dominante. Ce type de barrière permissive est néanmoins important pour l'hôte car nous avons observé expérimentalement dans notre laboratoire qu'une population bactérienne n'était active sur l'hôte ou sur une autre population de la flore que si son niveau dépassait un nombre d'environ  $10^7$  à  $10^8$  par gramme de contenu.

Selon l'ordre d'inoculation des souches, l'effet de barrière est dit curatif si la souche cible est éliminée ou réprimée par les souches inhibitrices bien qu'elle soit inoculée en premier. Il est dit préventif s'il se manifeste seulement lorsque la souche cible est inoculée après les souches inhibitrices. Selon la nature des souches en présence, l'effet de barrière est intraspécifique si souches cibles et inhibitrices appartiennent à la même espèce. Il est interspécifique si elles appartiennent à des espèces différentes. Ces différents vocables traduisent les diverses modalités des effets de barrière microbiens.

Les travaux de Duval-Iflah *et al.* [7-9] illustrent les effets de barrière intraspécifiques entre souches d'*Escherichia coli*. Chez des souris gnotoxéniques, ils montrent qu'une souche d'*E. coli* n'hébergeant aucun plasmide exerce en général un effet de barrière préventif, le plus souvent permissif, sur des souches cibles de *E. coli* qui ne diffèrent de la souche inhibitrice que par un ou plusieurs plasmides que l'on y introduit par conjugaison (figure 2). Le rôle d'un tel effet de barrière est important si l'on songe que les souches cibles réprimées sont porteuses de plasmides codant pour la résistance aux antibiotiques ou pour la production d'entérotoxines. Les mêmes auteurs ont montré qu'une telle souche inhibitrice, si elle est administrée oralement à des nouveau-nés humains dans les heures qui suivent la naissance, peut réprimer les souches de *E. coli* porteuses de plasmides de résistance. Ces mêmes barrières intraspécifiques permettent d'imaginer la construction de souches utilisables dans les produits alimentaires fermentés, modifiées par génie génétique pour améliorer leurs propriétés technologiques, et dont on est sûr qu'elles ne

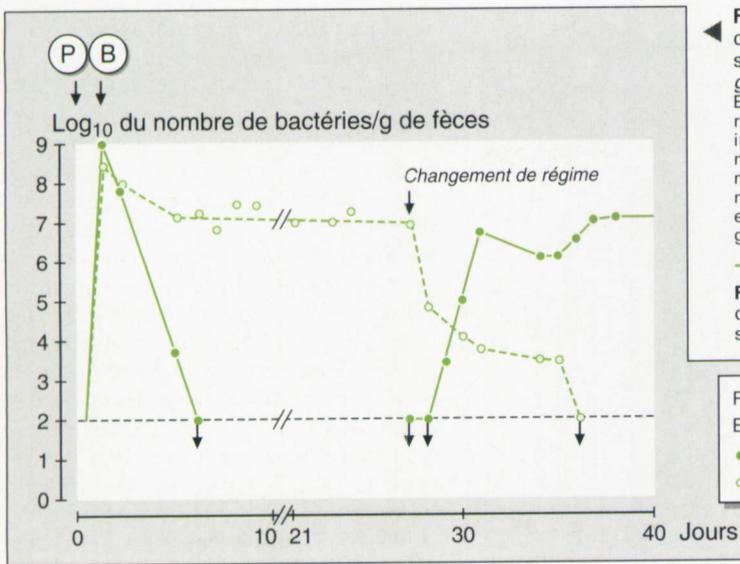
s'implanteront pas dans le tube digestif du consommateur.

De nombreux modèles expérimentaux utilisant des animaux gnotoxéniques ont permis de mettre en évidence des effets de barrière interspécifiques contre de nombreuses souches cibles, notamment celles qui sont pathogènes : *Clostridium*, entérobactéries telles que salmonelles, shigelles, staphylocoques, *Candida*.

Cependant, lorsque l'on tente d'isoler, dans la flore dominante d'un animal ou d'un homme adulte, les bactéries réellement responsables d'un effet de barrière précis, on se heurte à d'importantes difficultés techniques liées au grand nombre de souches et de mélanges de souches à tester et à l'impossibilité fréquente de cultiver certaines souches de bactéries anaérobies strictes. C'est pourquoi il existe très peu de travaux rapportant l'identification complète d'une flore de barrière. On peut citer ici ceux de Corpet *et al.* [10] et de Yurdusev *et al.* [11, 12] qui ont décrit l'effet inhibiteur de souches anaérobies strictes isolées de fèces de porcelets holoxéniques sur une souche cible de *Clostridium perfringens*. Le plus souvent, les travaux rapportent l'effet inhibiteur de mélanges de souches cultivables globalement mais dont ni le nombre précis ni la nature exacte ne sont connus. Ainsi, de nombreux travaux, à la suite de ceux de Nurmi *et al.* [13], ont cherché à déterminer les souches présentes dans les fèces de poulets adultes et capables d'inhiber la croissance des salmonelles dans le tube digestif de ces volatiles. Nurmi *et al.* ont réussi à obtenir un mélange efficace de souches cultivables, mais dont la composition est restée inconnue. Hudault *et al.* [14], à partir de la dilution au millionième de fèces de poulets holoxéniques, ont réalisé un mélange de quatorze souches anaérobies strictes et de deux souches anaérobies facultatives, exerçant à l'égard de *Salmonella typhimurium* un effet de barrière permissif chez le poulet holoxénique.

Malgré le petit nombre d'exemples clairement décrits, on peut discerner certaines caractéristiques communes aux flores de barrière présentes dans la flore dominante des animaux adultes et donc constituées pour l'essentiel de souches bactériennes anaérobies strictes.

Les barrières interspécifiques connues sont toutes dues à des mélanges bactériens agissant en synergie. Dans tous les cas étudiés, deux ou trois souches sont nécessaires pour observer l'effet de bar-



**Figure 4.** Influence du mode de stérilisation du régime alimentaire de souris gnotoxéniques sur l'effet de barrière exercé par trois souches bactériennes anaérobies strictes sur *Clostridium perfringens* (d'après Yurdusev et al. [11]). En (P), onensemence *C. perfringens* dans deux groupes de souris axéniques recevant le même régime alimentaire stérilisé soit par autoclavage, soit par irradiation. En 24 heures, *C. perfringens* s'implante à peu près au même niveau dans les deux groupes d'animaux. En (B), onensemence alors un mélange de trois souches anaérobies strictes. On voit que ces souches éliminent *C. perfringens* chez les souris recevant le régime irradié et n'ont qu'un effet très faible chez les souris recevant le régime autoclavé. Lorsqu'on échange les régimes, on inverse l'effet de barrière.

**Figure 4.** Influence of how the diet of gnotoxenic mice is sterilised (irradiation or autoclavation) on the barrier effect of three obligate anaerobic strains on *Clostridium perfringens*.

P = *Clostridium perfringens*  
 B = Souches de barrière (*Clostridium C*, *Fusobacterium* et *Bacteroides B2*)  
 ● = Lot de souris recevant d'abord le régime irradié, puis le régime autoclavé  
 ○ = Lot de souris recevant d'abord le régime autoclavé, puis le régime irradié

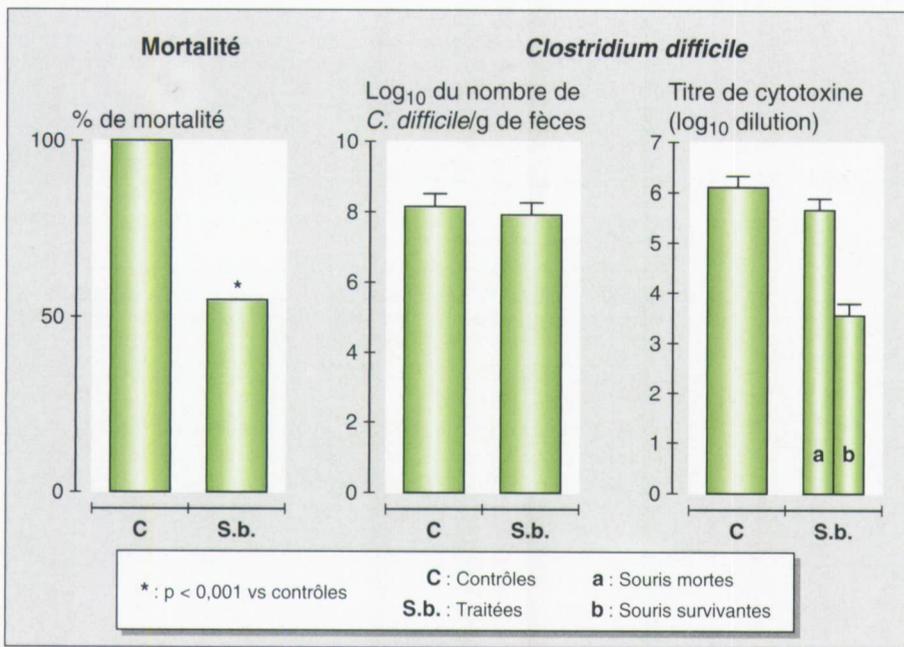
rière alors que chaque souche ensemencée seule n'exerce qu'un effet faible, voire nul, à l'égard de la souche cible. Ces effets de barrière sont spécifiques en ce sens que certaines souches cibles y sont sensibles et d'autres non (figure 3). La propriété d'exercer un effet de barrière est l'apanage exclusif de certaines souches de bactéries et n'est pas liée à leur position taxonomique. Ainsi, dans l'exemple de barrière anti-*C. perfringens* rapporté plus haut, on a constaté qu'on ne pouvait pas remplacer indifféremment les souches actives de *Bacteroides* et *Fusobacterium* par d'autres souches appartenant au même genre, voire à la même espèce, isolées des mêmes animaux [13]. Enfin, les barrières microbiennes sont modulées par l'hôte et par son régime alimentaire. Ainsi, les résultats de Yurdusev et al. [12] mettent en évidence un effet de l'hôte sur l'expression de l'effet de barrière exercé par deux souches inhibitrices contre la souche cible de *C. perfringens*. Alors que cet effet de barrière est drastique chez la souris gnotoxénique, il n'est que permissif chez le rat hébergeant les mêmes souches inhibitrices (qui atteignent les mêmes niveaux d'implantation) et recevant le même aliment. L'effet de l'aliment a été bien montré dans le même modèle à trois souches. Le simple fait de stériliser par autoclavage l'aliment des souris au lieu de l'irradier a pour conséquence de transformer l'effet de barrière drastique exercé par les deux souches inhibitrices vis-à-vis de *C. per-*

*fringens* en un effet de barrière permissif (figure 4). Dans ce cas, les niveaux de populations des trois souches anaérobies strictes exerçant leur effet de barrière ne sont pas changés par les modifications de l'aliment dues au traitement technologique. C'est donc au niveau de l'expression des mécanismes de barrière, encore inconnus, qu'agit cette modification de l'aliment.

## Les probiotiques et leurs mécanismes d'action

Les probiotiques ont été définis par Fuller en 1989 [15] comme « un supplément alimentaire de microbes vivants qui a un effet bénéfique sur l'hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale ». Les plus courants comprennent plusieurs souches microbiennes appartenant principalement aux genres *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus* et *Saccharomyces*. Ils sont donnés vivants et en continu. On estime que leur concentration doit être supérieure à  $10^6$  par gramme d'aliment. Ils ne s'implantent pas dans le tube digestif et donc ne font pas partie des souches actives de l'écosystème gastro-intestinal, mais conservent tout ou partie de leur viabilité durant leur transit dans l'intestin. On considère qu'ils peuvent améliorer le gain de poids et/ou l'indice

de consommation, la production laitière et l'état de santé de l'hôte. Ces effets bénéfiques ne sont pas toujours reproductibles et s'observent surtout chez les animaux dont les performances zootechniques ne sont pas optimales. Lorsqu'on consulte les articles scientifiques ou commerciaux se rapportant aux probiotiques, on constate que les principaux modes d'action avancés sont les suivants : les probiotiques seraient capables de coloniser le tube digestif, d'éviter la prolifération des pathogènes, de neutraliser les entérotoxines produites *in situ*, de moduler l'activité de certaines enzymes bactériennes, d'exercer des effets adjuvants sur le système immunitaire et d'améliorer les capacités digestives de l'intestin grêle. En fait, si on reprend ces affirmations, on s'aperçoit que bien peu d'entre elles sont étayées par des résultats expérimentaux convaincants. Comme nous l'avons vu, les probiotiques qui sont des microbes exogènes soumis aux effets de barrière de la flore ne colonisent pas le tube digestif. Bien que certains probiotiques aient été sélectionnés sur leur capacité à produire *in vitro* des facteurs antibactériens (acide lactique, bactériocines), aucune étude expérimentale *in vivo* n'a démontré qu'ils avaient le même effet dans le tube digestif. De tels effets antagonistes ont cependant été démontrés avec des microorganismes administrés très tôt après la naissance et donc capables de s'implanter



**Figure 5.** Exemple d'interaction métabolique (d'après Corthier [17]). Taux de mortalité, colonisation fécale par *Clostridium difficile* et titre de cytotoxine observés chez des souris gnotoxéniques 2 jours après l'inoculation oro-gastrique de  $5 \times 10^7$  *C. difficile*. Les souris traitées (S.b.) recevaient *ad libitum* une solution contenant  $5 \times 10^9$  *Saccharomyces boulardii* par ml depuis le quatrième jour précédant l'inoculation, les souris contrôles (C) recevaient de l'eau. On constate que si la colonisation fécale par *C. difficile* n'est pas influencée par le traitement, le titre de cytotoxine est réduit de près de 1 000 fois chez les souris survivantes protégées par *S. boulardii*. Il est à noter que le taux de mortalité est resté stable après l'arrêt du traitement par *S. boulardii* (10 jours au total).

**Figure 5.** Example of metabolic interaction.

en absence de barrière. Comme nous l'avons vu plus haut, on peut protéger les poussins contre *Salmonella enteritidis* en leur inoculant, à l'éclosion, un mélange de souches bactériennes non identifiées [13]. Dubos *et al.* [16] ont réussi à prévenir la diarrhée et la mort chez des jeunes levrauts en les ensemençant à la naissance avec un mélange complexe de bactéries anaérobies strictes. Mais ces mélanges inconnus qui agissent plutôt en s'implantant qu'en transitant dans le tube digestif ne peuvent pas être considérés comme des probiotiques.

Corthier, en 1988 (figure 5 [17]), a montré qu'une suspension concentrée de *Saccharomyces boulardii* donnée comme boisson à des souris gnotoxéniques protège ces animaux de l'effet léthal exercé par une souche de *Clostridium difficile* hautement toxigénique. La population de bactéries pathogènes n'est pas affectée, mais l'entérotoxine n'est plus détectée et le niveau de cytotoxine est abaissé de cent fois chez les souris survivantes. Toutefois, le même auteur n'a pas trouvé de protection contre *C. difficile* chez des souris ingérant du yoghourt contenant  $5 \times 10^8$  *S. thermophilus* et  $5 \times 10^8$  *L. bulgaricus* par millilitre.

Goldin et Gorbach [18] ont montré qu'une préparation à base de *L. acidophilus* diminuait le niveau de diverses enzymes impliquées dans des processus de carcinogenèse chez le rat. Mais ce résultat n'a pas pu être reproduit chez le porcelet sevré [19].

L'effet adjuvant de l'ingestion de lactobacilles et de streptocoques sur les paramètres immunitaires a été observé chez la souris, le porc et l'homme [20-22]. On constate, en particulier, un accroissement des immunoglobulines sériques de type IgG, une activation des lymphocytes et des phagocytes et un accroissement des anticorps sécrétoires de type IgA anti-*Salmonella typhimurium* chez des souris recevant une préparation de *L. casei*. De plus, on constate une élimination beaucoup plus rapide, du foie et de la rate, de plusieurs entérobactéries pathogènes injectées chez les animaux recevant *L. casei* [23].

Dans le domaine de l'amélioration des capacités digestives de l'intestin grêle, trois hypothèses sont étayées par des faits expérimentaux : meilleure utilisation du lactose alimentaire [24], meilleure absorption apparente de l'azote aminé [25], et, pour *Saccharomyces*, diminution

de la teneur en oxygène du rumen grâce à la capacité respiratoire des cellules de levure.

L'utilisation des probiotiques n'est certainement pas une panacée pour les éleveurs. Cependant, un certain nombre de faits expérimentaux bien documentés laissent penser que leur utilisation peut s'avérer utile. Il serait important maintenant de comprendre comment les probiotiques sont capables d'agir dans des conditions d'environnement différentes et chez des espèces animales différentes. La majeure partie des arguments avancés actuellement pour expliquer leur action n'est pas vérifiée par les résultats expérimentaux. Cependant, leur rôle comme adjuvant de l'immunité et dans l'amélioration des capacités digestives de l'intestin grêle semble maintenant bien démontré et pourrait servir de base à un choix raisonné de souches bactériennes actives.

## Conclusion

Les interactions bactériennes jouent un rôle primordial dans la pérennité de l'écosystème hôte/flore bactérienne du tractus gastro-intestinal. Elles sont responsables de la complexité de cette flore bactérienne et des mécanismes par lesquels, une fois établie, elle s'oppose à l'invasion du tube digestif par les souches bactériennes que l'hôte ingère quotidiennement. Puisque ces bactéries peuvent aussi être pathogènes, on conçoit très facilement l'intérêt de maintenir en continu l'intégrité des barrières microbiennes. Une application immédiate de ce concept a été d'étudier l'impact des antibiotiques ingérés par l'hôte sur l'équilibre de sa flore, de façon à choisir ceux qui perturbent le moins l'écosystème. Bien entendu, les effets de barrière s'exercent aussi à l'égard des bactéries non pathogènes qui arrivent parfois en masse dans notre tube digestif, apportées par notre alimentation. C'est en particulier le cas des bactéries lactiques des aliments fermentés. Cet apport, même massif, n'est pas suivi d'implantation durable. C'est ce qui explique la stabilité de la flore complexe d'un adulte et, dans ce sens, on peut considérer les effets de barrière comme les éléments essentiels contribuant à l'homéostasie de l'individu. Il existe actuellement un verrou qui s'oppose à la multiplication des applications pratiques de nos connaissances sur

## Summary

### Microbial ecology of the digestive tract and probiotics in animal feeding

R. Ducluzeau, P. Raibaud

*The digestive tract of man and animal is an enclave of the external environment, and host to a dense and complex bacterial population. At a steady state, attained in the adult, the microbial flora of the distal parts of the digestive tract may amount to between  $5.10^{10}$  and  $2.10^{11}$  viable cells per gram of fresh matter. In humans, this flora numbers over 190 species. Despite some individual variation, the flora remains remarkably stable within a given species. In a healthy host, a dozen species may cohabit at a high population level, while other sub-dominant species occur in smaller numbers.*

*To maintain the host digestive tract ecosystem and bacterial flora, bacterial interaction is vital. The complexity of the flora is a result of the bacteria themselves, as are the mechanisms by which an already established flora can counter the establishment of strains ingested daily by the host. When such strains are pathogenic, the value of a continuously maintained microbial barrier is easy to understand. However, the same bacterial barrier will also operate against the non-pathogenic species reaching the digestive tract with the food, often in large numbers. This is particularly the case with *Lactobacillus* in fermented food: even when massive, the input is not followed by lasting colonisation, explaining the stability of an adult's floral complex. The barrier effect is one of the contributing factors to an individual's homeostasis.*

*Despite today's knowledge of the digestive tract flora, there is a serious stumbling block to increasing the practical applications: the impossibility of implanting a strain (known to be of value through gnotoxenic modelling) into the*

*dominant flora of a holoxenic individual. This is one example of the adverse effect of the barrier. Implantation can only succeed if done at birth, and this clearly restricts its usefulness. One solution could be the continuous administration of large numbers of useful bacteria. Such bacteria continue to metabolise during transit and could simulate the effect of an implanted flora and form the basis for what is referred to as « probiotics » in animal feeding.*

*Many live micro-organisms are used in animal feed today as probiotics. It may be as preventive or curative therapeutic agents against gastroenteric disorders in pre-weaned or stressed animals for short-term feeding, or for long-term feeding as growth enhancers or to prevent chronic post-weaning disorders.*

*To date, the experimental data do not allow to conclude that probiotics can colonise the digestive tract or prevent the growth of intestinal pathogens through the in situ production of antibacterial metabolites. Neutralisation of enterotoxins has been demonstrated in vivo using very large numbers of probiotic cells. The results obtained for faecal glucuronidase activity in rats and pigs are controversial. On the other hand, there is good evidence that certain probiotics can increase the utilisation of lactose and amino acids in the small intestine; these results could account for the reported growth-enhancing effect of probiotics. Similarly, an increase in both phagocytic and lymphocytic activity has been demonstrated; this could account for their reported therapeutic effect.*

*Cahiers Agricultures 1994 ; 3 : 353-60*

la flore du tube digestif. C'est l'impossibilité d'implanter dans la flore dominante d'un individu holoxénique une souche dont l'intérêt pour l'hôte a été reconnu dans des modèles gnotoxéniques. On trouve là le mauvais côté de l'effet de barrière. Une telle implantation n'est possible, nous l'avons vu, qu'à l'instant de la naissance ou à des périodes précises et actuellement inconnues de la vie de l'individu, ce qui en limite l'intérêt. Un palliatif peut être trouvé dans l'ingestion continue de quantités massives de bactéries utiles. Elles continuent alors à métaboliser durant leur transit et peuvent

mimer l'effet d'une flore implantée. C'est ainsi que l'on peut concevoir l'effet des probiotiques en alimentation animale.

On voit bien que les progrès les plus importants dans ce domaine viendront de la connaissance des mécanismes d'action qui permettront la maîtrise de l'écosystème. Des études en cours permettent d'espérer que l'on pourra bientôt localiser génétiquement les facteurs qui confèrent à une souche donnée un avantage écologique lui permettant de se maintenir dans la flore dominante d'un hôte donné. Dès lors, les techniques du génie génétique permettront de transférer ces caractères

aux bactéries reconnues comme les plus utiles, même si notre manque de connaissances sur la génétique des bactéries anaérobies strictes laisse présager bien des difficultés techniques en la matière.

C'est seulement au prix d'un effort accru de recherches dans le domaine de la gnotoxénie que nous réussirons tôt ou tard à appréhender les véritables mécanismes des interactions bactériennes dans le tube digestif et, dans un deuxième temps, à optimiser les relations qu'entretiennent les animaux domestiques avec la flore de leur tractus gastro-intestinal ■

## Références

1. Finegold SM, Sutter VL, Mathisen GE. Normal indigenous flora. In : Hentges DJ, ed. *Human intestinal microflora in health and disease*. New York : Academic Press, 1983 : 3-31.
2. Raibaud P, Raynaud JP. Experimental data on the modes of action of probiotics. In : Metz JHM, Groenestein CM, eds. *New trends in veal calf production*. Wageningen : EAAP Publication, 1991 : 269-75.
3. Raibaud P, Ducluzeau R. Étude de la colonisation bactérienne du tractus gastro-intestinal à l'aide de modèles expérimentaux. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 1989 ; 8 : 361-73.
4. Ducluzeau R, Raibaud P. Intérêt des systèmes gnotoxéniques pour l'étude des relations hôte-flore microbienne du tube digestif. *Repro Nutr Dév* 1980 ; 20 : 1667-78.
5. Ducluzeau R, Bellier M, Raibaud P. Transit digestif de divers inoculums bactériens introduits *per os* chez des souris axéniques et « holoxéniques » (conventionnelles) : effet antagoniste de la microflore du tractus gastro-intestinal. *Zentbl Bakt ParasitKde* 1970 ; 213 : 533-48.
6. Van der Waij DJ, Berghuis de Vries JM, Lekkerkerk van der Wees JEC. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic treated mice. *J Hygiene* 1971 ; 69 : 405-11.
7. Duval-Yflah Y, Chappuis JP, Ducluzeau R, Raibaud P. Intraspecific interactions between *Escherichia coli* strains in human newborns and in gnotobiotic mice and piglets. *Prog Fed Nutr Sci* 1983 ; 7 : 107-16.
8. Duval-Yflah Y, Ouriet MF, Moreau C, Daniel N, Gabilan JC, Raibaud P. Implantation précoce d'une souche de *Escherichia coli* dans l'intestin de nouveau-nés humains : effet de barrière vis-à-vis de souches de *E. coli* antibiorésistantes. *Ann Microbiol* 1982 ; 133A : 393-408.
9. Duval-Yflah Y, Raibaud P, Rousseau M. Antagonisms among isogenic strains of *Escherichia coli* in the digestive tracts of gnotobiotic mice. *Infect Immun* 1981 ; 34 : 957-69.
10. Corpet D, Nicolas JL. Antagonistic effect of intestinal bacteria from the microflora of holoxenic (conventional) piglet against *Clostridium perfringens* in the digestive tract of gnotoxenic mice and gnotoxenic piglets. In : Fliedner *et al.*, eds. *Clinical and experimental gnotobiotics*. *Zentbl Bakt ParasitKde* 1979 ; Suppl 7 : 169-74.
11. Yurdusev N, Nicolas JL, Ladiré M, Ducluzeau R, Raibaud P. Antagonistic effect exerted by three strictly anaerobic strains against various strains of *Clostridium perfringens*. In : *Gnotobiotic rodent intestines*. *Can J Microbiol* 1987 ; 33 : 226-31.
12. Yurdusev N, Ladiré M, Ducluzeau R, Raibaud P. Antagonism exerted by an association of a *Bacteroides thetaiotaomicron* strain and a *Fusobacterium necrogenes* strain against *Clostridium perfringens* in gnotobiotic mice and in fecal suspension incubated *in vitro*. *Infect Immun* 1989 ; 57 : 724-31.
13. Nurmi E, Rantala M. New aspects of *Salmonella* infections in broiler production. *Nature* 1973 ; 241 : 210-1.
14. Hudault S, Bewa H, Bridonneau C, Raibaud P. Efficiency of various bacterial suspensions derived from fecal floras of conventional chickens in reducing population level of *Salmonella typhimurium* in gnotobiotic mice and chicken intestines. *Can J Microbiol* 1985 ; 31 : 832-6.
15. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989 ; 66 : 365-78.
16. Dubos FL, Martinet J, Dabard J, Ducluzeau R. Immediate postnatal inoculation of a microbial barrier to prevent neonatal diarrhea induced by *Clostridium difficile* in young conventional gnotobiotic hares. *Am J Vet Research* 1984 ; 45 : 1242-4.
17. Corthier G. Ecologic means of protection against *C. difficile* infections in gnotobiotic mice. In : Bergogne-Berezin E, ed. *Microbial ecology and Intestinal Infections*. Paris : Springer Verlag France, 1988 : 43-55.
18. Goldin BR, Gorbach SL. Alterations of intestinal microflora by diet, oral antibiotics, and *Lactobacillus*: decreased production of free amines from aromatic nitro compounds, azo dyes, and glucuronides. *J Nat Cancer Institute* 1984 ; 73 : 689-95.
19. Lessard M, Brisson GJ. Effect of *Lactobacillus* fermentation product on growth, immune response and fecal enzyme activity in weaned pigs. *Can J Anim Sci* 1987 ; 67 : 509-16.
20. Conge GA, Gouache P, Desormeau-Bedot JP, Loissillier F, Lemonnier D. Effets comparés d'un régime enrichi en yoghourt vivant ou thermisé sur le système immunitaire de la souris. *Repro Nutr Dév* 1980 ; 20 : 929-38.
21. Perdigon GS, De Macias MEN, Alvarez S, Oliver G, De Ruiz Holgado AP. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immunology* 1988 ; 63 : 17-23.
22. De Simone CB, Tzantzoglou S, Baldinelli L, *et al.* Enhancement of host resistance against *Salmonella typhimurium* infection by a diet supplemented with yogurt. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1988 ; 10 : 399-415.
23. Perdigon GS, Alvarez S, De Macias MEN, Medici M. Effect of lactic acid bacteria orally administered and of yogurt on the immune system. In : Syndifrais, ed. *Fermented milks, Current research*. London, Paris : John Libbey Eurotext Ltd, 1989 ; 77-84.
24. Savaiano DA, Abdelhak Abou El Anouar DAG, Smith DE, Levitt MD. Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactase-deficient individuals. *Am J Clin Nutr* 1984 ; 40 : 1219-23.
25. Rychen G, Simoes-Nunes C. Effect of a microbial probiotic (*Sporolactobacillus* P44) on post prandial porto-arterial concentration difference of glucose, galactose and amino-nitrogen in the growing pig. *Repro Nutr Dev* 1993 ; 33 : 531-9.

## Résumé

Tous les animaux et l'homme abritent dans leur tractus intestinal une énorme masse de microbes vivants : on dénombre, par gramme de fèces, environ  $5 \times 10^{10}$  cellules bactériennes. Cette flore microbienne influence considérablement la santé de l'hôte. Les interactions bactériennes jouent à cet égard un rôle primordial : elles régulent l'équilibre entre les divers composants de la flore et permettent à certaines souches bactériennes de la flore dominante de s'opposer à l'envahissement de l'écosystème par les bactéries ingérées par l'hôte, ce qui présente un grand intérêt lorsque ces bactéries sont pathogènes. Les probiotiques sont des micro-organismes donnés vivants et en continu aux animaux. Ils ne s'implantent pas dans le tube digestif, mais conservent tout ou partie de leur viabilité durant leur transit dans l'intestin. On considère qu'ils peuvent améliorer les paramètres zootechniques des animaux en permettant une meilleure utilisation des nutriments. Cependant, ces effets bénéfiques ne sont pas toujours reproductibles et s'observent surtout chez les animaux dont les performances zootechniques ne sont pas optimales. On estime aussi qu'ils peuvent avoir un effet bénéfique sur la santé de l'hôte en exerçant un effet adjuvant sur certains paramètres immunitaires.