

EFFETS DES FRUCTO-OLIGOSACCHARIDES OU DES GRAINES ENTIERES DE BLE SUR LA STRUCTURE DE LA MUQUEUSE INTESTINALE ET LA PRODUCTION DE MUCUS CHEZ LE POULET

Mallet Serge¹, Travel Angélique², Williams Jeanne¹, Leconte Maryse¹, Candidat Morgane¹ et Chevais Coline¹

¹INRA, UR83 Unité de Recherches Avicoles, 37380 NOUZILLY

²ITAVI, UR83 Unité de Recherches Avicoles, 37380 NOUZILLY

Travaux réalisés dans le cadre de l'UMT BIRD

RÉSUMÉ

Afin de mieux comprendre l'impact de la structure de l'aliment ou d'additifs sur la santé digestive des volailles, une technique d'histomorphométrie de l'intestin par microdissection et mesure de villosités et de cryptes a permis de caractériser la surface d'absorption intestinale. Une coloration au Bleu Alcian et Acide Périodique-Schiff a permis en plus de déterminer la densité de cellules à mucus, critère important à apprécier en raison du rôle protecteur du mucus.

Des échantillons de jéjunum ont été prélevés sur des poulets témoins (Ross PM3) âgés de 3 semaines et sur des poulets dont l'aliment était supplémenté par de l'Avilamycine (10ppm), des FOS à courte chaîne (0.06%) ou avec le blé de la ration fourni sous forme de graines entières. Les hauteurs, largeurs et surface des villosités et des cryptes de Lieberkühn ont été mesurées ainsi que, au niveau des villosités, le nombre de cellules à mucus par unité de surface.

Comparé au lot témoin, le lot supplémenté à l'Avilamycine avait des cryptes moins profondes et moins de cellules à mucus à la surface des villosités. Le lot FOS avait des cryptes moins profondes et un nombre de cellules à mucus plus élevé. Les poulets du lot blé entier avaient une hauteur de villosités et une profondeur de cryptes réduites par rapport au témoin négatif mais avec un nombre de cellules à mucus inchangé.

L'impact de ces modifications structurelles au niveau de l'intestin sur les performances des poulets et leurs relations avec la microflore intestinale sont discutés.

ABSTRACT

To understand the effect of diet structure or feed additives on gut health of poultry, an histo-morphometric micro dissection method allows, by measuring villi and crypts a characterisation of the intestinal absorptive surface. We have adapted to this method a coloration with Alcian Blue and Periodique Acid -Schiff for a quantification of goblet cells that is an important parameter due to the protective role of mucus.

Samples of jejunum were taken on 3 week old control broilers (Ross PM3) and on birds with the diet supplemented by Avilamycine (10ppm), short chain FOS (0.06%) or with the wheat of the diet given as whole grains. Height, width and surface of villi and crypts of Lieberkühn were measured and the goblet cells counted per surface unit of villus.

Compared to control group, the Avilamycin supplemented group presented shorter crypts and less goblet cells on villous surface. The sc-FOS group presented shorter crypts and higher counts of goblet cells. In whole wheat group, villous height and crypt depth were lower but the number of goblet cells was not modified.

The impact of these modifications of intestinal structure on bird performance and the relations with intestinal microflora are discussed.

INTRODUCTION

L'efficacité zootechnique de certaines alternatives aux Antibiotiques Facteurs de Croissance (AFC) utilisées en alimentation animale est bien étudiée mais leurs modes d'action ne sont pas totalement identifiés. La forme de présentation de l'aliment ou l'apport d'additifs peut avoir un impact sur le fonctionnement et la structure du tube digestif des volailles. La technique d'histomorphométrie de l'intestin, couramment utilisée, permet de caractériser la surface d'absorption intestinale par histologie classique ou par microdissection et de mesurer la taille des villosités et des cryptes de Lieberkühn.

L'avilamycine a été choisi comme témoin positif pour son action reconnue comme facteur de croissance et régulateur de la microflore intestinale. Les Fructo Oligo Saccharides (FOS) sont des oligosaccharides non hydrolysés par les enzymes digestives du poulet qui constituent un substrat pour la microflore et ont un effet bénéfique en stimulant le développement de bactéries favorables comme les lactobacilles et bifidobactéries (Xu et al., 2003). L'utilisation de graines entières dans l'aliment peut également entraîner un changement de la flore digestive (Gabriel et al, 2003 & 2008; Engberg et al, 2004).

Des interactions fortes ont pu être mises en évidence entre la microflore intestinale et la production de mucus (Deplancke et Gaskins, 2001). Le mucus recouvre l'épithélium intestinal où il exerce un effet protecteur et lubrifiant. Ses propriétés physico chimiques sont dues aux propriétés élastiques et gélifiantes de glycoprotéines, les mucines, qui sont ses composants majoritaires. Les mucines qui peuvent être définies comme neutres ou acides sont sécrétées au niveau de l'épithélium digestif par les cellules caliciformes.

Il est donc intéressant de pouvoir caractériser au niveau des villosités les cellules à mucus qui sont un bon marqueur de la production de mucus au niveau de la muqueuse intestinale.

Dans notre étude, une coloration au bleu Alcian (BA) et acide périodique /schiff (APS), largement utilisée en histologie classique chez les mammifères (Piel et al., 2005) comme chez les volailles (Jamroz et al., 2006), a été adaptée, à la méthode de microdissection décrite par Goodlad et al (1991), afin de mettre en évidence dans les cellules à mucus respectivement les mucines neutres et acides.

Nous avons étudié à l'aide de cette méthode les effets de deux additifs alimentaires et des graines entières de blé sur la morphologie du jejunum et la densité en cellules à mucus de ce segment chez le poulet de chair âgé de 3 semaines.

L'étude, réalisée dans le cadre du contrat européen Poultryflorgut (2005-2008) a déjà fait l'objet d'une publication présentant les paramètres zootechniques observés et certains des paramètres de la physiologie intestinale au niveau du duodénum et de l'Iléon (William et al, 2008). Nous présenterons dans cet article, uniquement les effets des additifs sur la structure de la muqueuse et la production de mucus obtenus au niveau du jéjunum..

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Régimes expérimentaux

Quatre régimes sont utilisés comme décrits par William et al. (2008) : un témoin négatif, un témoin positif contenant 10 ppm d'avilamycine, un régime contenant 0,06% de FOS (PROFEED® Beghin Meiji) et un autre contenant des graines entières de blé (40%).

L'aliment de base, témoin négatif, est composé principalement de blé (40%) soja et maïs, et ses caractéristiques correspondent aux besoins des animaux aux différentes périodes de leur croissance : démarrage (1-11 jours), croissance (12-25 jours), finition (26-36 jours) et retrait (37-42 jours). Tous les aliments à l'exception du régime graines entières (GE) sont présentés sous forme granulée.

Pour le régime GE, l'introduction des graines entières s'effectue progressivement. La moitié du blé du régime est mise sous forme de graines de blé broyées grossièrement de 8 à 9 jours, puis sous forme de graines entières de 10 à 11 jours. A partir de 12 jours, l'ensemble du blé broyé est remplacé par des graines entières. Les graines entières sont présentées mélangées au reste de l'aliment qui est présenté sous forme de granulés.

1.2. Animaux

L'étude comporte 864 poulets de chair (Ross PM3 males) élevés au sol pendant 42 jours dans des conditions standard de température et d'éclairage. Les poussins d'un jour sont répartis selon leur poids vif en 24 parquets (3 m²) de 36 animaux dans un bâtiment expérimental. Les animaux sont pesés individuellement à 11, 25, 36 et 42 jours. La consommation de chaque parquet est mesurée pour chaque période afin de calculer l'indice de consommation moyen des animaux (Williams et al, 2008).

1.3. Mesures effectuées

Prélèvement de tissus intestinaux

A 3 semaines d'âge, dans chacun des 6 parquets de chaque régime 3 animaux sont sacrifiés par injection létale en intraveineuse de pentobarbital de sodium. Un fragment (0,5 cm de long) d'intestin situé au milieu du jéjunum, est prélevé, lavé (NaCl 0,9%) puis fixé (formol tamponné, 24 h avant d'être conservé dans de l'éthanol 70% à 4°C.

Analyse histologique

Les échantillons de tissus intestinaux sont réhydratés par passage dans l'éthanol 50% (15 min) puis dans l'eau déminéralisée (15 min). Les échantillons sont ensuite colorés par le Bleu Alcian pH 2,5 (5 min), rincés 3 fois à l'eau déminéralisée, puis colorés par l'APS : acide periodique 1% (5 min), 3 rinçages à l'eau déminéralisée, réactif de schiff (5 min) puis 3 rinçages à l'eau déminéralisée et conservation pour les mesures dans l'acide acétique 45%

Pour chaque échantillon, après dissection à l'aide d'un stéréomicroscope, des mesures de morphométrie (longueur et largeur) sont effectuées sur 10 villosités et 10 cryptes à l'aide du logiciel d'analyse d'image Visilog 6.3. Sur la zone centrale de chaque villosité une aire circulaire d'environ 0.007 mm² est définie et les cellules à mucus sont comptées à l'intérieur de cette aire (figure 1).

1.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel Statview par analyse de variance, et comparaisons des moyennes selon le test de Student-Newman-keuls ($p < 0.05$).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Coloration des cellules à mucus

Le but de la coloration ici décrite était de permettre le comptage des cellules à mucus et ainsi d'estimer les possibilités sécrétrices de la muqueuse. Chez les rongeurs, on observe en effet qu'une diminution du nombre de cellules à mucus se traduit par une diminution de l'épaisseur de la couche de mucus intestinal (Kandori et al, 1996). Après coloration, toutes les cellules à mucus apparaissent colorées en bleu violacé ce qui indique qu'elles contiennent majoritairement des mucines acides (syalomucines) colorées en bleu par le bleu alcian (BA) mais aussi une certaine proportion de mucines neutres colorées en rose fuschia par l'APS (Figure 1). La double coloration utilisée dans cette étude révèle, dans la

zone du comptage située au milieu de la villosité (figure 1) la totalité des cellules à mucus mais pas tous les types de mucines. Les sulfomucines notamment, abondantes à la base des villosités (Forder et al, 2007) ne sont pas mises en évidence. Sur des coupes histologiques de jéjunum de poulets du même âge, Jarmoz et al. (2006), avec la même coloration a observé des cellules à mucus contenant des mucines acides BA positives. D'autres auteurs (Sharma et al, 1997, Uni et al, 2003) qui ont utilisé séparément les deux colorations ont montré un nombre équivalent de cellules AB et APS positives. Cependant, en l'absence de double coloration, on ne peut pas exclure que ce soit les mêmes cellules qui aient été comptées dans les deux cas comme sécrétant des mucines acides et neutres. L'hypothèse d'une sécrétion mixte de mucines neutres et acides avec une proportion importante de mucines acides semble donc la plus plausible.

2.2 Effet des additifs

Avec l'avilamycine, on observe par rapport au témoin négatif (tableau 1), que la hauteur et la surface des villosités ne sont pas modifiées alors que la profondeur des cryptes est significativement plus faible comparée au témoin négatif. Ce qui confère aux animaux un avantage car l'animal dépense moins d'énergie au niveau des cryptes qui sont le lieu où se fait en grande partie la prolifération cellulaire pour une surface de villosité équivalente. Ceci est illustré par un rapport hauteur des villosités / profondeur des cryptes plus élevé. Bien que non significative statistiquement, une réduction du nombre de cellules à mucus par unité de surface est observée. Le rôle modulateur de la microflore intestinale sur la production de mucus est bien établi (Deplancke et Gaskins, 2001). Il se traduit chez des animaux axéniques par une diminution du nombre et de la taille des cellules à mucus qui se traduit par une diminution de l'épaisseur de la couche de mucus recouvrant l'épithélium intestinal. Il n'est donc pas surprenant d'observer une diminution du nombre de cellules à mucus au niveau des villosités avec l'avilamycine, connue pour réduire la charge bactérienne au niveau de l'intestin des poulets (Thomke et Elwinger, 1998). Au cours de la même expérimentation aucune modification de la morphométrie duodénale ou iléale n'avait été observée. Les améliorations que nous observons ici au niveau du jéjunum peuvent donc en partie expliquer les meilleures performances zootechniques des animaux qui présentaient sur la même période (J12-J25) un gain de poids journalier significativement plus élevé (58,7 g) pour le lot Avilamycine comparé au lot témoin (53,6 g) (Williams et al. 2008).

Chez les animaux du régime FOS, la hauteur et la surface des villosités ne sont pas significativement

modifiées. La profondeur des cryptes est plus faible, mais au même niveau qu'avec l'avilamycine. Cependant, du fait d'une hauteur des villosités numériquement plus faible, le rapport hauteur des villosités / profondeur des cryptes du lot FOS est identique à celui du lot témoin. Aucune modification n'a été observée avec les mêmes animaux au niveau du duodénum et de l'iléon (Williams et al. 2008). Les villosités des animaux du lot FOS présentent une augmentation significative du nombre de cellules à mucus par rapport au témoin négatif.

Certaines bactéries comme les lactobacilles, notamment par l'intermédiaire des acides gras volatils qu'ils génèrent, sont connus pour stimuler la sécrétion du mucus (Deplancke et Gaskins, 2001). Xu et al (2003) montrent une augmentation du nombre de lactobacilles avec un aliment contenant 0.4% de FOS. Dans la présente expérimentation, avec une dose plus faible de FOS (0.06%), même si aucune augmentation significative de la flore lactique n'est observée, on a pu constater une tendance à une augmentation de la flore mésophile, surtout au niveau du cloaque. De plus, l'hypothèse selon laquelle, les modifications de composition de microflore par les FOS (comme observée sur les mêmes animaux par Gabriel et al (2008) à l'aide des techniques d'empreinte moléculaire (TTGE et CE-SSCP)) stimulerait la sécrétion de mucus, ne peut donc pas être exclue. Cette sécrétion accrue, même si, dans cette expérimentation, elle pénalise la croissance des animaux (gain de poids journalier inférieur par rapport au témoin, 49,3g/j vs 53,6), ne se fait pas aux dépens de l'indice de consommation qui n'est pas modifié. Ceci pourrait jouer un rôle bénéfique en protégeant la muqueuse intestinale contre d'éventuels agents pathogènes.

Les animaux recevant des graines entières de blé montrent par rapport au témoin négatif une diminution significative de la hauteur des villosités. Cependant, la profondeur des cryptes est également plus faible ce qui induit un rapport hauteur des villosités / profondeur des cryptes identique au témoin négatif. Aucune modification de la structure intestinale n'avait été montrée avec les mêmes animaux au niveau du duodénum et de l'iléon. La diminution de la taille des villosités intestinales au niveau du jéjunum où s'effectue une grande partie

de l'absorption des nutriments peut en partie expliquer les baisses de performances (gain de poids journalier inférieur par rapport au témoin, 50,1 vs 53,6) observées dans ce lot à la même période (Williams et al. 2008). Le nombre de cellules à mucus n'est en revanche pas modifié ce qui peut s'expliquer par l'absence de modification de la charge bactérienne des animaux. Gabriel et al (2008) avaient cependant noté, avec les graines entières de blé une modification de la composition des populations bactériennes.

CONCLUSION

Des modifications de la morphométrie des villosités et des cryptes ont été observées au niveau du jéjunum alors qu'aucun effet n'a été constaté au niveau du duodénum ou de l'iléon. Les effets de l'alimentation peuvent donc être différents d'un segment intestinal à l'autre et le jéjunum semble donc être une zone intéressante à étudier.

En adaptant à la technique de microdissection des villosités intestinales la double coloration au Bleu Alcian et acide periodique-Schiff, nous avons pu, sur les mêmes villosités effectuer une numération des cellules à mucus et disposer ainsi d'un marqueur de la production de mucus. Ces mesures méritent cependant d'être complétées par des études plus fines de la composition des mucines, notamment en différenciant les sulfo- et les sialomucines.

Le rôle modulateur de la microflore intestinale sur les cellules à mucus a été conforté puisque avec l'avilamycine qui diminue la charge bactérienne, on observe un nombre plus faible de cellules à mucus alors que ce nombre est augmenté avec le FOS qui stimule certaines populations bactériennes. Avec le blé entier en revanche, le nombre des cellules était identique au témoin. Des études restent à mener afin d'identifier les populations bactériennes modifiées par les différentes alternatives et leur effet sur la muqueuse intestinale.

Remerciements

Ces travaux ont été financés en partie par le programme Européen Poultryflorgut (2005-2008).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Catala-Gregori P., Mallet S., Travel A., Lessire M., 2007. Septièmes Journées de la Recherche Avicole Tours : 202-206.
- Deplancke B. & Gaskins H. R. 2001, Am. J. Clin. Nutr., 7(suppl.) 1113S-1141S
- Engberg R. M., Hedemann M. S., Steenfeldt S., Jensen B. B., 2004. Poult. Sci., 83:925-938
- Forder R. E. A., Howarth G. S., Tivey D. R. & Hughes R. J., 2007. Poult. Sci., 86:2396-2403.
- Gabriel I., Mallet S., Leconte M., Fort G., Naciri M., 2003. Poult. Sci., 82: 1668-1676.

- Gabriel I., Pissavin C., Williams J., Mallet S., Beven V., Burel C., Leconte M., Rideaud P., Moreau-Vauzelle C., Dupont C., Fravallo P., Lessire M., 2008, 6th INRA-RRI Symposium on Gut Microbiome, Clermont-Ferrand (France), 81-82.
- Goodlad R.A., Levi S., Lee C.Y., Mandir N., Hodgson H., Wright N.A., 1991. Gastroenterology 101, 1235-1241.
- Jamroz D., Wertelecki T., Houszka M., & Kamel C., 2006. J. of An. Physiol. and An. Nut., 90: 255-268.
- Kandori H., Hirayama K., Takeda M. & Doi K., 1996. Exp. Anim. 45: 155-160.
- Piel C., Montagne L., Sève B., & Lallès J-P., 2005. J. Nutr. 135: 86-91.
- Sharma R., Fernandez F., Hinton M., & Schumacher U., 1997. CMLS 53: 935-942.
- Thomke S. & Elwinger, K., 1998. Ann. Zootech., 47: 85-97.
- Uni Z. Smirnov A. & Sklan D., 2003. Poult. Sci., 82: 320-327.
- Xu Z. R., Hu C. H., Xia X. A., Zhan X. A. & Wang, M. Q., 2003. Poult. Sci., 82: 1030-1036.
- Williams J., Mallet S., Leconte M., Lessire M. & Gabriel I., 2008. B. Poult. Sci., 49 (3):329-339

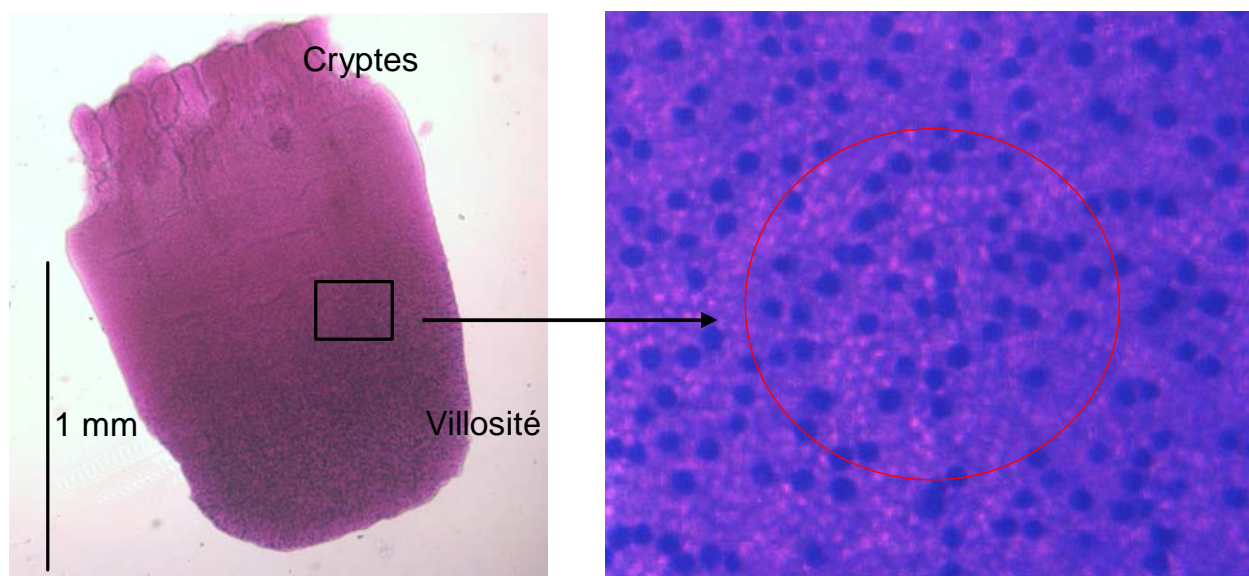


Figure 1 : Villosité et cryptes de Lieberkühn isolés par microdissection après coloration au Bleu Alcian et Acide Periodique-Schiff. Les cellules à mucus apparaissent en bleu violacé à la surface des villosités et sont comptées dans le cercle rouge d'une surface de 0.007 mm².

Tableau 1. Paramètres histomorphologiques du jéjunum de poulets de chair à 21 j d'âge

	Régime				P
	Témoin Négatif	Témoin Positif Avilamycine	FOS	Graines Entières	
<i>Paramètres histologiques du jejunum¹</i>					
Hauteur villosités (mm)	1,006 ± 0,09 ^a	0,984 ± 0,06 ^{ab}	0,931 ± 0,14 ^{abc}	0,893 ± 0,11 ^c	0,0082
Surface villosités (mm ²)	0,796 ± 0,127 ^{ab}	0,787 ± 0,133 ^a	0,709 ± 0,225 ^{ab}	0,658 ± 0,139 ^b	0,0367
Prof. cryptes (mm)	0,124 ± 0,01 ^a	0,106 ± 0,01 ^b	0,111 ± 0,01 ^b	0,113 ± 0,01 ^b	<0,0001
Rapport H. vill/ P. crypt.	8,12 ± 0,75 ^{bc}	9,29 ± 0,84 ^a	8,43 ± 1,35 ^{bc}	7,90 ± 0,91 ^c	0,0004
Cellules à mucus cell/mm ²)	7748 ± 1546 ^b	6627 ± 979 ^b	8937 ± 1872 ^a	7319 ± 1116 ^b	0,0001

¹: moyenne ± écart type de 18 animaux par régime

a, b, c : les moyennes avec des lettres différentes sont statistiquement différentes (p<0.05)