



**HAL**  
open science

# Effets d'une supplémentation en Spiruline et en Chlorelle sur la croissance et la santé digestive du porcelet au sevrage

Hauteclaire Furbeyre

► **To cite this version:**

Hauteclaire Furbeyre. Effets d'une supplémentation en Spiruline et en Chlorelle sur la croissance et la santé digestive du porcelet au sevrage. Biologie végétale. Agrocampus Ouest, 2017. Français. NNT : 2017NSARB295 . tel-01661454

**HAL Id: tel-01661454**

**<https://theses.hal.science/tel-01661454v1>**

Submitted on 12 Dec 2017

**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.

# AGRO CAMPUS

---

## OUEST

**Hauteclaire FURBEYRE • 28 mars 2017**

Thèse AGROCAMPUS OUEST  
sous le label de l'Université de Bretagne Loire  
pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR D'AGROCAMPUS OUEST**  
Spécialité Biologie et Agronomie

ÉCOLE DOCTORALE • Vie - Agro - Santé (VAS)

LABORATOIRE D'ACCUEIL • UMR INRA / AGROCAMPUS OUEST  
Physiologie, environnement et génétique pour l'animal et les  
systèmes d'élevage (PEGASE)

## Effets d'une supplémentation en Spiruline et en Chlorelle sur la croissance et la santé digestive du porcelet au sevrage

**Lucile MONTAGNE**

Professeure, AGROCAMPUS OUEST, UMR INRA-AO PEGASE / *présidente*

**Isabelle OSWALD**

Directrice de recherche, UMR 1331 ToxAlim, Toulouse / *rapporteuse*

**Catherine BELLOC**

Maître de conférences, INRA/Oniris, UMR BioEpAr, Nantes / *rapporteuse*

**Isabelle LURON**

Directrice de recherche, INRA, UMR NMC / *examinatrice*

**Mustapha BERRI**

Ingénieur de recherche, INRA, UMR ISP, Nouzilly / *examineur*

**Jaap VAN MILGEN**

Ingénieur de recherche, UMR INRA - AO PEGASE / *directeur de thèse*

.....  
**Thierry MENER**

Responsable de service, Cooperl Arc Atlantique, Plestan / *membre invité*

**Etienne LABUSSIÈRE**

Chargé de recherche, UMR INRA-AO PEGASE / *membre invité*



## **REMERCIEMENTS**

Alors voilà, on y est ! Trois ans de rires, de joie et quelques soupçons de larmes condensés entre les pages de ce manuscrit. Trois ans qui ont défilé à la vitesse de la lumière... S'il y a bien une chose donc je suis certaine, c'est que ces trois années ne seraient pas passées aussi vite sans vous tous, collègues, amis, famille, à mes côtés pendant la réalisation de cette thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement Jaap, Thierry et Mathieu pour avoir accepté de partager avec moi cette aventure. J'ajoute bien évidemment un remerciement spécial à Etienne, pour non seulement m'avoir fait confiance, mais également pour m'avoir supporté au jour le jour pendant ces trois ans ! Merci pour tout ce que tu m'as enseigné au travers de tes connaissances, ton expérience, ta rigueur, ta précision et ta rapidité de réflexion qui m'a laissée plus d'une fois sans voix. Tu m'as appris dès mes premiers jours à l'INRA, qu'à toutes mes questions, il existait un unique verbe pour y répondre : « chercher ». Finalement, ça s'applique pour tout, y compris lorsqu'il s'agit de connaître les derniers potins de l'INRA. J'ai pu développer mon sens critique, à la fois sur le plan scientifique mais aussi sur le plan social...! J'ai découvert que « le/la pénible » était un terme affectueux pour qualifier un(e) collègue entrant dans ton bureau. J'ai vite compris que lorsqu'on n'entendait pas ta voix résonner dans le labo, c'est que soit tu étais malade, soit tu préparais des corrections d'article salées. Je n'ai malheureusement pas réussi à appliquer rigoureusement le principe de précaution à chacune de tes affirmations... Mais j'ai bon espoir que Katia assure comme une chef !

Je remercie le service Nutrition de Cooperl Arc Atlantique pour avoir financé ce travail. Merci également à Barbara Clément-Larosière du service Dénitral de Cooperl, pour m'avoir apporté son œil de « spécialiste des microalgues » et m'avoir conseillé lorsque j'en avais besoin.

Merci à Ronan Pierre, Catherine Belloc, Isabelle Luron et Pierre-Yves Rescan pour avoir fait partie de mon comité de thèse et avoir aiguillé ce travail.

Merci à Lucile Montagne, Isabelle Oswald, Catherine Belloc, Mustapha Berri et Isabelle Luron pour avoir accepté de participer à l'évaluation de ce travail en tant que président de jury, rapporteurs ou examinateurs.





Ce travail de thèse n'aurait jamais abouti sans l'aide des animaliers de Saint-Gilles qui ont participé à l'élaboration et la réalisation des essais. Merci à Georges et à Jean-François qui ont réalisé l'ensemble des régimes expérimentaux utilisés dans les essais. Merci à Patrick et Henri, qui ont supporté ma bonne, mais aussi ma mauvaise humeur au bâtiment 11 ! Merci à Vincent et Régis qui ont pris en main l'essai digestibilité au bâtiment métabolisme pendant que je courrais partout à la recherche de mon « organisation » ! Merci également à Vincent pour les nombreux lyophs, étuves, pesées et broyages d'aliment, de microalgues ou de fèces pour les expés. Enfin, j'accorde un énorme merci à l'équipe de choc qui a participé dans la bonne humeur au gavage/pesage quotidien de mes petits cochons en maternité/post-sevrage, dans le désordre et avec des répétitions, mais vous le méritez bien : Daniel, Yannick, Fabien, Hervé, Josselin, Etienne, Vincent, Georges, Patrick, Henri et la petite participation d'Emmanuel à son premier jour de stage ! Un merci tout particulier à ceux qui sont venus, avec le sourire, à Noël et au jour de l'an pour ces gavages, qui se reconnaîtront. Je garderai un souvenir impérissable d'un 31 décembre midi, à la salle de repos ! Merci à Maurice et Jérôme pour leur disponibilité et leur aide à l'abattage des animaux. Un grand merci également à l'ensemble des animaliers de l'UE PR qui ont participé à l'ambiance générale dans laquelle j'ai été baignée pendant ce travail.

Bon nombre de personnes au labo ont également participé, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail. Je commencerai par remercier Yolande et Alain, qui ont à leur actif un bon nombre de dosages d'azote, d'énergie, de matière grasse, de fibres, de titane et qui, en plus, ont répondu présent lorsque j'avais besoin d'eux pour dérouler des intestins et prélever des contenus digestifs à l'abattoir. Yolande, je suis certainement la dernière thésarde à te remercier avant ton départ à la retraite et je te souhaite donc plein de bonheur en te souhaitant de ne pas trop rêver de rapidN, de Koné ou de calorimètre ! Katia s'occupera bien de Katia en ton absence... Merci aux spécialistes de l'histologie, Sandra, Michèle et Armelle pour m'avoir accueilli dans vos labos respectifs de PEGASE et ex ADNC et appris toutes les techniques d'inclusion, coupe, coloration et analyse microscopique d'échantillons d'intestin. Merci à Sandra pour avoir validé mon aptitude à démarrer l'automate de déshydratation toute seule ! ☺ Je remercie Gaëlle Boudry et Alexis pour m'avoir aidé à la réalisation des chambres d'Ussing. Merci à Annie et Véronique pour leur aide dans la réalisation des PCR. Merci également à Thibaud pour les dosages d'AGV et de NH<sub>3</sub>. Enfin, je remercie l'ensemble du



personnel du labo que je n'ai pas cité, mais avec qui j'ai pu passer d'excellents moments pendant ces trois ans.

Un grand merci à l'équipe café du métabolisme, Henri, Marie-Hélène, Alain, Éric, Serge, Katia, David, Vincent et Etienne. Merci à Marie-Hélène pour tes délicieux gâteaux. Merci à Henri pour m'avoir offert de jolis schémas et de jolies photos pour décrire mon travail. Je remercie Serge pour m'avoir fait découvrir sa graaaaaaande famille. Merci pour les fous rires à en pleurer. Merci pour ce petit club à part, qui était une vraie soupape de sécurité dans les moments de pression et également une grande source de motivation, surtout certains midis de la semaine !

Je remercie également tous les thésards pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble pendant et en dehors de l'INRA, en particulier Katia, Nico, Alex, Auriane, Séverine, Sandy, Alice et Elise. Nico, merci pour m'avoir motivé à participer à une épreuve de cani-VTT en compétition pendant la thèse, un sport qui est devenu pour moi une passion! Alex, merci pour nos grands moments de discussion scientifiques et philosophiques lors de nos pauses. Merci pour ton soutien et ta contribution à mes prises de tête statistiques ! Un grand merci à Marion, avec qui j'ai passé des grands moments de rigolade, à la fois à Saint-Gilles mais aussi à Médréac, au téléphone et sur ma boîte mail ☺

Merci à Léon, Lardon, Copain... Et tous les autres cochons ayant participé à l'écriture de ce manuscrit... Merci à ceux qui m'ont donné du fil à retordre, je vous accorde un pardon posthume.

Merci à ma mère, ma sœur, mon frère pour avoir supporté ma faible disponibilité pendant ces trois années. Merci aux copines pour être toujours là, pour les moments de décompression en dehors du travail. Merci à Leila, tu m'as apporté beaucoup de soutien et d'encouragement pendant nos ballades champêtres. Enfin, merci à toi, Chou, pour avoir subi mes crises de rire mais aussi mes crises de larme, mes joies, mais aussi mes doutes. Tu as été un soutien sans faille pendant cette belle expérience.



# PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

## Articles scientifiques

### Publication 1 :

Furbeyre, H., J. van Milgen, T. Mener, M. Gloaguen et E. Labussière. 2017. Effects of dietary supplementation with freshwater microalgae on growth performance, nutrient digestibility and gut health in weaned piglets. *Animal* 11:183-192

### Publication 2 :

Furbeyre, H., J. van Milgen, T. Mener, M. Gloaguen et E. Labussière. Dietary supplementation with Spirulina and Chlorella does not promote growth and intestinal health in piglets weaned under poor sanitary conditions. *En préparation*

### Publication 3 :

Furbeyre, H., J. van Milgen, T. Mener, M. Gloaguen et E. Labussière. Effects of oral supplementation with Spirulina and Chlorella on growth and digestive health in piglets around weaning. *Soumis à Journal of Animal Science*

## Communications scientifiques

### Communication 1 :

Furbeyre, H., J. van Milgen, T. Mener, M. Gloaguen et E. Labussière. Effects of dietary supplementation with Spirulina and Chlorella on growth performance, nutrient digestibility and gut health of weaned piglets. Communication orale au 13<sup>th</sup> Symposium of Digestive Physiology in Pigs, 19-20-21 mai 2015, Kliczkow, Pologne

### Communication 2 :

Furbeyre, H., J. van Milgen, T. Mener, M. Gloaguen et E. Labussière. 2016. Effet de la supplémentation en Chlorelle et Spiruline sur les performances de croissance et la santé digestive du porcelet sevré. Communication orale aux 48<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche Porcine, 2-3 février 2016, Paris, France



## **TABLES DES MATIERES**

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>13</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>14</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>19</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>23</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>27</b>
<b>Chapitre 1 : Fonction et santé digestive du porcelet autour du sevrage.....</b>	<b>28</b>
A. Le système digestif à la naissance et à l'âge adulte .....	28
1. Morphologie et fonction digestive .....	28
2. Système immunitaire intestinal.....	29
a. Barrière physique .....	29
b. Tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale .....	29
c. Initiation des réponses immunitaires.....	30
d. Développement du système immunitaire chez le porcelet .....	32
3. Mise en place du microbiote digestif .....	33
B. Conséquences du sevrage sur le système digestif du porcelet.....	34
1. Ingestion et croissance .....	35
2. Intégrité de la structure intestinale.....	35
3. Fonction digestive.....	37
4. Réponse immunitaire et inflammatoire associée au sevrage .....	37
a. Activation de l'immunité innée et acquise.....	38
b. Induction de la réponse inflammatoire locale .....	39
c. Réponse immunitaire et statut oxydant .....	39
5. Impact du sevrage sur le microbiote digestif .....	40
6. Troubles digestifs en post-sevrage.....	40
a. Troubles digestifs liés au stress du sevrage.....	40
b. Troubles digestifs d'origine pathogène .....	41





7.	Facteurs et stratégies modulant la santé digestive au sevrage .....	42
a.	Rôle et utilisation des antibiotiques .....	42
b.	Impact de l'environnement sur la santé digestive au sevrage .....	43
c.	Impact de l'âge et du poids du porcelet au sevrage.....	44
d.	Stratégies alimentaires.....	45

**Chapitre 2 : Utilisation des microalgues (Chlorelle et Spiruline) en nutrition et santé animale ..... 47**

**A. Valeur nutritionnelle ..... 47**

**B. Action de la Spiruline et de la Chlorelle sur la santé de l'animal ..... 49**

1. Effets de la Spiruline et de la Chlorelle sur la stimulation du système immunitaire  
49

a. Effet de la Spiruline et de la Chlorelle sur les cellules de l'immunité..... 49

b. Mécanismes d'action de la Spiruline et de la Chlorelle sur les cellules de l'immunité..... 50

c. Implications pour la défense de l'hôte aux microorganismes pathogènes ..... 52

2. Effets de la Spiruline et de la Chlorelle sur le stress oxydant et l'inflammation... 52

a. Pouvoir antioxydant de la Spiruline et de la Chlorelle..... 52

b. Effet de la Spiruline et de la Chlorelle sur la réponse inflammatoire ..... 54

c. Conséquences sur la santé de l'hôte ..... 55

3. Propriétés antimicrobiennes et action probiotique..... 55

a. Activité antimicrobienne ..... 55

b. Action prébiotique..... 56

**C. Impact de la méthode de production de la biomasse microalgale sur sa qualité nutritionnelle et fonctionnelle..... 57**

1. Conditions de culture ..... 57

2. Procédés de traitement et de conditionnement de la biomasse ..... 57

a. Séchage de la biomasse algale..... 57

b. Rupture de la paroi cellulaire ..... 58



<b>Chapitre 3 : Caractérisation de la santé digestive : approche méthodologique.....</b>	<b>61</b>
A. Identification des marqueurs de la santé digestive.....	<b>61</b>
1. Digestion et absorption des nutriments.....	61
a. Mesure de l'utilisation digestive <i>in vivo</i> .....	62
b. Analyse de l'activité enzymatique .....	63
c. Etude de la morphologie intestinale .....	64
2. Etude des fonctions de défense .....	64
a. La fonction de barrière .....	65
b. Mesure des réponses immunitaires et inflammatoires .....	67
3. Caractérisation des populations microbiennes commensales .....	67
4. Approche clinique des troubles digestifs chez le porc et chez l'homme .....	68
B. Modèles expérimentaux .....	<b>68</b>
5. Challenge infectieux .....	69
6. LPS.....	70
7. Challenge sanitaire.....	70
<b>OBJECTIFS DE THESE.....</b>	<b>72</b>
<b>TRAVAIL EXPERIMENTAL.....</b>	<b>76</b>
A. Stratégie expérimentale.....	<b>77</b>
1. Logement des animaux .....	77
2. Alimentation .....	78
B. Méthodes.....	<b>79</b>
1. Mesures en cours d'expérience .....	80
a. Ingestion et croissance .....	80
b. Digestibilité fécale des régimes expérimentaux .....	80
c. Signes cliniques de diarrhée .....	81
2. Analyses chimiques de l'aliment, des fèces et des urines.....	82
3. Calculs de digestibilité.....	83



4.	Mesures post-mortem.....	84
a.	Mesure de l'haptoglobine plasmatique .....	84
b.	Morphologie intestinale.....	84
c.	Perméabilité intestinale par la méthode des chambres d'Ussing (essai 2).....	85
d.	Expression des cytokines et des jonctions serrées par PCR en temps réel .....	86
5.	Analyses statistiques .....	88
	<b>Chapitre 1.....</b>	<b>91</b>
	<b>Effets d'une supplémentation en microalgues en post-sevrage sur les performances de croissance, la digestibilité des nutriments et la santé digestive du porcelet sevré .....</b>	<b>91</b>
	<b>A. Publication 1 : Effects of dietary supplementation with freshwater microalgae on growth performance, nutrient digestibility and gut health in weaned piglets .....</b>	<b>92</b>
	Abstract .....	93
	Introduction .....	93
	Materials and Methods .....	94
	Experimental design.....	94
	Measurements and sampling .....	94
	Laboratory analyses .....	96
	Calculations.....	96
	Statistical analyses .....	96
	Results .....	96
	Health status.....	98
	Effect of dietary supplementation with Chlorella and Spirulina on growth performance and gut health.....	100
	<b>B. Effets de la supplémentation en Spiruline et en Chlorelle sur l'expression des jonctions serrées et des cytokines pro-inflammatoires dans la muqueuse jéjunale et dans la plaque de Peyer iléale .....</b>	<b>103</b>
	<b>C. Effets de la supplémentation en Spiruline et en Chlorelle sur les fermentation microbiennes dans les contenus digestifs (caecum et colon) à 42 jours d'âge.....</b>	<b>104</b>
	<b>Chapitre 2.....</b>	<b>105</b>



<b>A. Publication 2 : Dietary supplementation with <i>Spirulina</i> and <i>Chlorella</i> does not promote growth and intestinal health in piglets weaned under poor sanitary conditions.....</b>	<b>106</b>
Abstract .....	107
Introduction .....	108
Materials and methods .....	109
Microalgae and processing.....	109
Animals and diets.....	110
Measurements and sampling .....	110
Laboratory analyses .....	112
Statistical methods .....	115
Results .....	115
Growth performance .....	115
Post-weaning diarrhoea.....	116
Plasma concentration of haptoglobin, intestinal morphology and barrier function..	116
Expression of cytokines and tight junction in intestine .....	117
Discussion .....	117
Growth and health status.....	117
Effects of <i>Spirulina</i> and <i>Chlorella</i> on growth and digestive health parameters.....	120
<b>B. Effets de la supplémentation en Spiruline et en Chlorelle sur les coefficients d'utilisation digestive de la MS et de l'azote chez le porcelet sevré à 32, 34, 36, 39 et 41 jours d'âge .....</b>	<b>126</b>
<b>Chapitre 3.....</b>	<b>127</b>
<b>Effet d'une administration orale en Spiruline et en Chlorelle en amont et en aval du sevrage sur la croissance et la santé digestive du porcelet.....</b>	<b>127</b>
<b>A. Publication 3 : Effects of oral supplementation with <i>Spirulina</i> and <i>Chlorella</i> on growth and digestive health in piglets around weaning.....</b>	<b>128</b>
Abstract .....	129





Introduction .....	130
Materials and methods .....	131
Microalgae and processing.....	132
Experimental design.....	132
Measurements and sampling.....	133
Laboratory analyses .....	134
Calculations.....	136
Statistical Methods.....	137
Results .....	138
Growth performance .....	138
Clinical signs of diarrhea .....	139
Acute phase protein in plasma .....	140
Intestinal morphology .....	140
Intestinal cytokine and tight junction mRNA expression .....	140
Discussion .....	141
Experimental validation .....	141
Effects of Spirulina and Chlorella on growth performance and post-weaning diarrhea .....	143
Long term effects of Spirulina and Chlorella on local inflammation and gut integrity in weaned piglets.....	146
<b>B. Effets d’une supplémentation en Spiruline et en Chlorelle en amont et en aval du sevrage sur la fonction digestive en post-sevrage .....</b>	<b>153</b>
<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>154</b>
<b>I. Modèles expérimentaux .....</b>	<b>156</b>
A. Conséquences du sevrage sur la croissance du porcelet, l’architecture de la muqueuse et l’inflammation au niveau intestinal .....	<b>156</b>
B. Effet d’une baisse de la température ambiante sur la croissance et les troubles digestifs en post-sevrage.....	<b>157</b>



C. Effet du challenge sanitaire sur la croissance et les troubles digestifs en post-sevrage..	160
D. Comparaison des performances de croissance entre les essais .....	162
<b>II.Effets de la supplémentation en Spiruline et en Chlorelle sur la croissance et la santé digestive du porcelet au sevrage .....</b>	<b>163</b>
A. Effets d'une supplémentation en Spiruline et en Chlorelle en post-sevrage sur la croissance et la santé digestive du porcelet .....	164
B. Effet du traitement technologique des microalgues sur la santé digestive du porcelet sevré.....	167
C. Effets d'une supplémentation en microalgues pendant la lactation sur les altérations précoces de la fonction et de la santé digestive induites par le sevrage .....	169
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>172</b>



## LISTE DES ABREVIATIONS

ADF : Acid Detergent Fiber  
ADL : Acid Detergent Lignin  
AGV : Acide gras volatil  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
ARN : Acide ribonucléique messenger  
EA : Efficacité alimentaire  
ETR : Ecart Type Résiduel  
GMQ : Gain Moyen Quotidien  
HRP : Horseradish Peroxydase  
Ig : Immunoglobuline  
IL-1 $\beta$  : Interleukine 1 beta  
IL-10 : Interleukine 10  
IL-6 : Interleukine 6  
IL-8 : Interleukine 8  
LPS : Lipopolysaccharide  
MM : Matière Minérale  
MS : Matière Sèche  
NDF : Neutral Detergent Fiber  
NH<sub>3</sub> : Ammoniac  
OCLN : Occludin  
PV : Poids vif  
RT : Reverse Transcription  
TLR : Toll Like Receptor  
TNF $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$   
TGF $\beta$  : Transforming Growth Factor  $\beta$   
ZO-1 : Zonula Occludens 1



# LISTE DES FIGURES

## Etude bibliographique

**Figure 1 :** Organisation du système immunitaire associé à la muqueuse intestinale

**Figure 2 :** Distribution des populations microbiennes commensales chez l'animal adulte

**Figure 3 :** Hauteur des villosités ( $\mu\text{m}$ ) et profondeur des cryptes intestinales ( $\mu\text{m}$ ) après le sevrage au niveau du duodénum (A), du jéjunum (B) et de l'iléon (C)

**Figure 4 :** Evolution des activités enzymatiques lactase, maltase et aminopeptidase dans le jéjunum (A) et l'iléon (B) chez le porcelet après le sevrage. D'après Boudry *et al.* (2004)

**Figure 5 :** Effets des cytokines pro-inflammatoires sur le système immunitaire et le métabolisme

**Figure 6 :** Morphologie de la Chlorelle.

**Figure 7 :** Morphologie de la Spiruline

**Figure 8 :** Schéma illustratif des voies mécanistiques de reconnaissance des polysaccharides issus des plantes supérieures, supposées impliquées dans l'activation des macrophages. D'après Schepetkin *et al.* (2006)

**Figure 9 :** Production en nitrite (représentatif de la production en dérivés réactifs de l'oxygène) par les macrophages issus de poulets supplémentés en Spiruline (*Spirulina platensis*) dans l'aliment (inclusion de 1 ou 2%), après stimulation ou non par l'ajout de LPS ( $1\mu\text{g/mL}$ ). D'après Al-Batshan *et al.* (2001)

**Figure 10 :** Schéma représentatif des récepteurs TLR (Toll Like Receptors) impliqués dans la reconnaissance des composés d'origine microbienne. D'après Akira *et al.* (2001)

**Figure 11 :** Effet de l'administration d'un extrait de Chlorelle sur le taux de survie après induction d'une infection à *E. coli* chez le rat.

**Figure 12 :** Voies d'activation du facteur NF- $\kappa$ B et mécanismes associés dans les cellules épithéliales intestinales (A) et dans les phagocytes (B)





**Figure 13 :** Influence du niveau d'azote apporté au milieu de culture sur la concentration en protéines et en lipides de la Spiruline (*Spirulina sp.*) et de la Chlorelle (*Chlorella sp.*).

**Figure 14 :** Niveaux de définition des paramètres de la fonction digestive, selon Pluske *et al.* (2007)

**Figure 15 :** Mesure de la digestibilité iléale par l'implantation d'une cannule. Exemple de la cannule simple. Selon Moughan et Miner-Williams (2013).

**Figure 16 :** Mesure de l'absorption des nutriments par la méthode des cathéters. Selon Knudsen *et al.* (2006)

**Figure 17 :** Voies de transport de molécules au travers de l'épithélium intestinal : (1) Transport par voie paracellulaire; (2) Transport par voie transcellulaire : (2a) médié par un transporteur, (2b) voie passive, (2c) endocytose médiée par un récepteur ; (3) efflux médié par un transporteur. D'après Balimane *et al.* (2000).

**Figure 18 :** Protéines de jonction des cellules épithéliales intestinales. D'après Suzuki (2013).

## **Objectifs de thèse**

**Figure 19 :** Déroulement des expériences réalisées au cours de la thèse.

## **Travail expérimental**

**Figure 20 :** Représentation graphique de la température ambiante souhaitée (Objectif) et de la température ambiante réelle mesurée dans les cellules au cours du challenge thermique à 32 jours d'âge (Essai 2).

**Figure 21 :** Approche méthodologique utilisée pour caractériser la croissance et la fonction digestive (\* uniquement mesuré dans l'essai 2)

**Figure 22 :** Collecte partielle des fèces à l'aide d'une poche de stomie fixée à l'arrière de l'animal.

**Figure 23 :** Coupes transversales de jéjunum (A) et d'iléon (B). Coloration hématoxyline/éosine.

**Figure 24 :** Coupe transversale de jéjunum.



**Figure 25 :** Photo et représentation schématique d'une chambre d'Ussing (Crédits photo : Henri Flageul)

**Figure 26 :** Retrait des couches musculaires de l'intestin (stripping) pour montage du tissu en chambre d'Ussing (Crédits photo : Henri Flageul)

## Chapitre 1

**Figure 1 :** Percentage of piglets in trial 1 that exhibited mild or severe diarrhoea during the first phase of the experiment, considering the maximal severity recorded since weaning.

**Figure 2 :** Expression relative en jonctions serrées Occludin and ZO-1 et en cytokines TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 (pro-inflammatoires) et IL-10 (anti-inflammatoires) dans la muqueuse jéjunale (A) et dans la plaque de Peyer (B) à 42 jours d'âge<sup>1,2</sup>.

## Chapitre 2

**Figure 1:** Evolution of maximal diarrhoea severity recorded in piglets from weaning to 42 days of age<sup>1</sup>

## Chapitre 3

**Figure 1.** Change in BW relative to the potential BW in control pigs (NC) and pigs supplemented with *Spirulina* (SP) or *Chlorella* (CV) during the 14 d after weaning.

**Figure 2.** Survival probability to diarrhea outcome in NC pigs and pigs supplemented with *Spirulina* (SP) or *Chlorella* (CV) during the 14 d after weaning.

## Discussion générale

**Figure 27 :** Evolution de l'énergie ingérée et du gain de poids en post-sevrage, exprimé en pourcentage de la valeur initiale au sevrage. Comparaison des résultats de l'essai 3 chez les animaux « témoin » avec la littérature (Burrin et Stoll, 2003).



**Figure 28 :** Evolution de la hauteur des villosités et de l'expression en TNF $\alpha$  dans le jéjunum après le sevrage, exprimé en pourcentage du niveau initial au sevrage. Comparaison entre la littérature et les résultats de l'essai 3 chez les animaux « témoin ».

**Figure 29 :** Evolution de la consommation d'aliment et de la proportion de diarrhées observées après le sevrage chez les animaux du groupe « témoin » au cours de l'essai 1 « croissance » (A ; conditions d'hygiène standard et chute de la température ambiante à 32 jours d'âge), de l'essai 2 (B ; conditions d'hygiène dégradée et chute de la température ambiante à 32 jours d'âge) et 3 (C ; conditions d'hygiène standard et température ambiante maintenue à 28°C).

**Figure 30 :** Consommation, gain moyen quotidien et efficacité alimentaire par individu entre 28 et 42 jours d'âge au cours de l'essai 1 « croissance » et de l'essai 2.

**Figure 31 :** Consommation alimentaire individuelle des porcelets du groupe « témoin » au cours des deux semaines post-sevrage dans l'essai 2, comparée aux restrictions alimentaires appliquées chez des porcelets conduits dans les mêmes installations en conditions d'hygiène dégradée (Le Floc'h *et al.*, 2006 ; Montagne *et al.*, 2012)

**Figure 32 :** Flux de FD4 et de HRP mesurés par la méthode des chambres d'Ussing au niveau de la muqueuse jéjunale de porcelets âgés de 42 jours.

**Figure 33 :** Relation entre la consommation et le GMQ par individu en post-sevrage (28-42 jours) au cours des essais 1 « croissance », 1 « digestibilité », 2 et 3.

**Figure 34 :** Effets de la Spiruline sur les paramètres de fonction et de santé digestive mesurés au cours des trois essais et hypothèses associées (flèches en pointillés).

**Figure 35 :** Effets de la Chlorelle sur les paramètres de fonction et de santé digestive mesurés au cours des trois essais et hypothèses associées (flèches en pointillés).

**Figure 36 :** Quantité de microalgues administrées quotidiennement en PS par rapport à la quantité d'aliment ingéré. Dans les essais 1 et 2, les microalgues étaient incluses à hauteur de 1 % dans l'aliment standard premier âge. Dans l'essai 3, les microalgues étaient administrées oralement à raison de 385 mg/kg de PV.

**Figure 37 :** Action synergique du LPS et du facteur TGF- $\beta$ 2 sur la sécrétion en IL-8 par les cellules épithéliales intestinales. La présence de LPS en faible quantité agit en association avec le facteur TGF- $\beta$ 2 pour promouvoir une synthèse modérée en IL-8,



stimulant la prolifération des cellules dans les cryptes intestinales. La présence de LPS en quantité élevée induit la production de fortes doses de IL-8, conduisant à l'inflammation. D'après Nguyen *et al.* (2014).





# LISTE DES TABLEAUX

## Etude bibliographique

**Tableau 1 :** Evolution des populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> après le sevrage

**Tableau 2 :** Composition nutritionnelle moyenne de la Spiruline et de la Chlorelle

**Tableau 3 :** Effets de la supplémentation en Spiruline sur la croissance, l'ingestion et l'efficacité alimentaire chez l'animal d'élevage (- : non renseigné)

**Tableau 4 :** Effets de la supplémentation en Chlorelle sur la croissance, l'ingestion et l'efficacité alimentaire chez l'animal d'élevage (- : non renseigné)

**Tableau 5 :** Effets de la supplémentation en Spiruline et Chlorelle sur l'activité des macrophages

**Tableau 6 :** Effets de la supplémentation en un extrait de Chlorelle riche en protéines (44,3% de la matière sèche) et en polysaccharides (39,5% de la matière sèche) sur la croissance bactérienne dans quelques modèles infectieux

**Tableau 7 :** Effets de la Spiruline et de la Chlorelle sur le statut oxydant et la réponse inflammatoire

**Tableau 8 :** Effets de la supplémentation en Spiruline et en Chlorelle sur les populations bactériennes commensales

**Tableau 9 :** Procédés de rupture de la paroi cellulaire : description, avantages et inconvénients

**Tableau 10 :** Méthodes de mesure de l'utilisation digestive chez le porc : avantages et inconvénients

**Tableau 11 :** Méthodes de mesure *in vivo* et *ex vivo* des transports de molécules au travers de l'épithélium intestinal

**Tableau 12 :** Paramètres immunitaires généralement mesurés lors de l'évaluation d'additifs au potentiel immunomodulateur

**Tableau 13 :** Exemples d'activités microbiennes « cible » et « à risque » pour la santé et les performances de croissance chez l'animal, selon Apajalahti et Kettunen (2006)



**Tableau 14 :** Description des barèmes utilisés pour l'évaluation de la consistance des fèces chez le porc et chez l'homme

## **Travail expérimental**

**Tableau 15 :** Composition des aliments utilisés pour la fabrication des régimes expérimentaux

**Tableau 16 :** Répartition des traitements expérimentaux au cours des essais 1, 2 et 3

**Tableau 17 :** Prélèvements ponctuels de fèces pour la mesure des coefficients d'utilisation digestive

**Tableau 18 :** Grille de notation de la consistance des fèces d'après les descriptions de Whelan *et al.* (2004) et Song *et al.* (2010)

**Tableau 19 :** Succession des bains de rinçage et de déshydratation des échantillons de jéjunum et d'iléon avant inclusion en paraffine et montage des coupes d'intestin sur lame. Méthodologie appliquée en vue de l'analyse morphométrique des villosités et des cryptes intestinales dans le jéjunum et l'iléon.

**Tableau 20 :** Succession des bains pour la coloration hématoxyline et éosine des coupes d'intestin, en vue de l'analyse morphométrique des villosités et des cryptes intestinales dans le jéjunum et l'iléon.

**Tableau 21 :** Identification des gènes analysés par PCR en temps réel

## **Chapitre 1**

**Table 1.** Composition of experimental diets

**Table 2.** Effect of dietary supplementation with *Spirulina* and *Chlorella* on BW, average daily feed intake (ADFI), average daily gain (ADG), and gain:feed (G:F) ratio in weaned piglets (trial 1)

**Table 3.** Effect of dietary supplementation with *Spirulina* and *Chlorella* on diarrhea incidence in weaned piglets

**Table 4.** Effect of dietary supplementation with *Spirulina* and *Chlorella* on total tract digestibility in weaned piglets from 28 to 42 days of age (trial 2)



**Table 5.** Effect of dietary supplementation with *Spirulina* and *Chlorella* on total tract digestibility in weaned piglets from 28 to 42 days of age (trial 2)

**Tableau 6 :** Effet de la supplémentation en Spiruline et en Chlorelle sur la concentration totale en AGV, sur les proportions molaires des AGV et sur la concentration en NH<sub>3</sub> dans les contenus du caecum et du colon des porcelets à 42 jours d'âge

## Chapitre 2

**Table 1.** Composition of experimental diets

**Table 2.** Oligonucleotide sequences used for real time PCR

**Table 3.** Effects of dietary supplementation with *Spirulina* and *Chlorella* on growth performance in weaned pigs

**Table 4.** Effects of dietary supplementation with *Spirulina* and *Chlorella* on diarrhoea incidence in weaned pigs

**Table 5.** Effects of dietary supplementation with *Spirulina* and *Chlorella* on intestinal morphology, barrier function in jejunum, and acute phase protein in plasma in pigs at 42 days of age

**Table 6.** Effects of dietary supplementation with *Spirulina* and *Chlorella* on cytokine expression in pigs at 14 days post-weaning

**Tableau 7 :** Effets de la supplémentation en Spiruline et en Chlorelle sur les coefficients d'utilisation digestive de la MS et de l'azote à 32, 34, 36, 39 et 41 jours d'âge chez le porcelet sevré

## Chapitre 3

**Table 1.** Composition of standard weaner diet

**Table 2.** Oligonucleotide sequences designed for the quantification of intestinal cytokines and tight junctions

**Table 3.** Effects of oral administration of *Spirulina* and *Chlorella* on growth performance in piglets around weaning



**Table 4.** Effects of oral administration of *Spirulina* and *Chlorella* on diarrhea incidence and prevalence during the post-weaning period in piglets

**Table 5.** Effects of oral administration of *Spirulina* and *Chlorella* on plasma haptoglobin concentration and on intestinal morphology of piglets around weaning<sup>1</sup>

**Table 6.** Effects of oral administration of *Spirulina* and *Chlorella* on intestinal expression of cytokines in piglets around weaning

**Table 7.** Effects of oral administration of *Spirulina* and *Chlorella* on intestinal expression of cytokines in piglets 14 d after weaning

**Tableau 8.** Effets de la supplémentation en Spiruline et en Chlorelle sur les coefficients de digestibilité de la MS, de l'azote, de l'énergie et de la MM chez le porcelet à 34, 37 et 41 jours d'âge

## **Discussion générale**

**Tableau 22 :** Comparaison des performances de croissance et des paramètres de santé entre les animaux affectés au traitement témoin des trois essais





## INTRODUCTION GENERALE



Le sevrage est une étape critique au cours de laquelle les porcelets subissent simultanément la séparation de la mère, un changement d'environnement et une transition abrupte d'un aliment essentiellement lacté à un aliment exclusivement solide. Cette étape stressante à la fois physiquement et psychologiquement provoque une déstabilisation des fonctions de digestion et de défense conduisant à un ralentissement de la croissance et à l'apparition de troubles digestifs (Lallès *et al.*, 2007). La suppression des facteurs immuns apportés par le lait de la mère et la perturbation de la fonction digestive rendent propice le développement de colonies bactériennes potentiellement pathogènes dans le tractus gastro-intestinal (Hopwood et Hampson, 2003). Le porcelet sevré fait donc face à une susceptibilité accrue au développement d'infections entériques, voire systémiques, pouvant conduire à la mort (Anses, 2014). Le recours aux antibiotiques pour lutter contre les pathologies digestives en post-sevrage est souvent indispensable en élevage porcin (89% des élevages concernés ; Hémonic *et al.*, 2014).

L'utilisation d'antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire est devenue un enjeu de santé publique majeur depuis l'émergence de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques. En particulier, la résistance bactérienne aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> génération constitue une préoccupation première pour la santé de l'homme (Anses, 2016). Afin de limiter les risques associées à l'antibiorésistance, la supplémentation en antibiotiques dans l'aliment des animaux d'élevage a été progressivement, puis totalement interdite en Europe en 2006 (Commission Européenne, 2005). Depuis 2012, le plan national Eco Antibio 2017 prévoit la réduction de 25% de l'utilisation des antibiotiques en cinq ans (Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt, 2012). Cette orientation implique la remise en question des pratiques utilisées jusqu'alors pour maintenir la santé des animaux. Les stratégies d'élevage et d'alimentation, telles que la maîtrise d'un niveau sanitaire élevé ou la restriction alimentaire, permettent de limiter le risque d'apparition de troubles digestifs en post-sevrage (Lallès *et al.*, 2004). Le maintien de la santé digestive peut également être favorisé par l'utilisation d'additifs alimentaires dits « fonctionnels ». Ces additifs se définissent comme *des ingrédients alternatifs à l'utilisation d'antibiotiques ou de traitements chimiques en élevage, capables de stimuler adéquatement les défenses locales, d'orienter favorablement le microbiote digestif, mais également de favoriser la digestion et l'absorption des nutriments* (Domeneghini *et al.*, 2006). Ils constituent une voie d'investigation en développement constant depuis plusieurs années, qui est à la fois complexe et diversifiée (de Lange *et al.*, 2010).

Les ressources d'origine aquatique font l'objet d'un intérêt grandissant pour l'élaboration de produits capables de promouvoir la santé de l'Homme et de l'animal. Les algues sont des



organismes comprenant une multitude d'espèces extrêmement diverses en termes de formes, de taille et de composition. Dans leur milieu naturel, elles ont acquis la capacité à s'adapter à des environnements parfois extrêmes, tels que l'irradiation, la salinité ou la température (Plaza *et al.*, 2009). Elles produisent donc une grande variété de métabolites biologiquement actifs, absents chez les organismes terrestres (Plaza *et al.*, 2009). La Spiruline et la Chlorelle sont respectivement une cyanobactérie et une algue unicellulaire cultivées et commercialisées à l'échelle mondiale pour leur richesse en protéines, vitamines et minéraux, qui leur confèrent une forte valeur nutritionnelle (Gershwin et Belay, 2007 ; Liu et Hu, 2013). Elles ont également été très largement référencées dans des études *in vitro* et *in vivo* pour leurs propriétés d'intérêt pour promouvoir la santé humaine et soigner certaines pathologies (Spolaore *et al.*, 2006 ; Gershwin et Belay, 2007). Leur potentiel d'action sur la santé des animaux d'élevage est cependant encore peu exploré. En particulier, la Spiruline et la Chlorelle sont reconnues pour posséder des propriétés antioxydantes, immunomodulatrices, prébiotiques et anti-microbiennes, qui pourraient constituer des leviers d'action pour favoriser la santé digestive du porcelet au sevrage.

Ce travail de thèse a été élaboré afin d'étudier le potentiel d'une supplémentation en Spiruline ou en Chlorelle pour promouvoir la santé digestive du porcelet au sevrage. Un premier objectif a consisté à définir les effets d'une supplémentation en Spiruline ou en Chlorelle chez le porcelet au cours des deux premières semaines suivant le sevrage sur les indicateurs de la croissance et de la santé digestive. Afin de répondre à cet objectif, deux essais ont été construits afin d'évaluer le potentiel des deux microalgues chez des animaux soumis à une perturbation de la santé digestive au sevrage, exacerbée ou non par des conditions sanitaires dégradées.

Certaines microalgues, dont la Chlorelle, possèdent une paroi cellulaire rigide et hautement résistantes à la dégradation et sont par conséquent faiblement digestibles par l'animal (Janczyk, 2006 ; Safi *et al.*, 2014a). Par ailleurs, les traitements technologiques habituellement utilisés pour sécher la biomasse algale favorisent la dégradation de certains métabolites d'intérêt pour la santé (Molina Grima *et al.*, 2003). Le second objectif de ce travail a donc été d'évaluer si un traitement technologique des microalgues, permettant la rupture de la paroi cellulaire et la préservation des constituants intracellulaires thermosensibles, impactait leur capacité à promouvoir la santé digestive du porcelet sevré.

Enfin, le sevrage induit une altération aiguë de l'homéostasie du système digestif dès les premiers jours, conduisant rapidement et transitoirement à une inflammation locale et une altération de la structure de l'intestin (Pluske *et al.*, 1997 ; Pié *et al.*, 2004). L'anorexie du



porcelet dans les premiers jours post-sevrage pourrait limiter l'action des molécules antioxydantes et immunomodulatrices sur le maintien de la santé digestive au cours de cette période. Le dernier objectif de ce travail a été de définir si une supplémentation en Spiruline ou en Chlorelle en amont et en aval du sevrage favoriserait le maintien de la santé digestive après le sevrage en modulant la réponse inflammatoire précoce induite par le stress du sevrage.

Ce mémoire de thèse se structure en quatre parties. Dans un premier temps, un état des lieux des connaissances est établi sur (1) la fonction et la santé digestive du porcelet au sevrage, (2) l'action des microalgues sur la nutrition et la santé de l'Homme et de l'animal et (3) la méthodologie appliquée à la caractérisation de la santé digestive du porcelet au sevrage. Les objectifs du travail de thèse et la stratégie expérimentale adoptée sont développés dans une deuxième partie. Ensuite, les résultats obtenus dans ce travail sont présentés sous la forme de trois articles. L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail sont enfin discutés dans une quatrième et dernière partie et mènent à l'établissement d'une conclusion générale et de perspectives d'investigation.





## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



## Chapitre 1 : Fonction et santé digestive du porcelet autour du sevrage

### A. Le système digestif à la naissance et à l'âge adulte

Le système digestif possède des fonctions multiples. Les intestins sont les sites principaux d'hydrolyse et d'absorption des nutriments apportés par l'alimentation (Lallès *et al.*, 2004). Ils sont également l'interface entre le milieu extérieur et l'organisme du porc et présentent un rôle de barrière sélective contre les microorganismes offensifs (Lallès *et al.*, 2007). Le développement du tractus digestif de la naissance à l'âge adulte permet l'installation progressive d'une balance entre les fonctions de digestion et les fonctions de protection de l'organisme par des mécanismes de défense non spécifiques (barrière physique, immunité innée) et spécifiques (immunité acquise).

#### 1. Morphologie et fonction digestive

La mise en place globale du tube digestif sur le plan de sa compartimentation, de son architecture et de ses mécanismes s'effectue au cours de la gestation, permettant d'assurer sa fonction de digestion dès lors que le porcelet naît (Miller et Slade, 2003). L'intestin, dès la naissance, est composé de villosités recouvertes d'un épithélium intestinal fonctionnel, capable d'assurer le transport des nutriments présents dans la lumière intestinale vers la circulation sanguine de l'hôte (Miller et Slade, 2003). La prise de colostrum au cours des premières heures de vie induit un développement rapide de l'intestin. Son poids total est augmenté de 75% au cours des 24 heures suivant la naissance (83,3 g vs. 47,4 g ; Zhang *et al.*, 1997) et 96% de la prise de poids de l'intestin est liée au développement de la muqueuse intestinale (66,6 vs. 32,0 g ; Zhang *et al.*, 1997). La longueur, la circonférence et la taille des villosités de l'intestin augmentent au cours des premiers jours suivant la naissance et induisent une extension de la surface d'absorption des nutriments (Xu *et al.*, 1992 ; Zhang *et al.*, 1997). Le colostrum stimule la prolifération des entérocytes et la maturation de l'intestin par l'apport de facteurs de croissance (Zhang *et al.*, 1997). Il favorise également l'absorption des nutriments et des électrolytes dans l'intestin (Zhang *et al.*, 1997). La croissance de l'intestin après la naissance favorise le maintien ou l'augmentation de sa capacité à hydrolyser le lactose et à capter la majorité des nutriments (Buddington, 1994 ; Zhang *et al.*, 1997). Les longues et étroites villosités intestinales (718  $\mu\text{m}$  ; Cera *et al.*, 1988) qui composent l'intestin à la naissance, stimulées par le passage de nutriments dans la lumière intestinale, raccourcissent et s'élargissent progressivement pendant la période d'allaitement (527  $\mu\text{m}$  ; Cera *et al.*, 1988). La présence d'enzymes et de transporteurs spécifiques à des sources

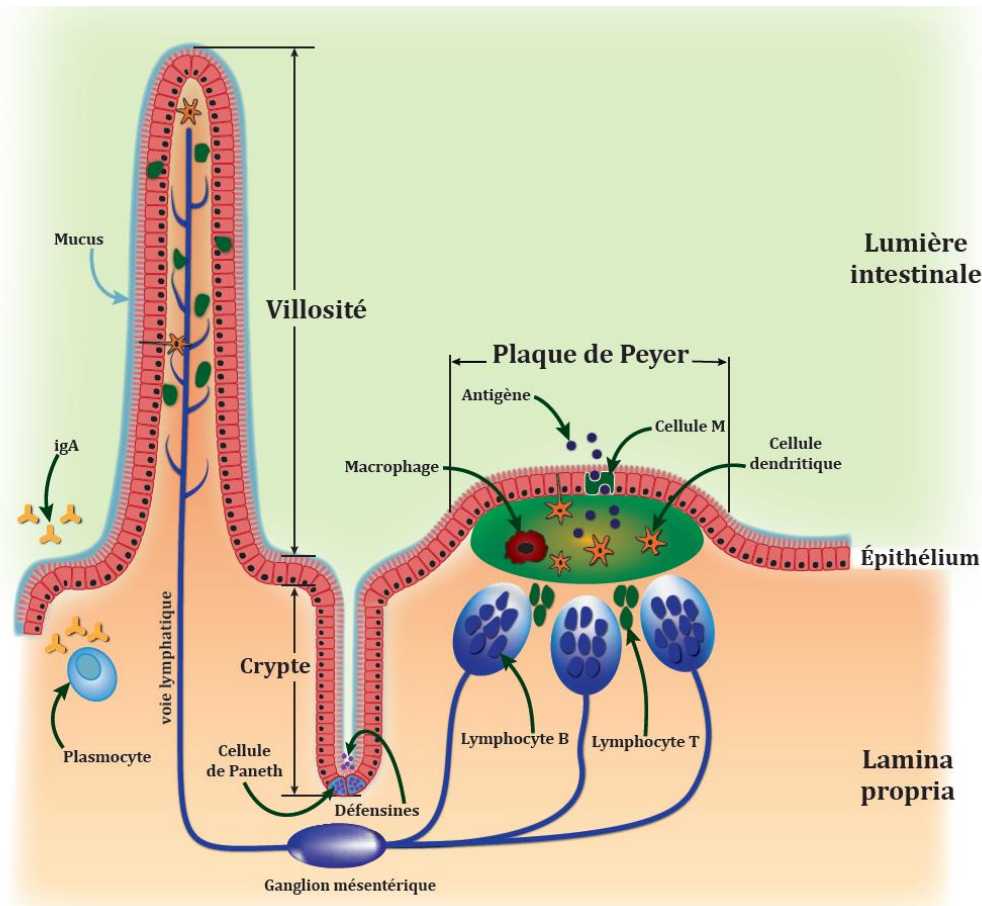


Figure 1 : Organisation du système immunitaire associé à la muqueuse intestinale (© Henri Flageul)

Le tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale est divisé en deux structures : une structure organisée (plaques de Peyer, ganglions méésentériques) et une structure diffuse (cellules immunitaires réparties le long de l'intestin, dans l'épithélium et la lamina propria). Dans les plaques de Peyer se trouvent des lymphocytes B maintenus dans des follicules et des lymphocytes T dans la zone intrafolliculaire. La plaque de Peyer est surmontée d'un épithélium dépourvu de mucus, dans lequel se trouvent des cellules spécialisées dans l'échantillonnage d'antigènes luminaux (cellules M). Sous l'épithélium (région subépithéliale), sont rassemblées les cellules de l'immunité innée (macrophages, cellules dendritiques majoritairement). La différenciation des lymphocytes B et T en plasmocytes et en lymphocytes T  $CD4^+$  et  $CD8^+$  s'effectue après activation par les cellules présentatrices de l'antigène (cellules dendritiques) après migration par la voie lymphatique vers les ganglions méésentériques. Le long de l'intestin, dans les villosités et dans les cryptes, se trouvent les cellules de l'immunité innée (macrophages, cellules dendritiques) plasmocytes producteurs d'IgA, les lymphocytes T  $CD4^+$  (essentiellement dans la lamina propria) et T  $CD8^+$  (essentiellement dans l'épithélium).

alternatives de glucides présents dans l'alimentation de l'animal adulte (sucrose, maltose, fructose) apparaît rapidement après la naissance, conférant au jeune une capacité à s'adapter à une alimentation autre que le lait de la mère (Buddington, 1994 ; Zhang *et al.*, 1997). Toutefois, ces enzymes et transporteurs restent présents en quantité réduite et limitent la capacité du jeune à moduler ses fonctions digestives en réponse à une nouvelle composition alimentaire (Buddington, 1994 ; Zhang *et al.*, 1997).

## 2. Système immunitaire intestinal

### *a. Barrière physique*

L'intestin est doté d'une barrière physique lui apportant une protection primaire contre les microorganismes pathogènes. Les cellules composant l'épithélium intestinal sont maintenues de proche en proche par des jonctions intercellulaires, dont des jonctions serrées, qui assurent un passage sélectif des molécules présentes dans la lumière intestinale (Fukatsu et Kudsk, 2011). L'épithélium intestinal est couvert d'un ensemble de protéines appelées mucines, sécrétées par les cellules épithéliales en gobelet (King *et al.*, 2003). Les mucines forment un gel en surface de la muqueuse intestinale, riche en défensines, produites par les cellules épithéliales et les cellules de Paneth dans les cryptes (Figure 1), et autres molécules antibactériennes (lysozymes, lactoferrine) qui luttent contre l'adhésion des bactéries aux cellules intestinales (Pasparakis, 2009 ; Fukatsu et Kudsk, 2011).

### *b. Tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale*

Au-delà de la barrière physique, la protection de l'hôte contre les microorganismes pathogènes présents dans la lumière intestinale est assurée par une population de cellules immunitaires réparties le long de l'intestin, chargées de la reconnaissance des antigènes offensifs et inoffensifs et de la lutte contre la colonisation de l'hôte. Les cellules immunitaires présentes dans la muqueuse intestinale sont regroupées sous le terme de tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale (GALT = Gut Associated Lymphoid Tissue). Ce tissu lymphoïde se divise en deux structures (Figure 1) : une structure diffuse, composée de cellules lymphoïdes réparties au sein de l'épithélium intestinal et dans la lamina propria (tissu conjonctif subépithélial), et une structure organisée sous forme de follicules lymphoïdes, parmi lesquelles se distinguent les plaques de Peyer, situées sous l'épithélium intestinal, ainsi que les ganglions mésentériques (Stokes *et al.*, 1994 ; Forchielli et Walker, 2005).



Les plaques de Peyer sont distribuées le long du jéjunum et de l'iléon proximal au nombre de 25 à 35 plaques, tandis qu'une unique plaque, large et continue tapisse l'iléon distal (Stokes *et al.*, 1994). Chez l'animal mature, les plaques de Peyer sont des structures macroscopiques présentes dans la muqueuse intestinale, dans lesquelles se trouvent de multiples follicules renfermant des lymphocytes B et une zone interfolliculaire riche en lymphocytes T (Figure 1) (Cebra *et al.*, 1998). L'épithélium surmontant les plaques de Peyer est pauvre en enzymes digestives et en microvillosités. Il contient 20 à 30% de cellules M dépourvues de mucus, spécialisées dans l'échantillonnage du contenu luminal et assurant la translocation des antigènes par endocytose ou transcytose vers les cellules de l'immunité innée (cellules dendritiques, macrophages, granulocytes) et les lymphocytes T régulateurs, présents dans la région subépithéliale du dôme de la plaque de Peyer (Figure 1) (Stokes *et al.*, 1994 ; King *et al.*, 2003 ; Mowat, 2003). Les cellules dendritiques présentes dans la région subépithéliale possèdent également la capacité d'infiltrer l'épithélium intestinal pour capter directement les antigènes présents dans la lumière intestinale, sans compromettre sa fonction de barrière (Forchielli et Walker, 2005). Hors des plaques de Peyer, les cellules lymphoïdes sont distribuées au sein de l'épithélium et de la lamina propria (Figure 1). Les lymphocytes intraépithéliaux, majoritairement des lymphocytes T cytotoxiques (T CD8<sup>+</sup>), jouent un rôle crucial dans l'immunosurveillance locale (Niewold, 2015). Il a été montré que les cellules épithéliales intestinales possédaient également la capacité de détecter les antigènes et d'initier ou de réguler les réponses immunitaires innées et acquises (Forchielli et Walker, 2005). Dans la lamina propria, les cellules dendritiques, les macrophages, les granulocytes et les lymphocytes assurent, au même titre que les structures lymphoïdes organisées, la mise en place de réponses immunitaires innées et acquises (Figure 1) (Forchielli et Walker, 2005).

### ***c. Initiation des réponses immunitaires***

Les cellules responsables de la « surveillance » et des mécanismes de l'immunité innée (entérocytes, lymphocytes intraépithéliaux, cellules dendritiques, macrophages) possèdent à leur surface membranaire des récepteurs appelés TLR (Toll Like Receptor), jouant un rôle majeur dans la reconnaissance bactérienne et dans la régulation des réponses immunitaires (Stokes *et al.*, 1994). Les TLR sont capables de différencier les molécules d'origine commensale (CAMP) et les molécules d'origine pathogène (PAMP) et d'assurer la modulation des réponses cellulaires par l'activation de facteurs spécifiques (NF-κB et MAPkinases notamment) responsables de l'induction de la réponse inflammatoire (Stokes *et al.*, 1994). Les TLR initient l'expression de cytokines et chemokines, jouant un rôle crucial





dans la communication entre les cellules de l'immunité (Stokes *et al.*, 1994). L'exposition des cellules intestinales à des bactéries commensales non pathogènes induit la synthèse de facteurs anti-inflammatoires par les cellules de l'immunité innée et de l'épithélium intestinal, dont le facteur de croissance transformant  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) et l'interleukine 10 (IL-10) (Mowat, 2003 ; Oswald, 2006). La présentation de l'antigène aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par les cellules dendritiques, favorise le développement de lymphocytes T régulateurs, produisant eux même TGF- $\beta$  et IL-10, contrôlant l'inflammation et assurant ainsi la tolérance et l'homéostasie du système immunitaire intestinal (Mowat, 2003 ; Renz *et al.*, 2012). L'exposition des cellules de l'épithélium intestinal à un antigène d'origine pathogène, induit la production de cytokines pro-inflammatoires, dont les interleukines 1  $\alpha$  et  $\beta$  (IL-1 $\alpha$  et  $\beta$ ), l'interleukine 6 (IL-6), l'interleukine 8 (IL-8) et le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), via la détection du pathogène par les TLR et l'activation du facteur NF- $\kappa$ B (Oswald, 2006 ; Renz *et al.*, 2012). La production de cytokines assure le recrutement des cellules immunitaires au lieu d'induction et le signalement du pathogène de proche en proche aux cellules épithéliales voisines (Forchielli et Walker, 2005 ; Oswald, 2006 ; Pasparakis, 2009). Les cellules de l'immunité innée représentent la première ligne de défense de l'hôte et développent une réponse rapide et non spécifique à la reconnaissance d'un pathogène, par divers mécanismes de lutte, dont la phagocytose et le relargage de molécules antimicrobiennes (Pasare et Medzhitov, 2004). Les cellules présentatrices de l'antigène (cellules dendritiques majoritairement) assurent l'induction des réponses immunitaires acquises, en acheminant l'antigène aux lymphocytes B ou T naïfs (Mowat, 2003). La présentation de l'antigène permet, en association avec le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II), la détection des microorganismes pathogènes par les lymphocytes B et T et consécutivement, leur amorçage. Cette seconde ligne de défense induit la mise en place d'une réponse spécifique de l'antigène (Pasare et Medzhitov, 2004). Les lymphocytes amorcés dans les plaques de Peyer rejoignent les ganglions mésentériques par la voie lymphatique, où ils subissent une étape de différenciation, puis sont redistribués sous leur forme active dans la muqueuse intestinale (Mowat, 2003). Les lymphocytes B activés, ou plasmocytes, produisent localement des anticorps spécifiques de l'antigène de type IgA, stockés dans la lamina propria ou exportés vers la lumière intestinale, permettant la neutralisation du pathogène (Cebra *et al.*, 1998 ; King *et al.*, 2003). Les lymphocytes T sont différenciés en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup>, qui migrent préférentiellement dans la lamina propria et dans l'épithélium, respectivement (Vega-López *et al.*, 1995 ; Mowat, 2003).



#### *d. Développement du système immunitaire chez le porcelet*

Chez le porcelet nouveau-né, la fonction immunitaire est assurée pendant les premières semaines de vie par l'apport de facteurs immuns, spécifiques et non spécifiques via le colostrum, puis le lait de la mère (King *et al.*, 2003 ; Stokes *et al.*, 2004). Au cours des 24 premières heures de vie, les macromolécules apportées par le colostrum, dont les immunoglobulines, sont captées par les entérocytes par pinocytose (Rooke et Bland, 2002). La perméabilité aux macromolécules au niveau du jéjunum est élevée pendant les deux premières semaines suivant la naissance et décroît graduellement jusqu'à la fin de la lactation (Le Huërou-Luron et Ferret-Bernard, 2015). Elle assure le passage d'aliment et d'antigènes bactériens, qui contribuent au développement du système immunitaire et l'acquisition de la tolérance aux antigènes alimentaires et microbiens (Le Huërou-Luron et Ferret-Bernard, 2015). Le porcelet nouveau-né ne possède que peu de lymphocytes au sein de la muqueuse intestinale, regroupés en clusters sans structure organisée (Stokes *et al.*, 2004). Le tissu lymphoïde associé au système digestif évolue progressivement après la naissance pour créer une structure effective et indépendante des apports immuns maternels, capable de reconnaître les antigènes offensifs et inoffensifs et d'assurer des réponses immunitaires adaptées (Stokes *et al.*, 1994).

Chez le porcelet, l'organisation structurale du tissu lymphoïde associé au tube digestif et les populations de cellules immunitaires dans la muqueuse intestinale se développent rapidement après la naissance, en réponse à l'exposition du tractus digestif à une multitude d'antigènes provenant de l'environnement (Stokes *et al.*, 1994 ; King *et al.*, 2003). Le nombre de cellules immunitaires présentes dans la lamina propria (cellules dendritiques, macrophages, cellules possédant le CMH II) augmente progressivement après la naissance et atteint le niveau adulte à cinq semaines d'âge (King *et al.*, 2003). Les plaques de Peyer dans le jéjunum et dans l'iléon s'allongent et s'élargissent rapidement de la naissance à 42 jours d'âge. Le nombre de plaques de Peyer dénombrées dans le jéjunum augmente après la naissance, de 10% à 42 jours d'âge et de 56% à 7 mois (14,7 vs. 16,2 et 23,0 respectivement ; Pabst *et al.*, 1988). Les lymphocytes B, quiescents à la naissance, acquièrent leur forme active après exposition du système digestif aux populations microbiennes commensales (Cebra *et al.*, 1998). Le nombre de plasmocytes producteurs d'IgA augmente rapidement, pour atteindre le niveau de l'adulte entre 6 et 28 jours d'âge (King *et al.*, 2003). Le nombre de lymphocytes T double au cours des cinq premières semaines d'âge dans la lamina propria et ces lymphocytes amorcent leur différenciation en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Vega-Lopez *et al.*, 2001 ; King *et al.*, 2003).



Toutefois, bien que les quantités de lymphocytes T augmentent progressivement dans la lamina propria et dans l'épithélium intestinal jusqu'à 7 semaines d'âge, le pool de lymphocytes T dans la muqueuse intestinale reste nettement inférieur au pool présent chez l'animal adulte (60% et 70% du pool de lymphocytes dans l'épithélium et la lamina propria iléaux, respectivement ; Vega-Lopez *et al.*, 2001). De plus, tandis que chez l'animal adulte, le ratio de lymphocytes CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> dans les tissus lymphoïdes est inférieur à 1, celui-ci est supérieur à 1 chez le porcelet âgé de quatre semaines (Spreeuwenberg *et al.*, 2001 ; King *et al.*, 2003). L'évolution post-natale des populations cellulaires liées à l'immunité dans la muqueuse intestinale suggère une réponse rapide du porcelet à la présence d'antigènes au sein du tractus digestif. Cependant, le profil quantitatif et qualitatif du système immunitaire associé à la muqueuse chez le porcelet au sevrage demeure éloigné du profil de l'animal adulte (King *et al.*, 2003).

### 3. Mise en place du microbiote digestif

Dès la naissance, le porcelet est exposé à une multitude de microorganismes provenant de l'environnement. L'ingestion de fèces maternelles favorise l'implantation d'une population microbienne au sein du tube digestif du porcelet (Hopwood et Hampson, 2003). Sa concentration augmente graduellement de la partie proximale à la partie distale de l'intestin (Sommer et Bäckhed, 2013). Après la naissance dominant lactobacilles, entérobactéries et streptocoques qui profitent du substrat lacté pour se développer (Hopwood et Hampson, 2003 ; Lallès *et al.*, 2007). La densité en populations microbiennes augmente rapidement après la naissance (Richards *et al.*, 2005). La colonisation de l'intestin par les populations de Lactobacilles est supposée jouer un rôle prépondérant dans le maintien d'une homéostasie microbienne dans le tube digestif du porcelet (Huang *et al.*, 2004 ; Konstantinov *et al.*, 2006). Les lactobacilles participent à la prévention des infections microbiennes, par des mécanismes de compétition à l'utilisation des nutriments *in situ* ou à l'attachement aux récepteurs de l'épithélium intestinal, et par des mécanismes de lutte via la production de facteurs antimicrobiens (Konstantinov *et al.*, 2006).

La diversification des nutriments ingérés, causée par l'apport d'une source alimentaire alternative au lait de la mère, de composition chimique complexe, est responsable d'une augmentation significative de la diversité des populations microbiennes commensales (Inoue *et al.*, 2005). La succession des populations microbiennes au cours du développement du porc entraîne l'établissement d'une communauté complexe et stable, contrôlant le développement des populations de microorganismes pathogènes par phénomène de compétition (Richards *et*

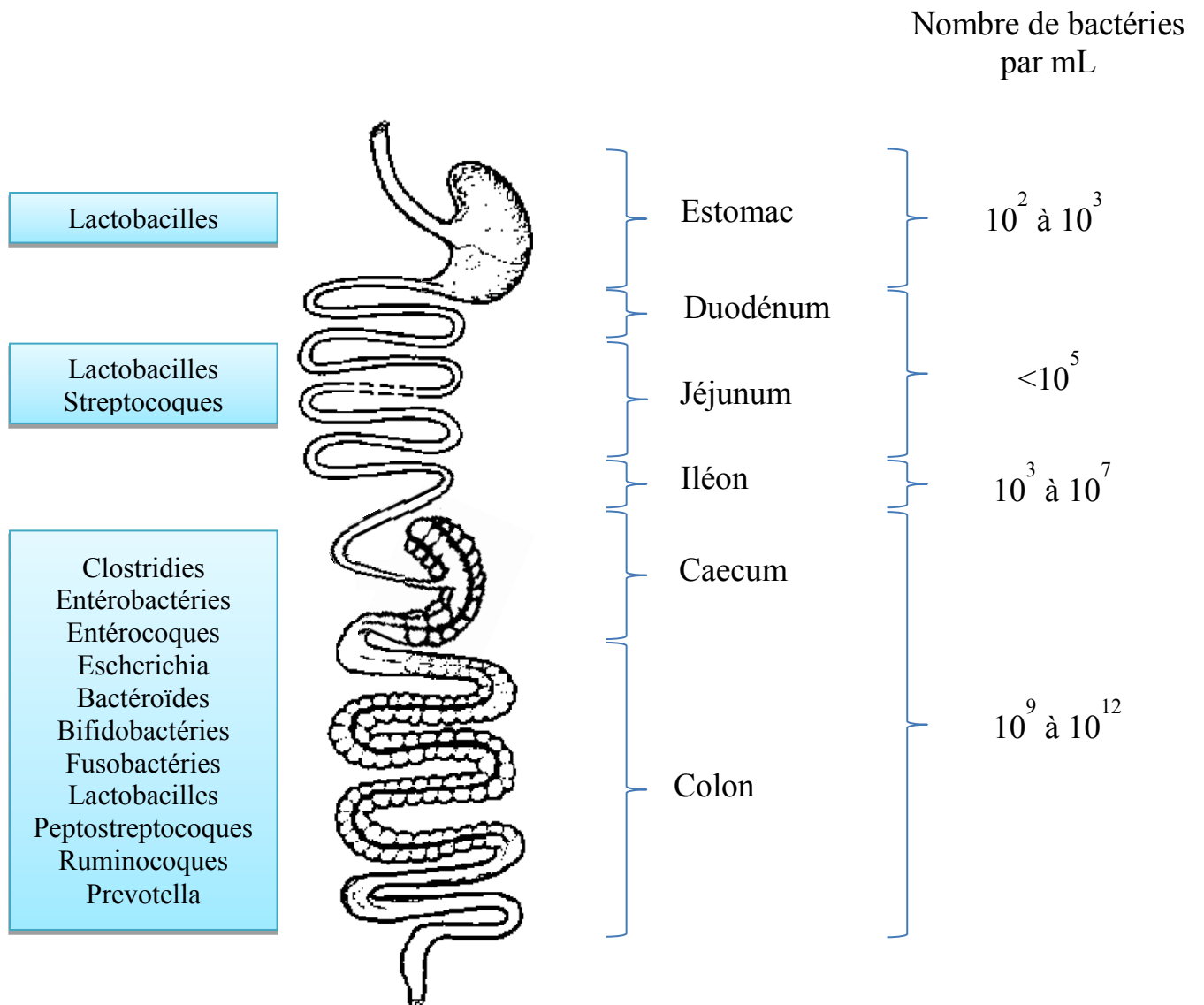


Figure 2 : Distribution des populations microbiennes commensales chez l'animal adulte

*al.*, 2005). La composition microbienne du tractus digestif chez l'animal adulte est difficile à caractériser, tant celle-ci est dépendante de la variabilité individuelle ou de la méthode d'analyse (Richards *et al.*, 2005). Chez le porc adulte, on retrouve majoritairement dans le tractus digestif les souches bactériennes *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium*, *Selenomonas*, *Clostridium*, *Butyrivibrio*, *Escherichia*, *Prevotella* et *Ruminococcus*, en concentrations plus importantes dans les sections distales de l'intestin (Figure 2) (Richards *et al.*, 2005 ; Mowat et Agace, 2014).

Au-delà de leur rôle de barrière contre la colonisation par les pathogènes, les populations microbiennes commensales jouent un rôle essentiel dans la maturation de l'intestin, tant en termes d'architecture qu'en termes de fonction, incluant les propriétés du mucus et la maturation des tissus lymphoïdes associés à la muqueuse intestinale (Lallès *et al.*, 2007 ; Sommer et Bäckhed, 2013). L'absence d'exposition aux microorganismes de l'environnement implique chez le jeune des plaques de Peyer intestinales réduites, une production d'IgA faible et des pools de lymphocytes T diminués (Bauer *et al.*, 2006). Bien que les mécanismes d'interaction entre les bactéries commensales et la muqueuse intestinale restent peu connus, les bactéries inoffensives pour l'hôte possèdent également un rôle majeur dans la régulation des réponses inflammatoires et dans la protection de l'épithélium intestinal (MacDonald et Monteleone, 2005).

## **B. Conséquences du sevrage sur le système digestif du porcelet**

En conditions naturelles, le sevrage s'installe progressivement entre 12 et 17 semaines (Mormède et Hay, 2003), tandis qu'en élevage commercial, les porcelets sont généralement sevrés subitement entre 3 et 4 semaines d'âge. Le porcelet, doté d'un système digestif immature (Lallès *et al.*, 2004), est soumis à de multiples stress au moment du sevrage, tels que la séparation de la mère, la manipulation, le changement d'environnement et la transition brusque d'une alimentation essentiellement liquide correspondant au lait maternel (environ 20% de matière sèche) à une alimentation exclusivement solide (environ 80-90% de matière sèche) (Brooks et Tsourgiannis, 2003 ; Campbell *et al.*, 2013). Le sevrage induit une phase d'adaptation du porcelet à son nouvel environnement, impliquant une modification des fonctions digestives et immunitaires au cours des deux semaines suivant le sevrage. Cette phase d'adaptation représente une période de fragilité et favorise l'apparition de troubles digestifs après le sevrage.



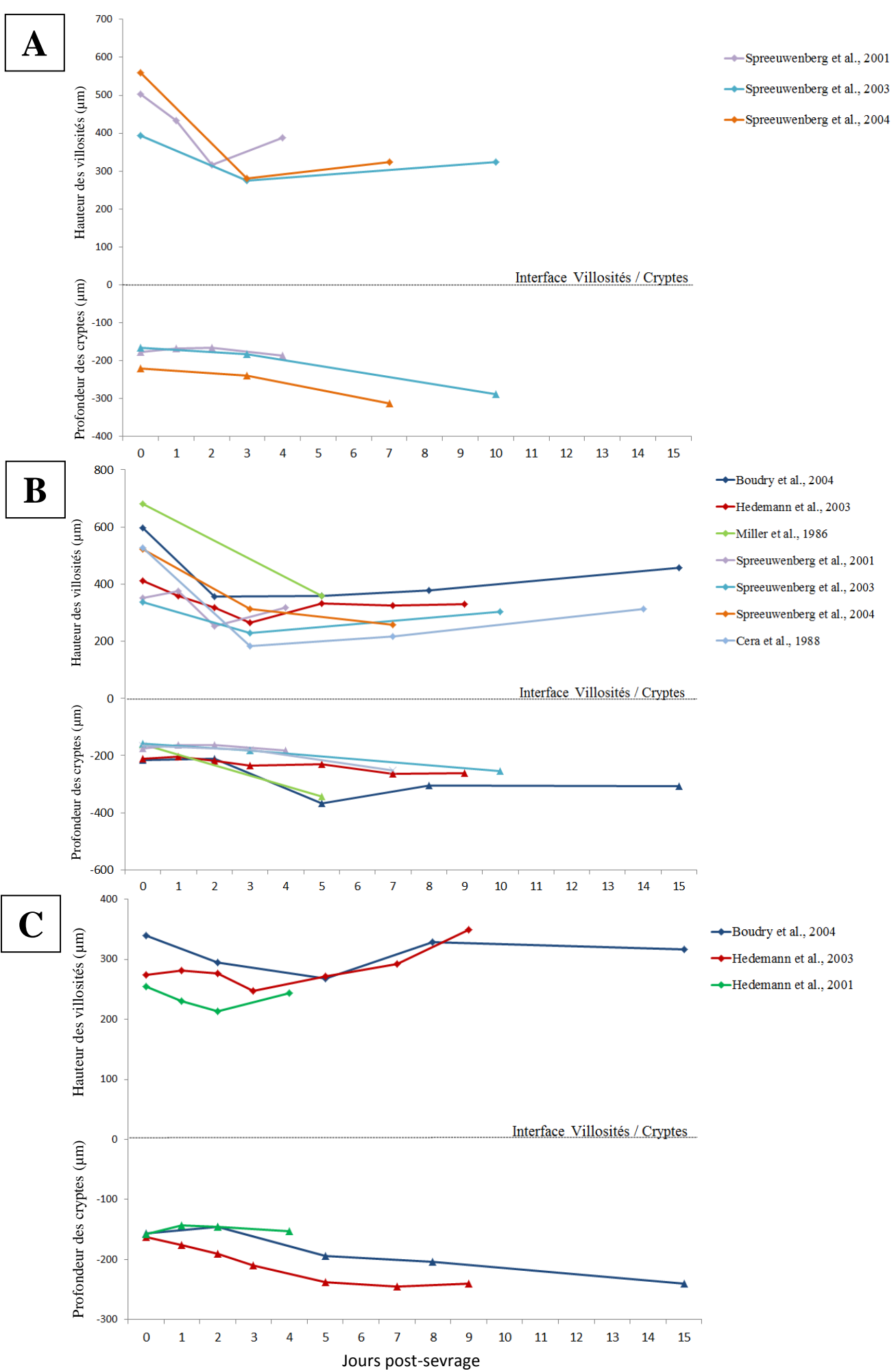


Figure 3 : Hauteur des villosités ( $\mu\text{m}$ ) et profondeur des cryptes intestinales ( $\mu\text{m}$ ) après le sevrage au niveau du duodénum (A), du jéjunum (B) et de l'iléon (C).

## 1. Ingestion et croissance

Lors du sevrage, le porcelet subit une transition soudaine d'une alimentation essentiellement lactée à une alimentation exclusivement solide. Cette transition est responsable d'une réduction de l'ingestion volontaire, voire d'une anorexie au cours des premiers jours suivant le sevrage (Campbell *et al.*, 2013). Bien que la majorité des porcelets consomment leur nouvel aliment dans les premières heures suivant le sevrage, il existe une grande variabilité individuelle et plus de 54 heures entre le sevrage et le premier repas sont observés chez certains porcelets (Brooks *et al.*, 2001). La quantité d'énergie ingérée par le porcelet ne recouvre ses besoins en énergie d'entretien que vers trois à quatre jours après le sevrage et la quantité d'énergie métabolisable ingérée au cours de la première semaine post-sevrage n'atteint que 60 à 70% de l'énergie métabolisable ingérée sous la mère (Le Dividich et Sève, 2000). La réduction de l'ingéré implique donc une incapacité à satisfaire pleinement les besoins nutritionnels du porcelet et a pour conséquence une baisse drastique de la croissance après le sevrage. La croissance observée au cours des premières semaines post-sevrage présente une variabilité importante entre les individus. La période post-sevrage est caractérisée par un ralentissement ou un arrêt de la croissance, voire une perte de poids (Whittemore et Green, 2001). En moyenne, les porcelets sevrés à quatre semaines d'âge présentent un gain de poids de 100 à 200 grammes par jour au cours des deux premières semaines post-sevrage (Armstrong et Clawson, 1980 ; Montagne *et al.*, 2012). En conditions d'élevage artificiel, il a été montré que les porcelets recevant un régime lacté ont la capacité d'atteindre un gain de poids supérieur à 500 grammes par jour à âge similaire (Hodge, 1974 ; Whittemore et Green, 2001). Au-delà de la baisse de croissance immédiatement après le sevrage, le défaut d'ingestion observé durant la première semaine suivant le sevrage affecte également le poids vif des porcelets à long terme (Geary et Brooks, 1998).

## 2. Intégrité de la structure intestinale

Le sevrage est responsable d'une diminution drastique du poids de l'intestin grêle de plus de 20% au cours des deux premiers jours suivants (Spreeuwenberg, 2002). Il est également caractérisé par une diminution significative de la hauteur des villosités intestinales (Miller *et al.*, 1986 ; Cera *et al.*, 1988 ; Nabuurs *et al.*, 1993 ; Pluske *et al.*, 1997 ; Spreeuwenberg *et al.*, 2001 ; Hedemann *et al.*, 2003 ; Miller et Slade, 2003 ; Owusu-Asiedu *et al.*, 2003 ; Vente-Spreeuwenberg *et al.*, 2003 ; Boudry *et al.*, 2004 ; Vente-Spreeuwenberg *et al.*, 2004). En moyenne, les villosités duodénales et jéjunales sont réduites de 40 à 65% de leur hauteur initiale avant le sevrage entre deux et cinq jours après le sevrage (Figure 3). Dans l'iléon,



l'impact du sevrage sur la structure de la muqueuse intestinale est moins marqué. La hauteur des villosités diminue de 10 à 20% de la hauteur initiale avant le sevrage entre deux et cinq jours post-sevrage (Figure 3). La hauteur des villosités augmente de nouveau après cinq jours pour se stabiliser à une hauteur avoisinant 70% de la hauteur initiale, entre huit et quinze jours après le sevrage (Figure 3) (Miller et Slade, 2003). La profondeur des cryptes est peu affectée au cours des premiers jours suivant le sevrage. L'élongation des cryptes démarre vers cinq jours après le sevrage et se stabilise à une profondeur correspondant à 150% de la profondeur des cryptes avant le sevrage (Figure 3).

La principale cause explicative de l'altération de la structure de la muqueuse intestinale est le non recouvrement des besoins nutritionnels du porcelet après le sevrage en conséquence de la baisse de l'ingéré (Brooks et Tsourgiannis, 2003). Boudry *et al.* (2004) ont montré une atrophie des villosités intestinales en lien avec la privation d'aliment pendant 48 heures après le sevrage. Il existe une relation positive entre le niveau d'ingestion et la hauteur des villosités intestinales (Brooks et Tsourgiannis, 2003) et il est suggéré qu'un apport continu de nutriments est nécessaire au maintien de la structure des villosités intestinales (Pluske *et al.*, 1996 ; Pluske *et al.*, 1997). Au-delà de l'aspect nutritionnel, Goldstein *et al.* (1985) ont également démontré l'importance de la stimulation luminale dans le maintien de la structure de la muqueuse intestinale. Il est donc suggéré que l'absence d'exposition de l'intestin aux particules alimentaires, causée par l'anorexie post-sevrage, contribuerait à l'atrophie villositaire (Spreeuwenberg *et al.*, 2001).

L'altération de la structure de la muqueuse intestinale pendant les premiers jours suivant le sevrage induit également une réduction de sa fonction de barrière. Plusieurs études *ex-vivo* ont mis en évidence une augmentation des transports paracellulaires au niveau jéjunal, au cours des quatre jours suivant le sevrage (Spreeuwenberg *et al.*, 2001 ; Verdonk *et al.*, 2001), ainsi qu'une réduction de la résistance transépithéliale, considérée comme représentative d'une augmentation de l'ouverture des jonctions serrées de l'épithélium intestinal et donc de la perméabilité paracellulaire (Wijten *et al.*, 2011). Boudry *et al.* (2004) suggèrent qu'une augmentation de la perméabilité paracellulaire pourrait contribuer à une augmentation du passage d'antigènes de la lumière intestinale vers la lamina propria. Le stress et l'anorexie post-sevrage sont considérés comme des facteurs contribuant à l'altération de la barrière intestinale (Wijten *et al.*, 2011). Il a également été suggéré que le retardement du sevrage (28 vs. 21 jours d'âge) favorise la maturation de l'intestin et limite les conséquences néfastes du sevrage sur sa fonction de barrière. De façon contradictoire, le sevrage entraîne une réduction des transports transcellulaires par endocytose entre deux et quinze jours post-

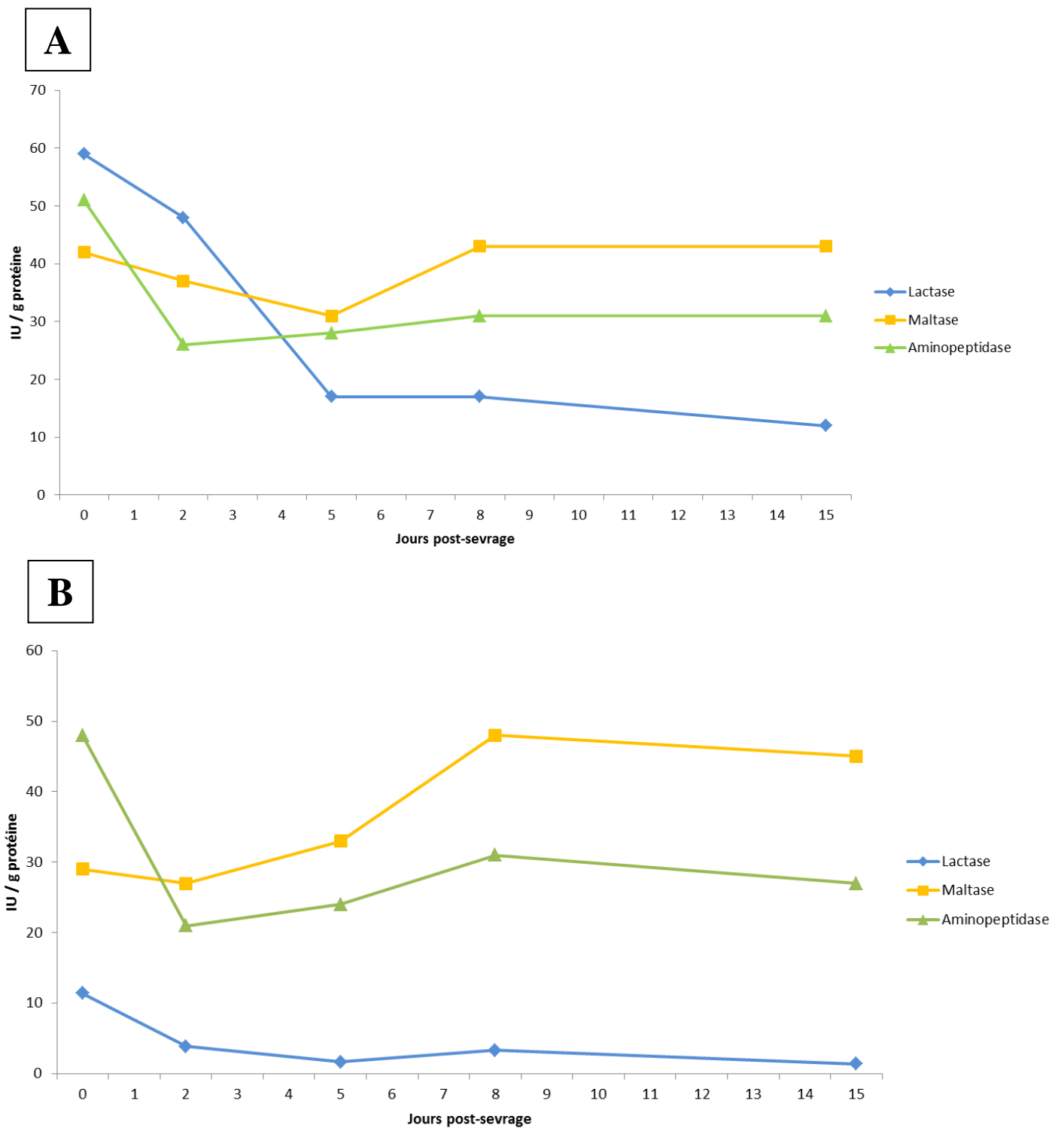


Figure 4 : Evolution des activités enzymatiques lactase, maltase et aminopeptidase dans le jéjunum (A) et l'iléon (B) chez le porcelet après le sevrage. D'après Boudry *et al.* (2004).

sevrage (Boudry *et al.*, 2004 ; Verdonk *et al.*, 2007). Selon Wijtten *et al.* (2011), la réduction de l'activité d'endocytose des cellules intestinales, représentative d'une réduction de la captation d'antigènes luminaux par les cellules épithéliales, permet de prévenir la surcharge en antigènes de l'hôte et de limiter l'induction excessive de réponses immunitaires associées à la présence d'antigènes.

### **3. Fonction digestive**

Le sevrage est associé à une réduction de l'activité des enzymes lactase, isomaltase, sucrase et aminopeptidase au niveau de l'épithélium intestinal (Figure 4) (Pluske *et al.*, 1997 ; Boudry *et al.*, 2004 ; Pié *et al.*, 2004). L'utilisation de marqueurs absorbés par voie active (exemple D-xylose) le long de la muqueuse a permis de mettre en évidence que la réduction de l'activité enzymatique était corrélée à une diminution de la capacité absorptive des entérocytes de l'épithélium intestinal (Miller *et al.*, 1984 ; Hampson et Smith, 1986 ; Miller *et al.*, 1986 ; Nabuurs *et al.*, 1994). Miller *et al.* (1986) ont également démontré que la diminution de l'activité enzymatique était associée à la perte d'entérocytes des villosités au niveau apical. Bien que la méthode utilisant des marqueurs de l'absorption *in vivo* soit controversée (Pluske *et al.*, 1997), il a été suggéré que la perte de fonction du système digestif après le sevrage était majoritairement causée par l'altération structurale de la muqueuse intestinale et la baisse d'activité enzymatique le long de la paroi intestinale après le sevrage (Miller *et al.*, 1986).

### **4. Réponse immunitaire et inflammatoire associée au sevrage**

En conditions naturelles, le sevrage apparaît comme une étape progressive et se déroule à un âge et un stade de maturité fonctionnelle et immunitaire plus avancés. Le sevrage conventionnel entre trois et quatre semaines d'âge prive brutalement le porcelet des apports immuns provenant du lait maternel ainsi que de diverses molécules bioactives, notamment le facteur TGF- $\beta$ , reconnu pour jouer un rôle prépondérant dans le maintien de l'intégrité de la muqueuse intestinale (King *et al.*, 2003). L'immaturité du système immunitaire du porcelet au sevrage (King *et al.*, 2003 ; Lallès *et al.*, 2004) est supposée responsable d'une incapacité à réguler les réponses immunitaires et inflammatoires aux antigènes d'origine alimentaire ou commensale, inoffensifs (Miller *et al.*, 1984). De plus, les faibles effectifs de lymphocytes dans l'épithélium et dans la lamina propria pourraient compromettre les défenses immunitaires contre les infections microbiennes (King *et al.*, 2003).

Tableau 1 : Evolution des populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> après le sevrage

Âge au sevrage	Site	Méthode de mesure	Effet du sevrage sur les populations de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup>	Effet du sevrage sur les populations de lymphocytes T CD8 <sup>+</sup>	Effet du sevrage sur le ratio T CD4 <sup>+</sup> / T CD8 <sup>+</sup>	Auteurs
21	jéjunum	Nombre / mm <sup>2</sup> villosités ou cryptes	Villosités et cryptes : Pas de différence significative 4 jours après le sevrage	Villosités et cryptes : Pas de différence significative 4 jours après le sevrage	-	Vega-López <i>et al.</i> , 1995
21	jéjunum	Nombre / 100 µm villosités ou cryptes	Villosités : Augmentation de l'effectif en T CD4 <sup>+</sup> à 2 et 7 jours après le sevrage (0,5 T CD4 <sup>+</sup> / 100 µm le jour du sevrage vs. 3 < T CD4 <sup>+</sup> / 100 µm à 2 et 7 jours) Cryptes : Augmentation de l'effectif en T CD4 <sup>+</sup> 7 jours après le sevrage	Villosités : Tendance à l'augmentation de l'effectif en T CD8 <sup>+</sup> 2 jours après le sevrage. Cryptes : Augmentation du nombre de lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> 2 jours après le sevrage.	-	McCracken <i>et al.</i> , 1999
26	jéjunum	Nombre / 10 <sup>6</sup> µm <sup>2</sup> cryptes	Cryptes : Le nombre de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> tend à diminuer 24h après le sevrage (125 vs. 216 T CD4 <sup>+</sup> / 10 <sup>6</sup> µm <sup>2</sup> )	Cryptes : Pas de différence significative	Diminution du ratio T CD4 <sup>+</sup> / T CD8 <sup>+</sup> 24 heures et deux jours post sevrage (1,1 et 1,4 respectivement vs. 2,2 au sevrage)	Spreeuwenberg <i>et al.</i> , 2001
28	jéjunum	Nombre / villosité ou crypte	Villosités : Augmentation du nombre de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> , 24 heures après le sevrage (8,7 vs. 2,8 au sevrage) Cryptes : Augmentation du nombre de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> , 24 heures après le sevrage (17,8 vs. 11,1 au sevrage)	Villosités et cryptes : Pas de différence significative	-	Pluske <i>et al.</i> , 1999

### *a. Activation de l'immunité innée et acquise*

Le sevrage entraîne une modification rapide du système immunitaire. Les pools de macrophages et granulocytes présents dans la lamina propria sont significativement augmentés en réponse au sevrage, suggérant une activation de l'immunité innée non spécifique (Vega-López *et al.*, 1995). Le sevrage est également associé à une augmentation des pools de lymphocytes (Vega-López *et al.*, 1995) et une modification des sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>, décrite dans de nombreuses études mais dont les réponses observées demeurent contradictoires (Tableau 1) ((McCracken *et al.*, 1999 ; Pluske *et al.*, 1999 ; Spreeuwenberg *et al.*, 2001). Ces contradictions peuvent s'expliquer partiellement par la méthode de quantification des populations de lymphocytes utilisée. Le sevrage serait associé à une augmentation du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans les villosités et dans les cryptes jéjunales entre 24 heures et sept jours suivant le sevrage (McCracken *et al.*, 1999 ; Pluske *et al.*, 1999). McCracken *et al.* (1999) observent également une augmentation du nombre de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans les villosités et les cryptes jéjunales deux jours après le sevrage. A l'inverse, Spreeuwenberg *et al.* (2001) ont décrit une diminution significative du ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> au niveau des cryptes jéjunales au cours des deux jours suivant le sevrage, qui s'explique par une réduction numérique du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et une augmentation numérique du pool de lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Les auteurs suggèrent que le niveau d'ingestion au cours des premiers jours suivant le sevrage contribue aux différences observées. En outre, Spreeuwenberg *et al.* (2001) ont montré une corrélation positive tendancielle entre le niveau d'ingestion et le nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mesuré ainsi que le ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> calculé. Les auteurs ont également mis en évidence une corrélation négative entre le nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> et la hauteur des villosités intestinales. L'ensemble des résultats obtenus par Spreeuwenberg *et al.* (2001) indiquent que l'anorexie consécutive au sevrage serait partiellement responsable de la diminution du ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> observé.

Deux hypothèses majeures sont évoquées pour expliquer l'activation du système immunitaire en réponse au sevrage. Premièrement, l'altération de la barrière intestinale consécutive au sevrage entraînerait une déstabilisation des interactions entre l'organisme et le contenu luminal, comprenant notamment les microorganismes et les produits de la dégradation microbienne, via le passage d'antigènes dans la lamina propria et induirait le développement d'une réponse immunitaire et inflammatoire (Spreeuwenberg *et al.*, 2001 ; King *et al.*, 2003 ; Boudry *et al.*, 2004). Deuxièmement, l'immaturation du système immunitaire du porcelet serait



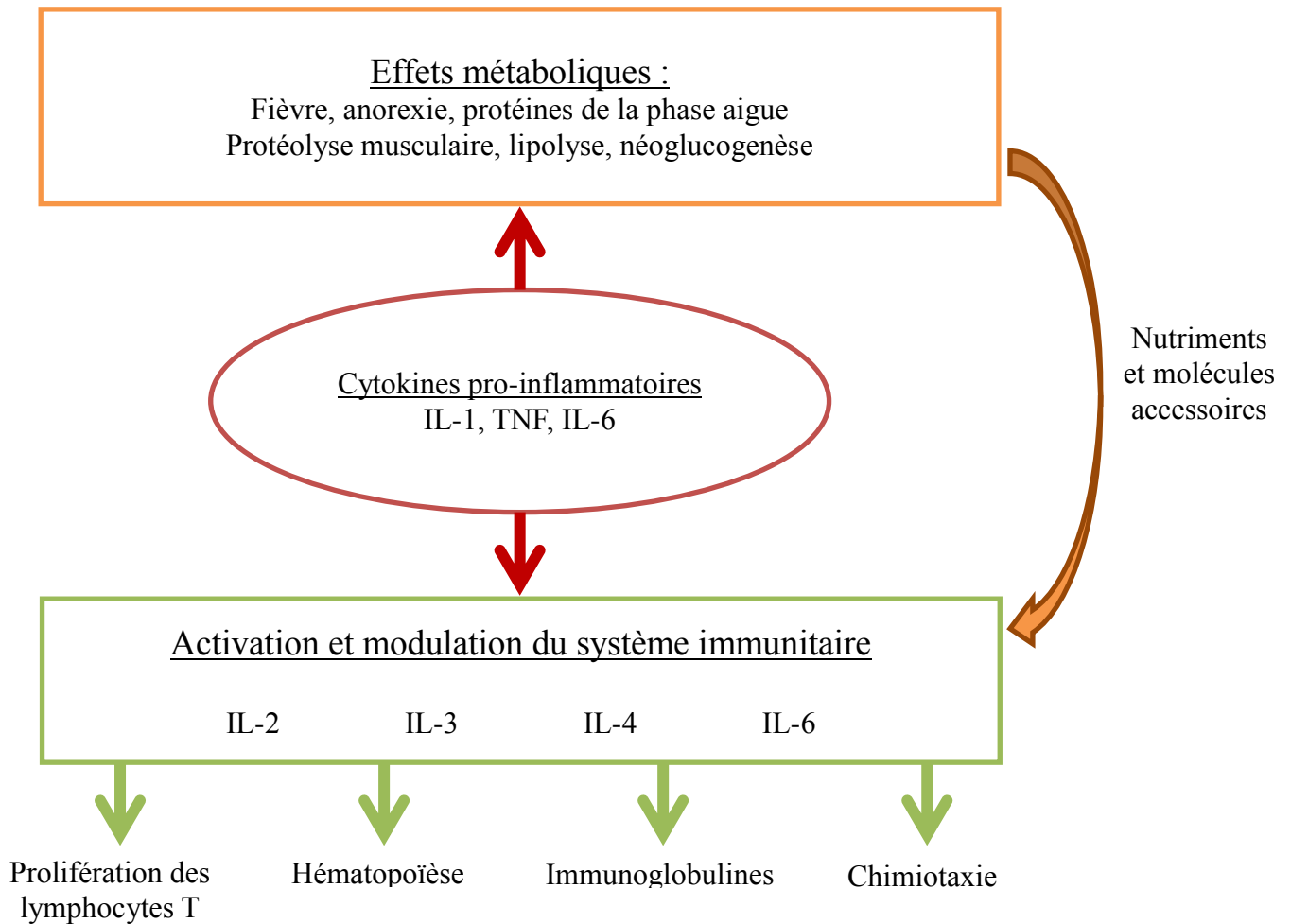


Figure 5 : Effets des cytokines pro-inflammatoires sur le système immunitaire et le métabolisme

responsable d'une incapacité à distinguer les antigènes inoffensifs des antigènes provenant de microorganismes pathogènes et impliquerait une incapacité à développer des réponses immunitaires adaptées (King *et al.*, 2003).

### ***b. Induction de la réponse inflammatoire locale***

La baisse de l'ingéré et la diminution du ratio  $CD4^+/CD8^+$  favoriserait la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, entre autres  $TNF\alpha$  et  $IFN\gamma$ , et la diminution de la synthèse de facteurs anti-inflammatoires IL-10 et  $TGF-\beta$  et contribuerait à l'apparition d'une inflammation locale dans l'intestin (McCracken *et al.*, 1999 ; Spreeuwenberg *et al.*, 2001). Le sevrage induit en effet une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires  $TNF\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6 dans l'intestin (Pié *et al.*, 2004). La réponse inflammatoire locale dans l'intestin est rapide mais suit différents patterns selon le site observé. L'expression des cytokines pro-inflammatoires  $TNF\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6 dans les sections proximales (duodénum, jéjunum) est maximale 24 heures après le sevrage tandis que les niveaux d'expression dans les sections distales (iléon, colon) présentent des niveaux d'expression maximaux deux jours après le sevrage, ou ultérieurement (Pié *et al.*, 2004). La stimulation de la réponse inflammatoire via la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, plus spécifiquement IL-1, IL-6 et  $TNF\alpha$ , favorise l'anorexie, ainsi que le catabolisme protéique et lipidique permettant de fournir un substrat nutritionnel au développement des réponses immunitaires (Figure 5) (Grimble, 1998). La production de cytokines pro-inflammatoires liée à la stimulation du système immunitaire contribue donc au ralentissement de la croissance associée au stress du sevrage (Le Floc'h *et al.*, 2006).

### ***c. Réponse immunitaire et statut oxydant***

L'activation du système immunitaire est responsable également de la production massive des molécules pro-oxydantes (composés réactifs de l'oxygène), produites notamment par les cellules de l'immunité innée réalisant la phagocytose (macrophages, monocytes, neutrophiles), qui ont pour rôle de détruire les pathogènes de l'organisme (Conner et Grisham, 1996). Immédiatement après le sevrage et jusqu'à deux semaines après le sevrage, la concentration sérique en dérivés réactifs de l'oxygène et en radicaux libres NO et  $H_2O_2$  est augmentée (Sauerwein *et al.*, 2007 ; Zhu *et al.*, 2012). En parallèle, le sevrage entraîne la réduction de l'expression et de l'activité des enzymes antioxydantes et l'augmentation du métabolisme en faveur de l'oxydation, favorisant le stress oxydant (Wang *et al.*, 2008 ; Zhu *et al.*, 2012). Les radicaux libres sont reconnus pour leur capacité à entraîner la destruction



cellulaire et pourraient donc contribuer à l'altération de la muqueuse intestinale après le sevrage (Zhu *et al.*, 2012).

## 5. Impact du sevrage sur le microbiote digestif

Au sevrage, la modification du régime alimentaire et la baisse d'ingestion consécutive altère le développement des populations microbiennes mises en place sous la mère (Hopwood et Hampson, 2003). L'application de stress multiples, tels que le changement d'environnement et les mélanges de porcelets provenant de portées distinctes, favorisent également l'altération des populations microbiennes au sevrage (Konstantinov *et al.*, 2006). Le nombre de bactéries du genre Lactobacilles dans le tractus digestif du porcelet, présentes en proportion majoritaire avant le sevrage, est significativement réduit après le sevrage (Konstantinov *et al.*, 2006). La malabsorption liée à la perte d'entérocytes dans l'épithélium intestinal et à la faible concentration en enzymes digestives après le sevrage conduit également à l'entrée de glucides non absorbés dans le gros intestin (van Beers-Schreurs *et al.*, 1992). Cette modification de substrat pour les populations microbiennes favorise le développement de bactéries saccharolytiques (*E. coli*, *Clostridia*) dans le colon (van Beers-Schreurs *et al.*, 1992). Les populations d'Entérobactéries (dont *E. coli*), sont en effet détectées en quantité anormalement haute immédiatement après le sevrage (Kenworthy et Crabb, 1963), induisant une réduction du ratio entre Lactobacilles et Entérobactéries (0,27 vs. 1,76 chez les porcelets sevrés et non sevrés, respectivement ; Castillo *et al.*, 2007). Le calcul du ratio Lactobacilles/Entérobactéries est un critère représentatif de la balance entre les bactéries bénéfiques et néfastes pour l'hôte (Castillo *et al.*, 2007 ; Montagne *et al.*, 2012). L'altération des populations de lactobacilles consécutive au sevrage est supposée impacter fondamentalement la protection de l'intestin contre les microorganismes pathogènes. Plus généralement, la déstabilisation du microbiote digestif après le sevrage altère le phénomène de compétition entre espèces microbiennes et favorise la colonisation du milieu par les microorganismes pathogènes (Stokes *et al.*, 2004 ; Lallès *et al.*, 2007).

## 6. Troubles digestifs en post-sevrage

### a. Troubles digestifs liés au stress du sevrage

Les troubles digestifs associés au sevrage sont responsables de l'apparition clinique de diarrhées chez le porcelet. La première cause d'apparition de diarrhées au sevrage est liée à la déstabilisation des fonctions de digestion et de défense précédemment décrites (Hopwood et Hampson, 2003). L'anorexie du porcelet et l'inflammation locale observée en réponse au



sevrage sont des facteurs contribuant à l'altération de la structure de la muqueuse intestinale et par conséquent, à la diminution de l'activité des enzymes digestives et à la réduction de la capacité d'absorption dans l'intestin (Pluske *et al.*, 1997 ; Pié *et al.*, 2004). Ce phénomène est d'autant plus important que le porcelet possède de prime abord une quantité limitée d'enzymes digestives et de transporteurs de nutriments adaptés à un régime alternatif au lait de la mère (Zhang *et al.*, 1997).

L'expression de cytokines pro-inflammatoires joue également un rôle dans la régulation de la fonction intestinale. La surexpression de TNF $\alpha$  est responsable d'une stimulation de la sécrétion d'ions Cl<sup>-</sup> (Kandil *et al.*, 1994). Boudry *et al.* (2004) suggèrent une augmentation des sécrétions d'électrolytes deux jours après le sevrage, en réponse à la présence de cytokines pro-inflammatoires chez le porcelet. Boudry *et al.* (2004) décrivent également une diminution de la capacité d'absorption dans la partie distale de l'intestin, deux jours après le sevrage et indiquent que les sécrétions d'électrolytes dans l'intestin induites par le sevrage pourraient excéder la capacité de réabsorption dans le colon et conduire à l'apparition de diarrhées. En parallèle, le développement de bactéries saccharolytiques (*E. coli*, *Clostridia*) dans les parties distales de l'intestin entraîne la production d'acide et d'amines *in situ*, responsables d'une irritation de la muqueuse intestinale (van Beers-Schreurs *et al.*, 1992). Cette production d'acide et d'amines par les bactéries induit une augmentation des sécrétions, une accélération de la vitesse de passage du contenu digestif et une augmentation de la pression osmotique luminale (van Beers-Schreurs *et al.*, 1992). Ces réactions sont responsables de l'apparition de diarrhées dites « osmotiques » (van Beers-Schreurs *et al.*, 1992).

#### ***b. Troubles digestifs d'origine pathogène***

Les altérations structurelles et fonctionnelles, la déstabilisation du microbiote digestif et l'affaiblissement des défenses de l'hôte causés par le sevrage favorisent la colonisation du tractus digestif par des bactéries pathogènes (Moeser *et al.*, 2007). Parallèlement, l'augmentation du temps de transit consécutif au sevrage, la présence de particules alimentaires non digérées et l'absence de l'immunité passive apportée par le lait de la mère apportent aux bactéries pathogènes un terrain favorable à leur implantation (Dixon, 1960 ; Hopwood et Hampson, 2003). Les troubles digestifs causés par les microorganismes d'origine pathogène immédiatement après le sevrage sont majoritairement causés par des bactéries de type *Escherichia coli* dites « entérotogènes », de par leur capacité à produire des entérotoxines offensives pour l'organisme (Hopwood et Hampson, 2003). Les troubles



digestifs causés par *E. coli* représentent 70 à 80% de la mortalité en post-sevrage (Madec *et al.*, 1998). Les souches *E. coli* pathogènes possèdent la capacité de s'attacher à l'épithélium intestinal afin d'échapper à son évacuation de l'organisme via le transit digestif. Les protéines d'adhésion les plus connues chez ces souches sont K88 et F18 (Hopwood et Hampson, 2003). La quantité de bactéries de souche *E. coli* augmente durant la première semaine suivant le sevrage, mais celle-ci n'est pas nécessairement corrélée à l'apparition de diarrhée puisque la majorité des souches sont inoffensives pour l'hôte (Hopwood et Hampson, 2003). Il est vraisemblable que des facteurs indépendants de la colonisation de l'hôte par des bactéries de type pathogène (génétique, statut immunitaire) ont également un rôle dans l'apparition des diarrhées. En l'occurrence, bien que la proportion de souches pathogènes soit généralement plus élevée chez les animaux atteints de diarrhée (Kenworthy et Crabb, 1963), la présence de souches *E. coli* pathogènes a également été décrite chez des individus indemnes de signes cliniques de diarrhées en post-sevrage (Kenworthy et Crabb, 1963 ; Kenworthy et Allen, 1966 ; Hampson *et al.*, 1985 ; Hinton *et al.*, 1985). Il a été mis en évidence que certains individus présentent une résistance d'ordre génétique à certaines souches *E. coli* pathogènes, par l'absence de récepteurs spécifiques à l'adhésion de ces souches au niveau de l'épithélium intestinal et donc un phénotype qui favorise l'élimination des bactéries pathogènes du tractus digestif (van Beers-Schreurs *et al.*, 1992 ; Madec *et al.*, 2000). Ces constats révèlent la complexité du développement des colibacilloses chez le porcelet en post-sevrage et la difficulté de détection des diarrhées induites par l'infection de l'hôte à des souches *E. coli* d'origine pathogène.

## **7. Facteurs et stratégies modulant la santé digestive au sevrage**

### ***a. Rôle et utilisation des antibiotiques***

La stratégie principale appliquée en élevage pour maintenir la santé digestive du porcelet est l'administration d'antibiotiques, majoritairement de type polymyxine, assurant la destruction des souches *E. coli* (Kaye et Chapman, 1963 ; Jeong *et al.*, 2009 ; De Briyne *et al.*, 2014). L'administration d'antibiotiques limite le risque de complication des diarrhées par la colonisation du tube digestif par les souches pathogènes. De nombreuses études utilisant des modèles d'infection par des souches *E. coli* pathogènes (souches K88, K99) chez le porcelet sevré ont mis en évidence une réduction des diarrhées et une augmentation de l'ingestion, de la croissance et de l'efficacité alimentaire en réponse à l'administration d'antibiotiques ciblés contre *E. coli* (Torrallardona *et al.*, 2003 ; Wu *et al.*, 2012). L'augmentation de la croissance chez les animaux recevant un traitement antibiotique est partiellement liée à une préservation





de la structure de la muqueuse intestinale, favorisant l'absorption des nutriments (Torrallardona *et al.*, 2003 ; Wu *et al.*, 2012). La destruction des bactéries de souche *E. coli* par les antibiotiques réduirait également le phénomène de compétition entre les populations bactériennes commensales et favoriserait le développement de souches bactériennes bénéfiques pour l'hôte, dont les Lactobacilles (Torrallardona *et al.*, 2003 ; Wu *et al.*, 2012). L'administration d'antibiotiques dans l'aliment du porcelet en post-sevrage est également reconnue pour favoriser la croissance, y compris en l'absence d'infection par des souches *E. coli* pathogènes (Wu *et al.*, 2012). Les mécanismes sous-jacents à la stimulation de la croissance par les antibiotiques restent mal connus, bien que quelques hypothèses soient émises. Il est notamment supposé que l'altération des populations microbiennes commensales par les antibiotiques limite la compétition nutritionnelle et pourrait augmenter la disponibilité des nutriments pour l'hôte (Wu *et al.*, 2012). Leur administration à faible dose dans l'alimentation des animaux d'élevage, en tant que facteur de croissance antimicrobien (« antimicrobial growth promoter ») a constitué une stratégie d'élevage pendant plusieurs décennies pour promouvoir la croissance des animaux (Anadón, 2006). L'émergence de souches bactériennes résistantes aux traitements antibiotiques a conduit à l'interdiction de l'utilisation systématique d'antibiotiques dans l'alimentation des animaux d'élevage par la Commission Européenne en 2006 (Commission Européenne, 2005). Dans ce contexte d'antibiorésistance, enjeu majeur pour la santé publique, le ministère de l'Agriculture a également mis en place en 2011 le Plan Eco Antibio 2017, visant à réduire de 25% en 5 ans l'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire (Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt, 2012). Cette mesure implique la nécessité de développer des méthodes alternatives à l'utilisation d'antibiotiques pour maintenir la santé des animaux en élevage (Seal *et al.*, 2013).

#### ***b. Impact de l'environnement sur la santé digestive au sevrage***

Le premier levier permettant de limiter les troubles digestifs induits par le sevrage concerne le respect de bonnes pratiques d'élevage (Sialelli, 2012). L'apparition de diarrhées en post-sevrage est extrêmement variable, non seulement individuellement mais également à l'échelle de l'élevage (Madec *et al.*, 1998). Plusieurs paramètres environnementaux jouent un rôle crucial dans le développement de troubles digestifs au sevrage (Madec *et al.*, 1998).



*- Hygiène du logement*

Le statut sanitaire du logement au sevrage joue un rôle considérable sur la croissance et le risque de troubles digestifs (Madec *et al.*, 1998). En outre, une hygiène basse favorise la réduction de la croissance et de l'ingestion des animaux en post-sevrage et l'apparition de diarrhées (Madec *et al.*, 1998 ; Montagne *et al.*, 2012). Montagne *et al.* (2012) suggèrent que la réduction de l'ingéré est causée au moins partiellement par l'induction d'une inflammation chronique chez les animaux élevés en conditions d'hygiène dégradée. Madec *et al.* (1998) supposent que la dégradation de l'hygiène pourrait également réduire la palatabilité de l'aliment et impacter le comportement alimentaire du porcelet.

*- Température*

Le stress du sevrage, lié au changement d'environnement, à la séparation de la mère et à la suppression de l'apport de lait, est suivi d'une période d'anorexie post-sevrage qui augmente la sensibilité du porcelet à des conditions environnementales inadaptées (Le Dividich et Herpin, 1994). Au cours de la première semaine suivant le sevrage, le porcelet nécessite une température ambiante maintenue entre 26 et 28°C (Le Dividich, 1981 ; Madec *et al.*, 2003). L'exposition chronique à des températures inférieures au seuil critique de 26°C après le sevrage favorise l'apparition de troubles digestifs (Le Dividich, 1981 ; Wathes *et al.*, 1989 ; Madec *et al.*, 2003). Les fluctuations continues de la température ambiante du logement en post-sevrage altèrent également les performances de croissance et favorisent l'apparition de diarrhée, tout particulièrement lors de la première semaine suivant le sevrage (température ambiante de 23,5±3°C vs. 23,5±0,5°C ; Le Dividich, 1981).

*c. Impact de l'âge et du poids du porcelet au sevrage*

Il existe une corrélation positive entre le poids de sevrage et le gain de poids en post-sevrage (Madec *et al.*, 1998). Toutefois, bien qu'il soit montré que les porcelets d'un poids au sevrage réduit (3 kg vs. 7-8 kg) présentent un risque plus élevé de déclarer des troubles digestifs en post-sevrage (Svensmark *et al.*, 1988), l'élévation du poids de sevrage n'est pas nécessairement corrélée à une réduction du risque de diarrhée. Bien plus que le poids, l'âge au sevrage présente un effet sur la santé digestive des porcelets en post-sevrage. L'augmentation de l'âge au sevrage prolonge la maturation du système digestif (Madec *et al.*, 1998). Au-delà de 30 jours d'âge, le sevrage des porcelets réduit le risque d'apparition de diarrhées (Madec *et al.*, 1998). Callesen *et al.* (2007) ont montré également que le retardement du sevrage (33 vs.



27 jours d'âge) favorisait l'augmentation du gain de poids (+50 grammes par jour) au cours des deux semaines suivant le sevrage, qui est liée à une augmentation du poids au sevrage (Madec *et al.*, 1998).

#### ***d. Stratégies alimentaires***

##### *- Importance de l'ingéré autour du sevrage*

La consommation alimentaire est un facteur prépondérant dans le maintien ou l'altération de la santé digestive au sevrage. La consommation d'aliment solide en amont du sevrage favorise la maturation du système digestif et réduit la vulnérabilité du porcelet au stress du sevrage, résultant en une réduction du risque de développement de diarrhées (Miller *et al.*, 1984). De plus, la familiarisation des porcelets à l'aliment solide en amont du sevrage réduit la période de jeûne induit par le stress du sevrage et résulte en une augmentation de l'ingéré au cours de la première semaine post-sevrage (Bruininx *et al.*, 2002). Non seulement l'augmentation de l'ingéré pendant la première semaine post-sevrage améliore les performances de croissance (Bruininx *et al.*, 2002) mais elle est également associée à une diminution du risque d'apparition de diarrhée (Madec *et al.*, 1998). En outre, un ingéré inférieur à 1 kg au cours de la première semaine post-sevrage favorise l'apparition de troubles digestifs (Madec *et al.*, 1998).

Selon certains auteurs, la restriction alimentaire pendant une à deux semaines après le sevrage permettait de limiter l'apparition de diarrhées en post-sevrage (Ball et Aherne, 1982 ; Rantzer *et al.*, 1996). Toutefois, celle-ci est généralement associée à une réduction de la croissance (Rantzer *et al.*, 1996 ; Pastorelli *et al.*, 2012) et la capacité des animaux à rattraper le retard de croissance est incertain (Pastorelli *et al.*, 2012). Par ailleurs, l'application d'une restriction alimentaire impliquant une période de jeûne (restriction alimentaire temporelle) favorise l'apparition de troubles digestifs en comparaison avec des animaux recevant une alimentation continue ou *ad libitum* (Ball et Aherne, 1982 ; Laine *et al.*, 2008). Il est supposé que l'alternance entre jeûne et alimentation induit un dérèglement du transit digestif favorisant la malabsorption et la colonisation du tractus digestif par les bactéries pathogènes (Ball et Aherne, 1982). En parallèle, Pastorelli *et al.* (2012) ont montré que la restriction alimentaire dans des conditions sanitaires dégradées, impliquant une croissance réduite et une inflammation chronique modérée, augmentaient l'occurrence des diarrhées et renforçaient le retard de croissance. Les auteurs suggèrent que l'application concomitante d'un stress sanitaire et alimentaire favorise l'altération de l'intégrité intestinale. Globalement, l'impact de



la restriction alimentaire sur la santé et la croissance du porcelet sevré confirme l'importance d'un apport constant et répondant aux besoins nutritionnels pour optimiser l'adaptation du porcelet au stress du sevrage.

- *Additifs fonctionnels*

Les additifs alimentaires fonctionnels offrent une alternative prometteuse à l'utilisation de substances antibactériennes ou chimiques pour maintenir la santé des animaux au sevrage (Domeneghini *et al.*, 2006). Le terme d'« additifs fonctionnels » regroupe les ingrédients capables de stimuler adéquatement les défenses locales, d'influencer de manière bénéfique le microbiote gastro-intestinal et de favoriser la digestion et l'absorption des nutriments (Domeneghini *et al.*, 2006). Un certain nombre d'ingrédients fonctionnels ont montré un effet bénéfique sur le maintien de la santé digestive au sevrage. L'apport additionnel de certains acides aminés dans l'alimentation limitent l'altération de la muqueuse intestinale au sevrage (Lallès *et al.*, 2004). Entre autres, la glutamine, le glutamate et l'arginine préservent l'architecture intestinale et favorisent l'efficacité alimentaire au cours de la première semaine post-sevrage (Lallès *et al.*, 2004 ; Domeneghini *et al.*, 2006). L'administration de probiotiques et de prébiotiques est également reconnue pour favoriser la santé digestive en agissant sur l'homéostasie microbienne commensale (Domeneghini *et al.*, 2006). Les probiotiques, microorganismes non pathogènes apportés par l'alimentation, favorisent le maintien de la balance microbienne au sein du tractus digestif par des mécanismes variés (phénomène de compétition, stimulation du système immunitaire de l'animal) et préviennent la colonisation par les bactéries pathogènes (Domeneghini *et al.*, 2006). Les prébiotiques, quant à eux, sont majoritairement des ingrédients non digestibles ou non absorbables par l'animal et apportent un substrat pour la croissance de populations bactériennes commensales spécifiques (Montagne *et al.*, 2003 ; Domeneghini *et al.*, 2006). Notamment, les prébiotiques favorisant la croissance des bactéries lactiques et des bifidobactéries favoriseraient la résistance de l'animal à la colonisation par les pathogènes (Domeneghini *et al.*, 2006). L'impact des probiotiques et prébiotiques sur l'homéostasie microbienne commensale est d'autant plus efficace pendant les périodes de développement chez le jeune ou lors d'une déstabilisation des populations microbiennes (Domeneghini *et al.*, 2006).



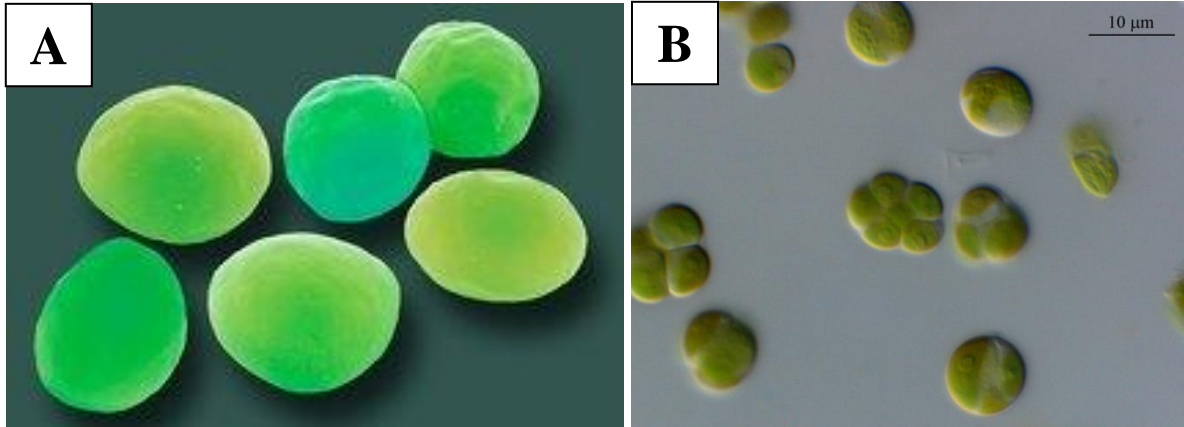


Figure 6 : Morphologie de la Chlorelle. A : Image obtenue par microscopie électronique à balayage (Agrandissement : x10000, photo par S. Gschmeissner). B : Image obtenue par microscopie optique (source : <https://www.ccap.ac.uk>)

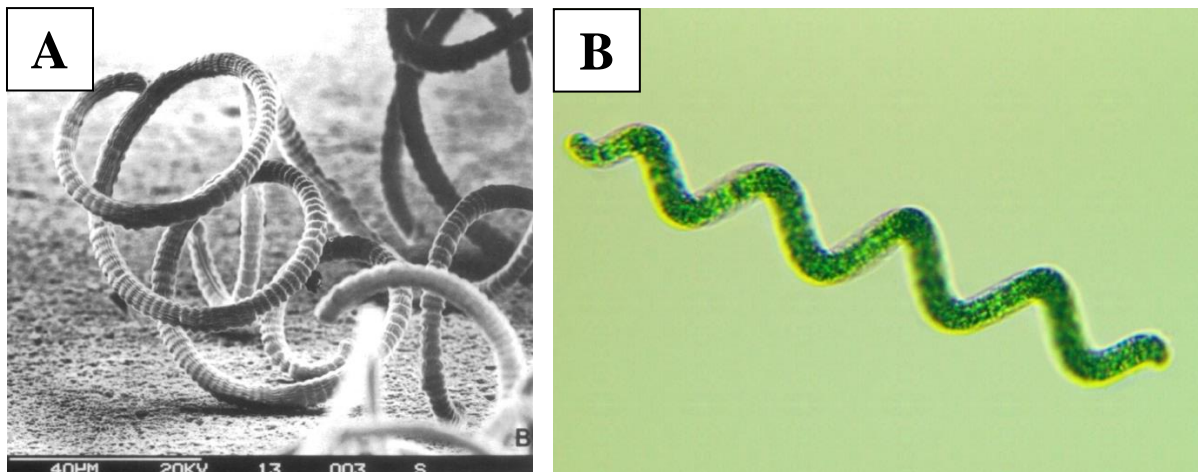


Figure 7 : Morphologie de la Spiruline. A : Image obtenue par microscopie électronique à balayage (Ciferri, 1983). B : Image obtenue par microscopie optique (source : <http://algae-lab.com>)

## **Chapitre 2 : Utilisation des microalgues (Chlorelle et Spiruline) en nutrition et santé animale**

Les microalgues ou algues unicellulaires sont composées d'une ou plusieurs cellules arrangées en chaînes ou en groupes et constituent la base de la chaîne alimentaire en milieu aquatique, aussi connues sous le nom de « plancton » (Satyanarayana *et al.*, 2011). En plus de regrouper une multitude d'espèces, les microalgues sont hautement spécialisées et possèdent la capacité de vivre dans des milieux écologiques très variés (Satyanarayana *et al.*, 2011), y compris dans des milieux très sélectifs pour la croissance des organismes (Milledge, 2011). Les microalgues représentent à l'échelle industrielle une matière première d'intérêt. Les algues unicellulaires possèdent la capacité de dupliquer leur nombre de cellules plusieurs fois quotidiennement, leur offrant une croissance nettement plus rapide que celle des plantes (Satyanarayana *et al.*, 2011). La Chlorelle et la Spiruline ont été les premières cultures à visée commerciale appliquées à grande échelle, respectivement en 1960 et en 1970 (Gershwin et Belay, 2007 ; Milledge, 2011) et sont actuellement commercialisées en nutrition humaine pour leur haute valeur nutritionnelle et leur contenance en molécules d'intérêt pour la santé (Spolaore *et al.*, 2006). La Chlorelle est une algue verte unicellulaire de type eucaryote de la famille des *Chlorellaceae*, vivant en eau douce (Figure 6). La Spiruline est une cyanobactérie (procaryote) multicellulaire qui se présente sous forme filamenteuse et suit une orientation hélicoïdale (Figure 7) (Ciferri, 1983). Elle appartient à la classe des cyanobactéries capables de réaliser la photosynthèse. Elle fut premièrement classée dans le règne végétal au même titre que la Chlorelle, pour sa composition en pigments propres aux plantes et son activité de photosynthèse (Ciferri, 1983). Malgré son appartenance aux microorganismes de type procaryote, qui la distingue des algues unicellulaires, la Spiruline reste généralement considérée sous l'appellation de « microalgue » (Milledge, 2011).

### **A. Valeur nutritionnelle**

La Spiruline et la Chlorelle possèdent la particularité de contenir une forte teneur en protéines (environ 60%) et en acides aminés essentiels, acides gras, fibres, vitamines et minéraux (Tableau 2), leur conférant une forte attractivité dans le domaine de la nutrition (Gershwin et Belay, 2007 ; Liu et Hu, 2013). L'utilisation de la Chlorelle et de la Spiruline en nutrition animale a montré un fort intérêt au cours des années 1980, en tant qu'alternative à l'utilisation du tourteau de soja dans la ration des animaux d'élevage. En effet, leurs caractéristiques

Tableau 2 : Composition nutritionnelle moyenne de la Spiruline et de la Chlorelle (d'après les données de Podojil *et al.*, 1978 ; Becker, 1994 ; Ötles et Pire, 2001 ; Tokuşoglu et Ünal, 2003 ; Spolaore *et al.*, 2006 ; Gershwin et Belay, 2007 ; Habib *et al.*, 2008 ; Halle *et al.*, 2009 ; Holman et Malau-Aduli, 2013 ; Liu et Hu, 2013 ; Safi *et al.*, 2014a)

	<b>Spiruline</b>	<b>Chlorelle</b>	<b>Unité</b>
<b>Composition générale</b>			
Protéines	55-70	42-68	%MS
Lipides	4-16	8-22	%MS
Glucides	14-19	10-17	%MS
Matière minérale	3-11	5-9	%MS
Cellulose brute	3-7	21,4	%MS
Energie	1504-1582	1291	kJ/100g
<b>Acides gras</b>			
Myristique (C14:0)	0,4-0,5	0,7-0,9	% acides gras totaux
Palmitique (C16:0)	26,6-27,9	14,4-20,4	% acides gras totaux
Palmitoléique (C16:1)	1,0-3,8	4,0-5,8	% acides gras totaux
Stéarique (C18:0)	5,8-8,8	1,6-15,3	% acides gras totaux
Oléique (C18:1 n-6)	10,1-16,6	17,6	% acides gras totaux
Linoléique (C18:2 n-6)	10,4-14,4	12,0	% acides gras totaux
Gamma-linoléique (C18:3 n-6)	3,6-5,5	n.d.	% acides gras totaux
Alpha-linoléique (C18:3 n-3)	0,6-0,7	15,8	% acides gras totaux
Docosahexaénoïque (C22:6 n-3)	n.d.	0,3	% acides gras totaux
Acides gras saturés totaux	34,1-35,9	25,1-25,3	% lipides totaux
Acides gras monoinsaturés totaux	36,4-39,3	15,7-28,0	% lipides totaux
Acides gras polyinsaturés totaux	22,3-25,1	38,3-58,5	% lipides totaux
<b>Acides aminés (g/100g protéines)</b>			
Lysine	4,7-4,8	5,4-7,5	g/100g protéines
Phénylalanine	4,4-5,3	3,9-6,0	g/100g protéines
Leucine	8,5-9,8	7,2-9,5	g/100g protéines
Isoleucine	5,6-6,7	3,2-4,0	g/100g protéines
Méthionine	1,9-2,5	0,6-2,5	g/100g protéines
Histidine	1,6-2,2	1,2-2,0	g/100g protéines
Valine	6,3-7,1	3,1-7,0	g/100g protéines
Thréonine	4,5-6,2	3,5-7,9	g/100g protéines
Tryptophane	0,3-1,7	1,8-16,1	g/100g protéines
Glutamine	10,3-14,5	9,1-13,7	g/100g protéines
Acide aspartique	9,5-11,8	7,2-10,9	g/100g protéines
Arginine	6,8-7,3	5,6-10,3	g/100g protéines
Alanine	7,3-9,5	6,6-10,9	g/100g protéines
Glycine	5,0-5,7	4,6-8,6	g/100g protéines
Proline	3,8-4,2	3,0-5,0	g/100g protéines
Sérine	4,4-5,1	3,2-7,8	g/100g protéines
Tyrosine	4,0-5,3	2,8-8,4	g/100g protéines
Cystéine	0,9	0-1,3	g/100g protéines

nutritionnelles leur permet de se placer parmi les sources de protéines à fort potentiel pour assurer la croissance des animaux de rente (Lipstein et Hurwitz, 1980 ; Lipstein *et al.*, 1980 ; Rigor *et al.*, 1980 ; Yap *et al.*, 1982 ; Lipstein et Hurwitz, 1983 ; Peiretti et Meineri, 2008 ; Peiretti et Meineri, 2011). L'étude de la supplémentation en Chlorelle ou en Spiruline dans l'alimentation de l'animal de rente présente cependant des résultats variés et contradictoires (Tableaux 3 et 4). De nombreux auteurs ont observé des performances de croissance similaires entre les animaux recevant une source de protéines traditionnelle (généralement protéines de soja) et ceux recevant une supplémentation en Spiruline ou en Chlorelle, validant leur potentiel en tant que nouvelle matière première d'intérêt pour la nutrition animale (Lipstein et Hurwitz, 1980 ; Rigor *et al.*, 1980 ; Yap *et al.*, 1982). L'absence d'effet négatif sur la croissance des animaux a été recensée chez plusieurs espèces (porc, lapin, volaille) et pour des niveaux de supplémentation variant de 3 à 20% dans l'aliment (Rigor *et al.*, 1980 ; Yap *et al.*, 1982 ; Peiretti et Meineri, 2008 ; Bónai *et al.*, 2012). Cependant, plusieurs auteurs ont également observé une dégradation des performances de croissance chez les animaux supplémentés en Spiruline ou en Chlorelle, généralement associée à l'élévation du niveau d'incorporation en microalgues dans le régime (Lipstein et Hurwitz, 1980 ; Yoshida et Hoshii, 1980 ; Ross et Dominy, 1990). Bien que la détérioration des performances de croissance chez les animaux supplémentés en Spiruline ou en Chlorelle ne soit généralement pas associée à une réduction de l'ingéré, il a été observé de manière occasionnelle une diminution de la consommation chez les animaux recevant un régime supplémenté en microalgues, indépendamment du niveau d'incorporation (Lipstein et Hurwitz, 1980 ; Ross et Dominy, 1990 ; Kapoor et Mehta, 1993 ; Grinstead *et al.*, 2000 ; Halle *et al.*, 2009). L'altération des performances de croissance s'explique majoritairement par une incertitude concernant la digestibilité des nutriments d'origine microalgale. Chez le lapin, l'introduction de Spiruline (*Spirulina platensis*) à hauteur de 3% dans l'aliment n'affecte pas la digestibilité apparente du régime (Tableau 3 ; Dalle Zotte *et al.*, 2013), tandis qu'une incorporation plus élevée (5, 10 ou 15%) est associée à une réduction de la digestibilité apparente des constituants analytiques du régime (Tableau 3 ; Peiretti et Meineri, 2011). Cette baisse de la digestibilité du régime a également été décrite chez le poulet de chair recevant un régime supplémenté à plus de 10% en Spiruline (Yoshida et Hoshii, 1980). En parallèle, Janczyk *et al.* (2007c) suggèrent que la valeur nutritionnelle de la Chlorelle dépend du traitement réalisé sur la biomasse. La présence d'une paroi cellulaire rigide et hautement résistante à la dégradation chez la Chlorelle impliquerait une faible biodisponibilité des constituants intracellulaires. Selon Janczyk *et al.* (2007b ; 2009), la destruction de la paroi cellulaire de la Chlorelle permettrait d'augmenter la

Tableau 3 : Effets de la supplémentation en Spiruline sur la croissance, l'ingestion et l'efficacité alimentaire chez l'animal d'élevage (- : non renseigné)

Espèce	Age	Durée de supplémentation	Niveau d'inclusion %	Détails	Effet sur la croissance	Effet sur l'ingestion	Effet sur l'efficacité alimentaire	Interprétations des auteurs	Auteurs
Porc	4 ou 8 jours	15 ou 21 jours	14,76	Faible croissance des animaux Régimes iso-protéiques et iso-énergétiques	Pas d'effet	-	-	-	Yap <i>et al.</i> , 1982
Porc	11 jours	28 jours	0,2 / 0,5 / 2 (Aliment granulé ou farine)	Base maïs/soja + antibiotique Régimes iso-lysine	Inclusion à 0.2% et 2% : augmentation du gain de poids de j14 à j28	Inclusion à 0.2% et 2% : augmentation de l'ingéré de j14 à j28	Réduction proportionnelle au niveau d'inclusion de j7 à j14	Le procédé de granulation affecte la qualité nutritionnelle de la Spiruline	Grinstead <i>et al.</i> , 2000
Porc	18 jours	7 à 42 jours	0,1 / 0,2 (Farine)	Base maïs/soja Régimes iso-lysine	Pas d'effet	Inclusion à 0,1% : augmentation de l'ingéré de j0 à j14 Inclusion à 0,2% : augmentation de l'ingéré de j0 à j28	Augmentation de l'efficacité alimentaire quel que soit le niveau d'inclusion de j0 à j28	La Spiruline présente un effet autre que nutritionnel	Grinstead <i>et al.</i> , 2000
Porc	11 jours	28 jours	0,2 (Aliment granulé ou farine)	Base maïs/soja + antibiotique Régimes iso-lysine	Aliment granulé : augmentation du gain de poids de j0 à j7 et réduction du gain de poids de j7 à j14 - pas d'effet sur la période totale	Aliment granulé : réduction de l'ingéré	Aliment granulé : augmentation de l'efficacité alimentaire	Le procédé de granulation affecte l'appétence des régimes à base de Spiruline. Effet probable de l'incorporation de Spiruline sur la santé, masqué par l'ajout d'antibiotiques dans la ration	Grinstead <i>et al.</i> , 2000
Poulet	1 jour	21 jours	5, 10, 15, 20	Régimes iso-protéiques et iso-énergétiques	Réduction du gain de poids à partir de 10% d'inclusion de Spiruline dans l'aliment	-	Pas d'effet	-	Ross et Dominy, 1990
Poulet	35 jours	41 jours	1,5 / 3 / 6 / 12	Régimes iso-protéiques et iso-énergétiques	Réduction du gain de poids chez les animaux recevant 12% de Spiruline dans l'aliment	-	Pas d'effet	-	Ross et Dominy, 1990
Poulet & poule	1 jour	35 jours	1,5 / 3 / 6 / 12	Régimes iso-protéiques et iso-énergétiques	Pas d'effet	Baisse de l'ingéré chez les poules recevant 1.5% de Spiruline dans l'aliment	Pas d'effet	-	Ross et Dominy, 1990
Lapin	63 jours	31 jours	5 / 10 / 15	-	Pas d'effet	Augmentation de l'ingéré chez les animaux recevant les régimes supplémentés à 5 ou 10% en Chlorelle	Pas d'effet sur l'efficacité alimentaire. Réduction de la digestibilité apparente de la matière sèche, de la matière organique, des protéines, de l'énergie et des fibres des régimes supplémentés en Spiruline	Le procédé de granulation pourrait avoir altéré la valeur nutritionnelle de la biomasse algale. L'absence d'effet sur les performances de croissance pourrait s'expliquer par le comportement de caecotrophie chez le lapin.	Peiretti et Meineri, 2008
Lapin	35 jours	42 jours	5	Régimes iso-protéiques et iso-énergétiques	Pas d'effet	-	-	-	Bónai <i>et al.</i> , 2012
Lapin	35 jours	98 jours	3	Régimes iso-protéiques et iso-énergétiques	Pas d'effet	Pas d'effet	Pas d'effet sur la digestibilité apparente de la matière sèche, de la matière organique, de l'énergie, des protéines, des fibres et des minéraux du régime	-	Dalle Zotte <i>et al.</i> , 2013

digestibilité des composants intracellulaires. La rupture de la paroi cellulaire par la méthode des ultrasons augmente la digestibilité apparente des protéines chez le rat recevant un régime supplémenté à hauteur de 21% en Chlorelle (57% vs. 47% ; Janczyk *et al.*, 2007b). La digestibilité apparente des protéines reste cependant nettement inférieure à celle d'un régime non supplémenté (82% ; Janczyk *et al.*, 2007b).

## **B. Action de la Spiruline et de la Chlorelle sur la santé de l'animal**

Au-delà de leur valeur nutritionnelle, la Spiruline et la Chlorelle ont été largement référencées dans le domaine de la santé humaine et animale pour leur contenance en ingrédients dits « fonctionnels » (Gershwin et Belay, 2007 ; Plaza *et al.*, 2009). Les ingrédients fonctionnels se caractérisent par leur capacité à moduler des mécanismes moléculaires et des fonctions physiologiques spécifiques, permettant d'améliorer le niveau de santé ou de réduire le risque de maladie (Gershwin et Belay, 2007 ; Plaza *et al.*, 2009).

### **1. Effets de la Spiruline et de la Chlorelle sur la stimulation du système immunitaire**

#### ***a. Effet de la Spiruline et de la Chlorelle sur les cellules de l'immunité***

Certains composés présents dans la Spiruline et la Chlorelle sont reconnus pour exercer une régulation positive sur les cellules de la première ligne de défense de l'organisme (macrophages, cellules dendritiques, granulocytes). Les composés relatifs à cette action modulatrice sont majoritairement des polysaccharides complexes, bien que quelques rares études recensent également une contribution des protéines contenues dans les microalgues (Morris *et al.*, 2007). Plusieurs études *in vitro* ont mis en évidence l'action stimulante des polysaccharides provenant de la Spiruline (dont « Immulina ») et de la Chlorelle sur l'activité basale des macrophages, ou en conditions d'exposition au LPS (Tableau 5) (Qureshi et Ali, 1996 ; Pugh *et al.*, 2001 ; Hsu *et al.*, 2009 ; Parages *et al.*, 2012 ; Tabarsa *et al.*, 2015). La supplémentation en biomasse complète ou en extraits de Spiruline et de Chlorelle est également responsable d'une augmentation des pools et de l'activité des macrophages *in vivo* chez le rongeur et le poulet, dans des conditions d'immunocompétence réduite (Morris *et al.*, 2007) ou de stimulation du système immunitaire par l'administration sublétales de LPS (Al-Batshan *et al.*, 2001). L'activation des macrophages par les polysaccharides provenant de la Spiruline ou de la Chlorelle se caractérise par une augmentation de l'activité de phagocytose

Tableau 4 : Effets de la supplémentation en Chlorelle sur la croissance, l'ingestion et l'efficacité alimentaire chez l'animal d'élevage (- : non renseigné)

Espèce	Age	Durée de supplémentation	Niveau d'inclusion %	Détails	Effet sur la croissance	Effet sur l'ingestion	Effet sur l'efficacité alimentaire	Interprétations des auteurs	Auteurs
Porc	8 jours	21 jours	13,81	Faible croissance des animaux Régimes iso-protéiques et iso-énergétiques	Pas d'effet	-	-	-	Yap <i>et al.</i> , 1982
Porc	sevrage	période totale	2,5 à 20	-	Pas d'effet	Pas d'effet	-	-	Rigor <i>et al.</i> , 1980
Porc	croissance	période totale	2,5 à 20	-	Pas d'effet	Pas d'effet	-	-	Rigor <i>et al.</i> , 1980
Porc	finition	période totale	2,5 à 10	-	Pas d'effet	Pas d'effet	-	-	Rigor <i>et al.</i> , 1980
Porc	croissance	42 jours	0,1 / 0,2	Chlorelle fermentée	Augmentation du gain de poids chez les animaux recevant 0.1% de Chlorelle dans l'aliment	Pas d'effet	Pas d'effet sur l'efficacité alimentaire. Digestibilité apparente de la matière sèche plus élevée pour le régime supplémenté à 0.1% en Chlorelle fermentée	-	Yan <i>et al.</i> , 2012
Poule pondeuse	-	2 mois	3 / 6 / 9 / 12	Régimes iso-protéiques et iso-énergétiques	Pas d'effet	Pas d'effet	Pas d'effet	-	Lipstein <i>et al.</i> , 1980
Poulet de chair	7 jours	14 jours	7,5 / 15	Régimes iso-protéiques et iso-énergétiques	Pas d'effet	Pas d'effet	Légère baisse de l'efficacité alimentaire chez les animaux supplémentés en Chlorelle (non significatif)	-	Lipstein et Hurwitz, 1980
Poulet de chair	7 jours	14 jours	12,5	Régimes à faibles niveaux en protéines et acides aminés (critique) mais iso-énergétiques et iso-lysine	Légère réduction du poids chez les animaux supplémentés en Chlorelle (non significative)	Pas d'effet	Légère baisse de l'efficacité alimentaire chez les animaux supplémentés en Chlorelle (non significatif)	Les résultats pourraient s'expliquer par une légère déficience en acides aminés dans les régimes supplémentés en Chlorelle	Lipstein et Hurwitz, 1980
Poulet de chair	7 jours	49 jours	15	Régimes iso-protéiques et iso-énergétiques	Réduction significative du gain de poids de 5 à 10% chez les animaux recevant le régime supplémenté en Chlorelle	Réduction de l'ingéré de 7 à 35 jours d'âge chez les animaux recevant le régime supplémenté en Chlorelle	Baisse de l'efficacité alimentaire chez les animaux supplémentés en Chlorelle sur la période totale	-	Lipstein et Hurwitz, 1980
Poulet de chair	42 jours	14 jours	3 / 6 / 9 / 12 / 15	Régimes iso-protéiques, iso-lysine et iso-énergétiques	Réduction graduelle du gain de poids (2-14%) proportionnelle à la concentration du régime en Chlorelle	-	Baisse graduelle de l'efficacité alimentaire (1-5%) proportionnelle à la concentration du régime en Chlorelle	-	Lipstein et Hurwitz, 1980
Poulet de chair	1 jour	28 jours	5 / 10	Régimes iso-protéiques et iso-énergétiques	Pas d'effet	Pas d'effet	Pas d'effet	-	Lipstein et Hurwitz, 1983
Poule pondeuse	154 jours	Jusqu'à 8 mois	0,25 / 0,5 / 0,75	Régimes iso-protéiques Chlorelle séchée par atomisation ou broyée puis séchée par atomisation	-	Réduction de l'ingéré chez les animaux recevant une supplémentation de 0.75% de chlorelle broyée puis séchée par atomisation	-	L'élévation du niveau d'incorporation en algue dans l'aliment impacterait l'appétence du régime, plus particulièrement après broyage de la biomasse	Halle <i>et al.</i> , 2009

(Qureshi et Ali, 1996 ; Al-Batshan *et al.*, 2001), de la production de cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (Pugh *et al.*, 2001 ; Hsu *et al.*, 2009 ; Parages *et al.*, 2012 ; Tabarsa *et al.*, 2015) et du relargage de dérivés réactifs de l'oxygène (Al-Batshan *et al.*, 2001 ; Tabarsa *et al.*, 2015). Les observations relatives à l'effet des polysaccharides issus de la Spiruline et de la Chlorelle sur les autres populations cellulaires de la première ligne de défense sont moins référencées. Balachandran *et al.* (2006) ont montré une augmentation de la production d'IL-6 par les cellules des plaques de Peyer *ex-vivo* chez la souris recevant une supplémentation en polysaccharides extraits de la Spiruline (« Immulina », *Spirulina platensis*) et suggèrent une augmentation du nombre ou de l'activité des cellules dendritiques. L'administration d'un extrait de Chlorelle riche en protéines et polysaccharides (voie orale, intrapéritonéale, sous-cutanée ou intraveineuse) est responsable d'une accumulation accrue de leucocytes, plus spécifiquement de granulocytes, dans la cavité péritonéale chez la souris infectée par une souche *E. coli* (Tanaka *et al.*, 1986 ; Hasegawa *et al.*, 1989).

L'activation des cellules de l'immunité innée induit la mise en place des réponses immunitaires acquises, par la production de molécules qui assurent la communication vers les cellules de la seconde ligne de défense (Hasegawa *et al.*, 1995 ; Hsu *et al.*, 2009). L'administration de Chlorelle favorise la restauration des réponses immunitaires chez la souris immunodéficiente soumise à une infection par *Listeria*, en stimulant le recrutement de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> au site d'infection (Hasegawa *et al.*, 1995). La supplémentation en Spiruline (« Immulina ») et en Chlorelle est également responsable d'une augmentation de la production d'IgA au niveau systémique et local chez le rongeur et le poulet (Balachandran *et al.*, 2006 ; Sugiharto *et al.*, 2010 ; Kang *et al.*, 2013), ce qui suggère un effet stimulant sur la différenciation des lymphocytes B. Balachandran *et al.* (2006) ont notamment mis en évidence une augmentation de la production d'IgA par les plaques de Peyer intestinales chez les animaux supplémentés en « Immulina », un extrait de polysaccharides provenant de la Spiruline.

### ***b. Mécanismes d'action de la Spiruline et de la Chlorelle sur les cellules de l'immunité***

Les polysaccharides responsables de l'activation des cellules de l'immunité innée seraient capables de mimer l'action des antigènes bactériens et d'influencer le développement du système immunitaire (Qureshi et Ali, 1996 ; Al-Batshan *et al.*, 2001 ; Pardy *et al.*, 2003 ; Balachandran *et al.*, 2006). Les mécanismes d'action des polysaccharides provenant des



Tableau 5 : Effets de la supplémentation en Spiruline et Chlorelle sur l'activité des macrophages

Souche	Fraction / nom	Modèle	Méthode	Conditions	Effets sur les macrophages	Auteurs
<i>Spirulina platensis</i>	Polysaccharides	<i>In vitro</i>	Culture in vitro de macrophages murins	Basale	Augmentation de la production en TNF $\alpha$	Parages <i>et al.</i> , 2012
<i>Spirulina platensis</i>	Polysaccharides (Immulina)	<i>In vitro</i>	Culture in vitro de macrophages humains	Basale	Activation du facteur NF- $\kappa$ B, augmentation de la production en TNF $\alpha$ et IL-1 $\beta$	Pugh <i>et al.</i> , 2001
<i>Spirulina platensis</i>	Extrait non déterminé	<i>In vitro</i>	Culture in vitro de macrophages broncho-alvéolaires félines	Exposition à <i>E. coli</i> ou hépatocytes ovins	Augmentation de la phagocytose	Qureshi et Ali, 1996
<i>Spirulina platensis</i>	Biomasse entière	<i>Ex-vivo</i>	Culture de macrophages issus de poulets supplémentés avec 0,5, 1 ou 2% de Spiruline	Basale ou après stimulation au LPS	Augmentation de la phagocytose et de la production d'oxyde nitrique, y compris après stimulation au LPS	Al-Batshan <i>et al.</i> , 2001
<i>Chlorella vulgaris</i>	Majoritairement polysaccharides	<i>In vitro</i>	Culture in vitro de macrophages murins	Basale	Stimulation de la production de TNF $\alpha$ , IL-6 et IL-10 et du relargage d'oxyde nitrique	Tabarsa <i>et al.</i> , 2015
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Polysaccharides	<i>In vitro</i>	Culture in vitro de macrophages murins et humains	Basale ou après stimulation au LPS	Stimulation de l'expression et de la production d'IL-1 $\beta$ . Augmentation de la production d'IL-1 $\beta$ et TNF $\alpha$ après stimulation au LPS. Activation par la voie TLR4 majoritairement.	Hsu <i>et al.</i> , 2009
<i>Chlorella vulgaris</i>	Hydrolysats de protéines	<i>Ex-vivo</i>	Culture in vitro de macrophages de la cavité péritonéale de souris à jeun pendant trois jours puis renourries	-	Augmentation de l'activité des macrophages chez les animaux supplémentés avec l'hydrolysats de protéines provenant de la Chlorelle	Morris <i>et al.</i> , 2007

algues sont peu référencés, mais sont supposés similaires aux mécanismes associés aux polysaccharides des plantes (Schepetkin et Quinn, 2006). L'activation des cellules de l'immunité innée par les polysaccharides issus des plantes serait liée à leur reconnaissance par certains récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules, notamment les TLR (Figure 8) (Schepetkin et Quinn, 2006). Plusieurs auteurs suggèrent que les polysaccharides provenant de la Spiruline ou de la Chlorelle possèderaient des propriétés physico-chimiques similaires à celles du lipopolysaccharide (LPS), endotoxine provenant des bactéries gram négatives (dont *E. coli*), permettant l'activation des macrophages sans le pouvoir toxique du LPS (Qureshi et Ali, 1996 ; Al-Batshan *et al.*, 2001 ; Pardy *et al.*, 2003 ; Parages *et al.*, 2012). En outre, Qureshi et Ali (1996) et Al-Batshan *et al.* (2001) ont montré que la supplémentation en Spiruline seule entraînait une stimulation de l'activité des macrophages similaire à l'administration de LPS seul (Figure 9). Par ailleurs, l'effet stimulant des polysaccharides de la Spiruline et de la Chlorelle sur l'activité des macrophages est démontré comme additif à l'effet du LPS (Figure 9) (Al-Batshan *et al.*, 2001 ; Hsu *et al.*, 2009). Les mécanismes et les récepteurs impliqués dans la reconnaissance des polysaccharides provenant de la Spiruline et de la Chlorelle sont peu connus et variables. Les polysaccharides d'origine microalgale auraient la capacité d'être reconnus par les récepteurs TLR2 et TLR4. Les polysaccharides extraits de *Chlorella pyrenoidosa* stimuleraient l'activité des macrophages via leur reconnaissance par le récepteur TLR4 majoritairement, au même titre que le LPS bactérien (Figure 10) (Akira *et al.*, 2001 ; Hsu *et al.*, 2009). Cependant, bien que TLR4 soit majoritairement impliqué dans la reconnaissance des polysaccharides de cette souche, les auteurs n'excluent pas l'activation par d'autres récepteurs, notamment TLR2, également responsable de la reconnaissance des produits d'origine bactérienne par les macrophages (Figure 10) (Akira *et al.*, 2001). A l'inverse dans le cas de la Spiruline, Balachandran *et al.* (2006) ont montré que la fraction de polysaccharides « Immulina » active les monocytes humains (macrophages indifférenciés présents dans la circulation sanguine) selon un processus dépendant du récepteur TLR2 et indépendant du récepteur TLR4. La reconnaissance des polysaccharides d'origine microalgale par les récepteurs à la surface des cellules de l'immunité innée est responsable de l'activation du facteur NFκB et induit une cascade de signaux intracellulaires responsables de la production de cytokines, chémokines et dérivés réactifs de l'oxygène (Schepetkin et Quinn, 2006).

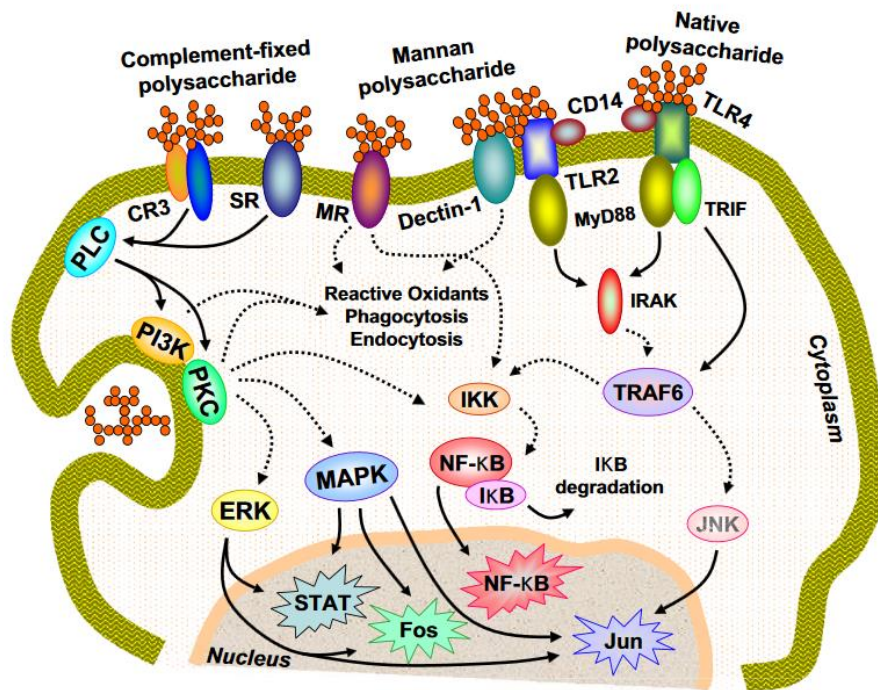


Figure 8 : Schéma illustratif des voies mécanistiques de reconnaissance des polysaccharides issus des plantes supérieures, supposées impliquées dans l'activation des macrophages D'après Schepetkin et al., (2006).

Les polysaccharides peuvent être reconnus par un large nombre de récepteurs, dont les récepteurs CR3 (récepteur du complément 3), SR (récepteur « scavenger »), MR (récepteur du mannose), Dectin-1 et les TLR 2 et 4. L'activation des voies de signalisation associées aux récepteurs CR3 et SR conduit à l'activation de la phospholipase C (PLC), elle-même responsable de l'activation de la protéine kinase C (PKC) et de la phosphoinositide-3-kinase (PI3K). Ces dernières activent la MAP kinase (MAPK ou « mitogen associated protein kinase »), de l'ERK (ou « extracellular signal regulated kinase ») et du facteur NF- $\kappa$ B (ou « nuclear factor  $\kappa$ B ») par phosphorylation du complexe IKK (inhibiteur du facteur NF- $\kappa$ B) qui induisent la transcription des gènes dans le noyau. L'activation de la voie de signalisation MR entraîne la production de dérivés réactifs de l'oxygène (« reactive oxidants »), stimule la phagocytose et l'endocytose et active le facteur NF- $\kappa$ B. La reconnaissance des polysaccharides par les récepteurs TLR2 et TLR4 entraînent l'activation de la kinase associée à IL-1R (IRAK) via la protéine MyD88 (« Myeloid differentiation protein 88 »), induisant l'activation du facteur TRAF-6 (TNF receptor-associated factor 6), des MAP kinases (dont JNK, ou « Jun N-terminal kinase ») et du facteur NF- $\kappa$ B. L'activation de ces voies de transcription conduit à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et de dérivés réactifs de l'oxygène.

### ***c. Implications pour la défense de l'hôte aux microorganismes pathogènes***

La stimulation des cellules de l'immunité innée et acquise par les composés immunomodulateurs de la Spiruline et de la Chlorelle favorise la défense et l'élimination efficace des pathogènes chez l'hôte (Tanaka *et al.*, 1986 ; Hasegawa *et al.*, 1989 ; Hasegawa *et al.*, 1995). L'administration d'un extrait de Chlorelle riche en protéines et polysaccharides chez la souris, favorise l'élimination de la bactérie de l'organisme dans les modèles d'infection à *E. coli* ou *Listeria*, y compris dans un contexte d'immunodéficience (Tableau 6) (Tanaka *et al.*, 1986 ; Hasegawa *et al.*, 1989 ; Hasegawa *et al.*, 1995) et est responsable d'une réduction ou d'un retardement de la mortalité après infection par *E. coli* (figure 11). L'extrait de Chlorelle utilisé ne possédant pas d'effet bactéricide direct, les auteurs mettent en relation l'élimination de la bactérie pathogène chez l'hôte avec la stimulation des cellules de l'immunité.

Le potentiel bénéfique de l'activation et du recrutement des cellules immunitaires doit cependant être évalué avec précaution. L'action stimulante de la Spiruline et de la Chlorelle sur les cellules de l'immunité a pour conséquence de favoriser la production de cytokines pro-inflammatoires (Parages *et al.*, 2012). Bien qu'une stimulation des réponses immunitaires innées et spécifiques favorise la lutte contre les pathogènes, une augmentation de l'activité des cellules de l'immunité, tout particulièrement de l'immunité innée, peut également être responsable d'une sur-stimulation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires, reconnues pour favoriser le catabolisme protéique et lipidique et inhiber la croissance chez l'animal (Johnson, 1997 ; Le Floch *et al.*, 2006). Par ailleurs, la surexpression des cytokines pro-inflammatoires, toxiques pour l'organisme en haute concentration (Parages *et al.*, 2012), peut mener à l'altération des tissus et être responsable de l'induction d'un choc septique chez l'hôte (Hsu *et al.*, 2009 ; Parages *et al.*, 2012). Les auteurs Hsu *et al.* (2009), bien qu'évoquant le risque lié à la stimulation de l'activité des cellules immunitaires, n'ont observé aucun effet toxique de l'administration de polysaccharides provenant de Chlorelle chez les animaux ayant subi une injection de LPS.

## **2. Effets de la Spiruline et de la Chlorelle sur le stress oxydant et l'inflammation**

### ***a. Pouvoir antioxydant de la Spiruline et de la Chlorelle***

Le statut oxydant chez l'animal correspond à une balance entre des mécanismes cellulaires produisant des composés pro-oxydants (dérivés réactifs de l'oxygène comprenant les radicaux libres et leurs précurseurs) et des mécanismes d'activité antioxydante permettant de réguler la

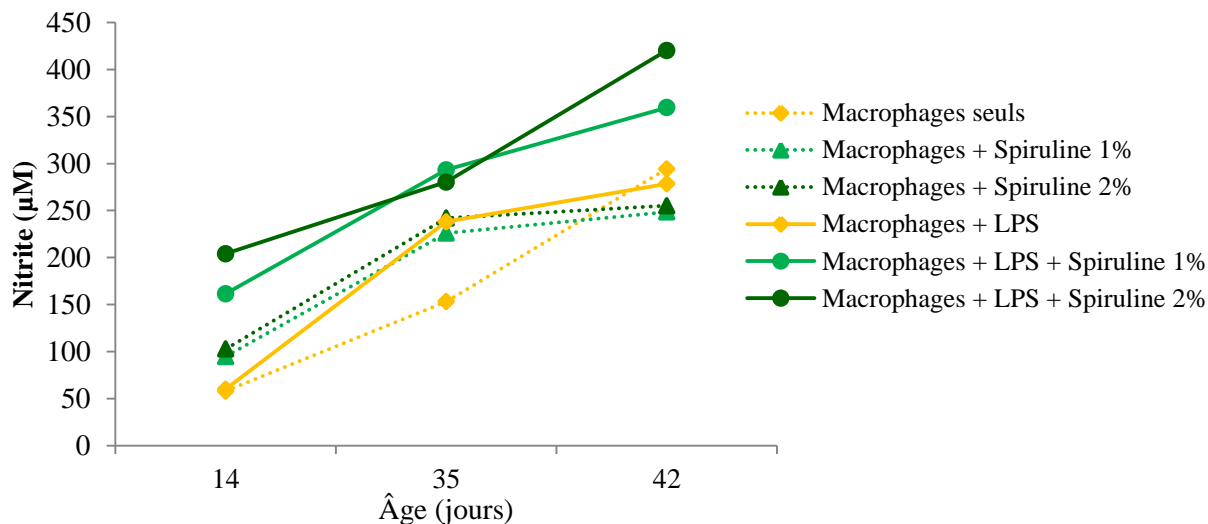


Figure 9 : Production en nitrite (représentatif de la production en dérivés réactifs de l'oxygène) par les macrophages issus de poulets supplémentés en Spiruline (*Spirulina platensis*) dans l'aliment (inclusion de 1 ou 2%), après stimulation ou non par l'ajout de LPS (1 µg/mL). D'après Al-Batshan *et al.* (2001).

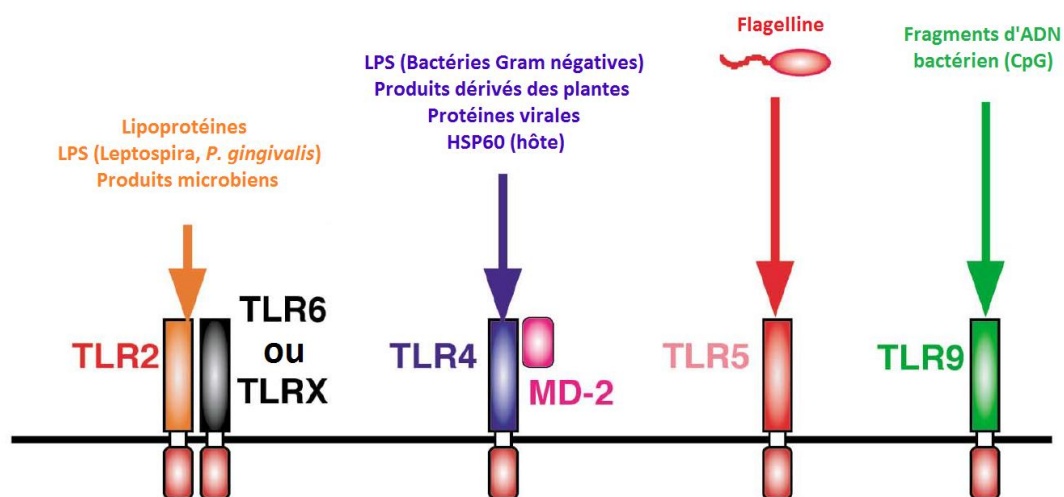


Figure 10 : Schéma représentatif des récepteurs TLR (Toll Like Receptors) impliqués dans la reconnaissance des composés d'origine microbienne. D'après Akira *et al.* (2001)

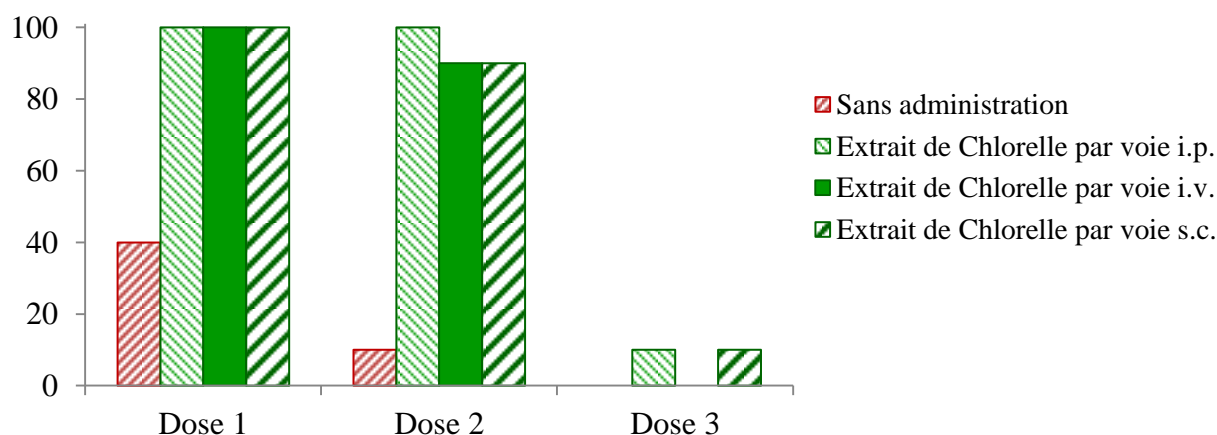


Figure 11 : Effet de l'administration d'un extrait de Chlorelle sur le taux de survie après induction d'une infection à *E. coli* chez le rat. Nombre de cellules *E. coli* injectées : Dose 1 =  $6,8 \times 10^6$  cellules ; Dose 2 =  $2,7 \times 10^7$  cellules ; Dose 3 =  $1,1 \times 10^8$  cellules. Extrait de Chlorelle administré par voie intrapéritonéale (i.p.), intraveineuse (i.v.) ou sous-cutanée (s.c). D'après Tanaka *et al.* (1986)

présence de composés pro-oxydants et protéger les cellules de la dégradation cellulaire et de l'apoptose (Cooke *et al.*, 2003 ; Favier, 2003). L'activité antioxydante est assurée par la présence de molécules capables d'agir en tant que donneur d'atomes d'hydrogène ou d'électron pour capter les radicaux libres. L'activité antioxydante est également assurée par la production d'enzymes chargées de neutraliser les composés pro-oxydants présents dans l'organisme (Favier, 2003). Les microalgues et les cyanobactéries possèdent la particularité d'assurer, dans leur milieu de vie, une défense accrue contre les agressions de l'environnement. Certains pigments agissent au sein de la cellule comme facteurs de protection contre la radiation et l'oxygène (Safi *et al.*, 2014a), leur conférant une forte teneur en molécules à activité antioxydante.

Le pouvoir antioxydant des composants intracellulaires de la Spiruline (*Spirulina platensis*) et de la Chlorelle (*Chlorella vulgaris*), provenant notamment des caroténoïdes et de certaines protéines, a été démontré par des approches *in vitro* permettant de tester leur capacité à capter les radicaux libres (Romay *et al.*, 1998b ; Herrero *et al.*, 2005 ; Patel *et al.*, 2006 ; Mendiola *et al.*, 2007 ; Vijayavel *et al.*, 2007 ; Kitada *et al.*, 2009 ; Chu *et al.*, 2010). Le pouvoir antioxydant de la Spiruline et de la Chlorelle limite l'accumulation excessive de dérivés réactifs de l'oxygène et contribuerait à la régulation de la balance entre pro-oxydants et antioxydants (Aizzat *et al.*, 2010 ; Pak *et al.*, 2012). L'application d'extraits de Spiruline (*Spirulina platensis*) sur des cultures cellulaires exposées aux radicaux libres a permis de mettre en évidence une réduction de l'apoptose cellulaire en lien avec la réduction du stress oxydant (Chu *et al.*, 2010). L'administration orale de Spiruline ou de phycocyanine, protéine-pigment majoritaire représentant plus de 40% du contenu en protéines de la Spiruline, est responsable d'une réduction de la quantité de dérivés de l'oxygène réactifs (ROS) générés par les leucocytes et au niveau mitochondrial chez le rat atteint de stéatohépatite non-alcoolique (Pak *et al.*, 2012). L'administration orale d'un extrait de Chlorelle riche en protéines et en polysaccharides chez le rat diminue également la peroxydation lipidique causée par le stress oxydant (Vijayavel *et al.*, 2007). La réduction du stress oxydant est expliquée par une augmentation des niveaux en antioxydants enzymatiques (superoxyde dismutase, catalase et glutathione peroxydase) et non-enzymatiques (glutathion, Vitamine C, Vitamine E) (Vijayavel *et al.*, 2007).

Tableau 6 : Effets de la supplémentation en un extrait de Chlorelle riche en protéines (44,3% de la matière sèche) et en polysaccharides (39,5% de la matière sèche) sur la croissance bactérienne dans quelques modèles infectieux

Espèce	Administration de l'extrait	Modèle	Dose	Effet sur la croissance bactérienne	Conséquences sur l'hôte	Auteur
Souris	50mg/kg par injection sous-cutanée, 24 heures avant l'infection	Infection par <i>E. coli</i> intrapéritonéale	$2 \times 10^7$ cellules <i>E. coli</i>	Augmentation du nombre de bactéries dans la rate 3 heures après infection. Chez les animaux sans supplémentation, multiplication par 14 du nombre de bactéries dans la rate 5 heures après infection. Réduction de 33% du nombre de bactéries 5 heures après infection chez les animaux recevant l'extrait de Chlorelle.	Infection conduisant à la mort des souris dans les 24 heures post-infection. Chez les animaux supplémentés en Chlorelle, la totalité ont survécu 48 heures post-infection.	Tanaka <i>et al.</i> , 1986
Rat	50mg/kg par voie orale pendant 14 jours	Infection par <i>E. coli</i> intrapéritonéale	$2,7 \times 10^8$ cellules <i>E. coli</i>	Le nombre de bactéries dans la cavité péritonéale, le foie, la rate et la circulation sanguine est maximal 6 heures post-infection puis redescend à un niveau indétectable 24 heures post-infection. Le nombre maximal de bactéries 6 heures P.I. est significativement plus faible chez les animaux supplémentés en extrait de Chlorelle.	-	Hasegawa <i>et al.</i> , 1989
Souris immunodéficente (préalablement infectée par "LP-BM5 murine leukemia viruses")	Supplémentation de 2% dans l'aliment	Infection par <i>L. monocytogenes</i> intrapéritonéale	$2 \times 10^4$ cellules <i>L. monocytogenes</i>	Le nombre de bactéries augmentent à 3 et à 6 jours post-infection dans la rate et la cavité péritonéale, puis diminuent à un niveau indétectable 10 jours P.I. chez les animaux immunocompétents. La présence de bactéries persiste 10 jours P.I. chez les animaux immunodéficients. Les animaux immunodéficients recevant une supplémentation en extrait de Chlorelle présentent un profil de croissance bactérienne similaire aux animaux immunocompétents.	-	Hasegawa <i>et al.</i> , 1995

### ***b. Effet de la Spiruline et de la Chlorelle sur la réponse inflammatoire***

Les mécanismes de stress oxydant et d'inflammation sont intrinsèquement liés dans les réponses immunitaires au sein des tissus de l'animal. L'activité de phagocytose par les leucocytes (neutrophiles, monocytes, macrophages et éosinophiles), stimulée par la présence de produits d'origine microbienne, est une source majeure de dérivés réactifs de l'oxygène et est associée à la production de cytokines pro-inflammatoires (Figure 12) (Conner et Grisham, 1996). Le facteur NF- $\kappa$ B, présent dans le cytoplasme des cellules, joue un rôle central dans la mise en place des réponses inflammatoires et est activé par un grand nombre de stimuli, dont les produits d'origine microbienne, mais également les dérivés réactifs de l'oxygène et les cytokines pro-inflammatoires, notamment TNF $\alpha$  et IL-1 (Figure 12) (Conner et Grisham, 1996 ; Pasparakis, 2009). Les dérivés réactifs de l'oxygène et les cytokines pro-inflammatoires jouent donc un rôle dans l'amplification de la réponse inflammatoire par les cellules, en stimulant l'expression d'une variété de chémokines et cytokines, notamment IL-6 et TNF- $\alpha$ , via l'activation du facteur NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme des cellules (Conner et Grisham, 1996).

De nombreux auteurs mettent en évidence un lien entre le pouvoir antioxydant de la Spiruline et de la Chlorelle et l'inhibition de l'inflammation (Tableau 7) (Romay *et al.*, 2001 ; Romay *et al.*, 2003 ; Cherng *et al.*, 2010 ; Leung *et al.*, 2013). Il est suggéré que l'effet anti-inflammatoire des composés provenant de la Spiruline et de la Chlorelle est expliqué, au moins de façon partielle, par leur action de piégeage des radicaux libres, permettant de bloquer la stimulation de la réponse inflammatoire (Romay *et al.*, 2001 ; Romay *et al.*, 2003). La phycocyanine, certains lipides présents dans la Spiruline et certaines molécules extraites de la Chlorelle, dont le peptide « Chlorelle-11 », seraient responsables d'une inhibition de l'activation du facteur NF- $\kappa$ B, conduisant à une diminution de la production en cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6 par les macrophages exposés au LPS (Cherng *et al.*, 2007 ; Cherng *et al.*, 2010 ; Ku *et al.*, 2013 ; Sibi et Rabina, 2016). A l'échelle de l'animal, l'administration orale ou intrapéritonéale de phycocyanine provenant de la Spiruline favorise également la réduction de la réponse inflammatoire systémique associée à l'administration de LPS (Tableau 7) (Romay *et al.*, 2001 ; Leung *et al.*, 2013). L'action anti-inflammatoire de la Chlorelle chez l'animal est moins connue et l'inhibition de la réponse inflammatoire par l'administration de Chlorelle par voie orale n'a pas été démontrée. Une étude réalisée par Azzat *et al.* (2010) a mis en évidence une réduction du stress oxydant chez le rat atteint de diabète et supplémenté en Chlorelle (*Chlorella vulgaris*), mais aucun effet de la



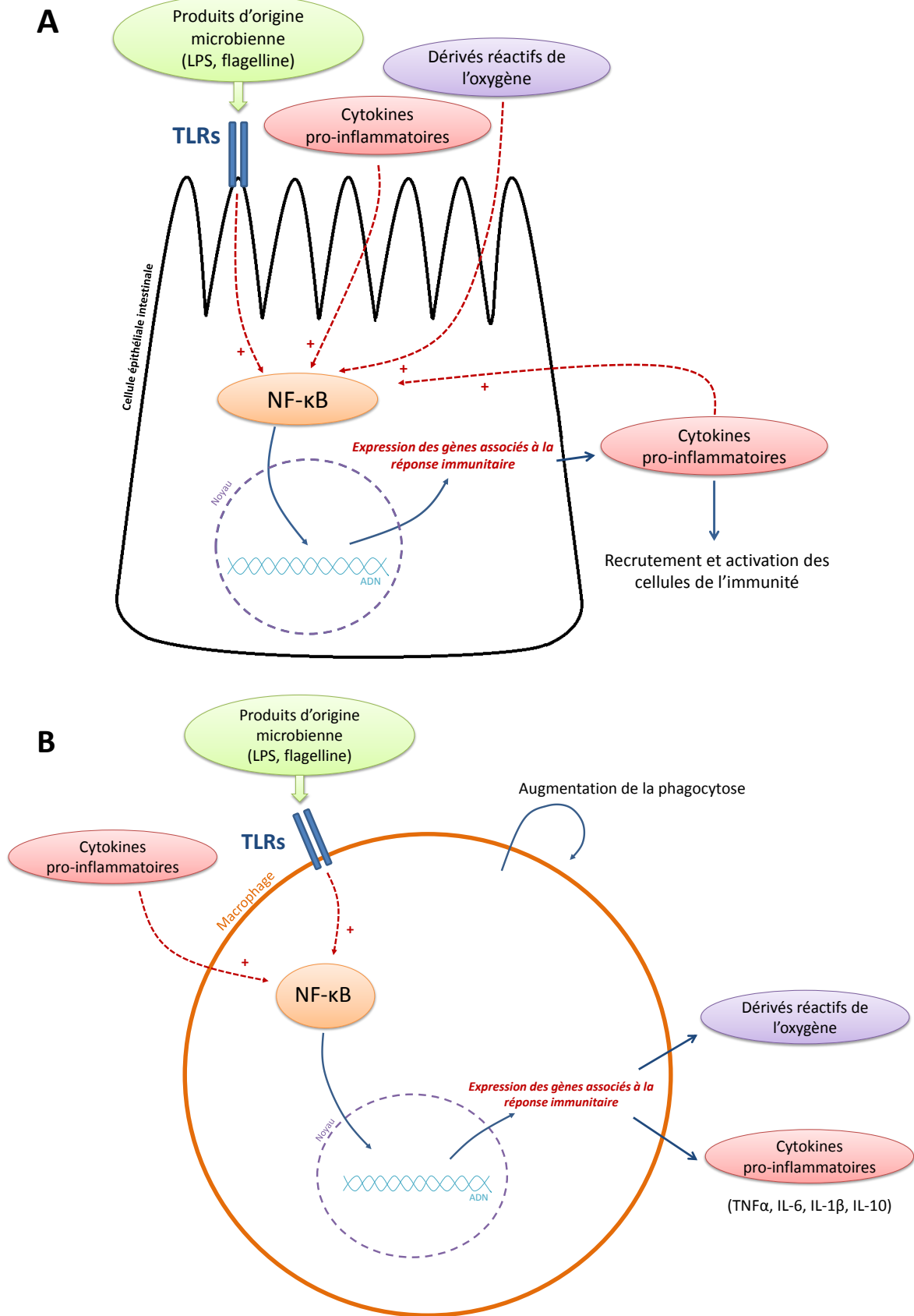


Figure 12 : Voies d'activation du facteur NF-κB et mécanismes associés dans les cellules épithéliales intestinales (A) et dans les phagocytes (B)

supplémentation n'a été observé sur la production de TNF $\alpha$  au niveau systémique. Toutefois, l'absence d'effet peut être relative au modèle expérimental utilisé dans cette étude, pour lequel le diabète n'était pas associé à une surproduction en cytokines pro-inflammatoires. Cherng *et al.* (2010) ont décrit une réduction du niveau systémique en TNF $\alpha$  chez le rat, mais dans un contexte d'application *in situ* d'un extrait de Chlorelle à base du peptide « Chlorelle-11 » dans un modèle de brûlure.

### *c. Conséquences sur la santé de l'hôte*

L'inflammation et l'accumulation de dérivés réactifs de l'oxygène sont responsables de la dégradation des tissus chez l'animal (Romay *et al.*, 1998b). Les pouvoirs antioxydant et antiinflammatoire des composés provenant de la Spiruline et de la Chlorelle favorisent la protection des tissus contre les agressions causées par l'inflammation et l'oxydation. L'administration de Spiruline ou de Chlorelle par voie orale prévient la dégradation de l'ADN et l'apoptose cellulaire ainsi que les altérations histologiques des tissus causée par le stress oxydant et l'inflammation (Aizzat *et al.*, 2010 ; Pak *et al.*, 2012). La réduction du stress oxydant et de l'inflammation causée par l'administration de phycocyanine par voie orale ou intrapéritonéale réduit également les altérations histopathologiques causées par l'inflammation et l'oxydation, telles que l'œdème (Romay *et al.*, 1998a ; Romay *et al.*, 1998b ; Romay *et al.*, 2001 ; Leung *et al.*, 2013).

## **3. Propriétés antimicrobiennes et action probiotique**

L'action de la Spiruline et de la Chlorelle sur les populations microbiennes a également fait l'objet d'investigations, dans un contexte de lutte contre les infections ou dans un contexte de modulation des populations microbiennes commensales du tube digestif chez l'animal et chez l'homme.

### *a. Activité antimicrobienne*

L'activité antimicrobienne des composants intracellulaires de la Spiruline et de la Chlorelle a été analysée *in vitro* en milieu de culture bactérienne (Ozdemir *et al.*, 2004 ; Mendiola *et al.*, 2007 ; Kitada *et al.*, 2009). Un certain nombre de composés extraits de la Spiruline (*Spirulina platensis*), dont la phycocyanine et certains acides gras (acide laurique, palmitoléique, oléique et  $\gamma$ -linoléique), possèdent un potentiel d'inhibition de la croissance bactérienne sur des souches bactériennes gram positives et négatives, notamment sur les Streptocoques, Staphylocoques, Entérobactéries dont *E. coli* et Salmonelles (Ozdemir *et al.*, 2004 ; Mendiola

Tableau 7 : Effets de la Spiruline et de la Chlorelle sur le statut oxydant et la réponse inflammatoire

Souche	Fraction / nom	Modèle	Conditions	Effets sur le statut oxydant	Effets sur la réponse inflammatoire	Mécanisme cellulaire associé	Informations supplémentaires	Auteurs
<i>Spirulina platensis</i>	Phycocyanine	<i>In vivo</i>	Rat recevant la phycocyanine par voie intrapéritonéale, 3h après injection de LPS par voie intratrachéale (inflammation pulmonaire)	Réduction des niveaux en ROS (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) et oxyde nitrique	Réduction des concentrations bronchoalvéolaires en cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ et IL-6 augmentées par l'exposition au LPS	Inhibition de l'activation du facteur NF- $\kappa$ B induite par l'exposition des cellules au LPS	Réduction de l'oedème pulmonaire causé par l'exposition au LPS	Leung <i>et al.</i> , 2013
<i>Spirulina platensis</i>	Extrait lipidique	<i>In vitro</i>	Culture de macrophages murins stimulés par l'administration de LPS	-	Réduction de l'expression en TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ et IL-6	Inhibition de l'activation du facteur NF- $\kappa$ B induite par l'exposition des cellules au LPS	-	Ku <i>et al.</i> , 2013
<i>Spirulina platensis</i>	Spiruline entière ou phycocyanine (en quantité égale à celle apportée par la Spiruline entière)	<i>In vivo</i>	Rat atteint de stéatohépatite non-alcoolique (responsable d'un stress oxydant au niveau du foie) recevant la Spiruline par voie orale	Réduction de la production en ROS par les leucocytes sanguins et par les mitochondries du foie.	-	Inhibition de l'activation du facteur NF- $\kappa$ B dans les hépatocytes induite par le stress oxydant	Normalisation du ratio de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> / T CD8 <sup>+</sup> dans le sang (augmenté chez les animaux atteints de stéatohépatite non-alcoolique). Réduction de l'atrophie du foie.	Pak <i>et al.</i> , 2012
<i>Spirulina platensis</i>	Phycocyanine	<i>In vitro</i>	Culture de macrophages murins stimulés par l'administration de LPS	Réduction de la production en oxyde nitrique	-	Inhibition de l'activation du facteur NF- $\kappa$ B induite par l'exposition des cellules au LPS	-	Cherng <i>et al.</i> , 2007
<i>Spirulina maxima</i>	Phycocyanine	<i>In vivo</i>	Souris recevant une injection intrapéritonéale de LPS	Réduction de la production en oxyde nitrique	Réduction de la concentration sérique en TNF $\alpha$	-	-	Romay <i>et al.</i> , 2001
<i>Chlorella</i> (souche non renseignée)	Peptide « Chlorella-11 »	<i>In vitro</i>	Culture de macrophages murins stimulés par l'administration de LPS	Réduction de la production en oxyde nitrique	Réduction de l'expression en TNF $\alpha$	Inhibition de l'activation du facteur NF- $\kappa$ B induite par l'exposition des cellules au LPS	-	Cherng <i>et al.</i> , 2010
<i>Chlorella</i> (souche non renseignée)	Peptide « Chlorella-11 »	<i>In vivo</i>	Rats subissant une brûlure au 2nd degré sur 30% de la surface corporelle, puis ajout de l'extrait peptidique sur la surface brûlée	Réduction de la concentration sérique en MDA (marqueur du stress oxydant)	Réduction de la concentration sérique en TNF $\alpha$	-	Réduction de l'érythème cutané causé par la brûlure	Cherng <i>et al.</i> , 2010

*et al.*, 2007 ; Bhowmik *et al.*, 2009 ; Sarada *et al.*, 2011 ; El-Sheekh *et al.*, 2014). Le potentiel antimicrobien de la Chlorelle est quant à lui peu référencé. Uma *et al.* (2011) ont mis en évidence une capacité modérée d'inhibition des extraits de Chlorelle (*Chlorella vulgaris*) sur la croissance de souches bactériennes gram positives et gram négatives dont *E. coli*.

### ***b. Action prébiotique***

La présence de constituants indigestibles dans les macro- et microalgues, notamment certains polysaccharides complexes, apportent un substrat permettant de favoriser la croissance de certaines populations microbiennes commensales (Michel et Macfarlane, 1996 ; Rasmussen *et al.*, 2009). Quelques auteurs ont recensé des effets de la supplémentation en Spiruline ou en Chlorelle sur le microbiote digestif mais les effets observés demeurent variables entre les études (Tableau 8). En milieu de culture, la Spiruline et la Chlorelle possèdent la capacité de stimuler la croissance des bactéries lactiques (de Caire *et al.*, 2000 ; Bhowmik *et al.*, 2009 ; Kitada *et al.*, 2009). L'action de la Spiruline sur le microbiote intestinal a également été montrée par approche *in vitro* et a révélé un effet stimulant sur la croissance des Bifidobactéries et des Lactobacilles, deux populations bactériennes jouant un rôle crucial dans l'homéostasie microbienne commensale (Liang *et al.*, 1998). A l'échelle de l'animal, les effets de la Spiruline et de la Chlorelle sur les bactéries commensales diffèrent selon les auteurs. Selon Rasmussen *et al.* (2009), la supplémentation en Spiruline stimule le développement de certaines souches de Clostridies et altère les populations de Bifidobactéries. La supplémentation en Spiruline tendrait donc à moduler la colonisation du tractus digestif par des populations microbiennes impliquées dans l'homéostasie du microbiote intestinal (Lopetuso *et al.*, 2013 ; Tojo *et al.*, 2014) dont les bénéfices ou les méfaits sur la santé de l'hôte restent indéterminés. Contrairement à Rasmussen *et al.* (2009), Bónai *et al.* (2012) n'ont observé aucun effet de l'incorporation en Spiruline sur les principaux phyla au niveau caecal chez le lapin. L'effet de la supplémentation en Chlorelle sur les populations microbiennes commensales présente des résultats relativement concordants entre les études. La supplémentation en Chlorelle a été associée, dans quelques études chez le porc ou la volaille, à une augmentation de la diversité ou de la concentration en Lactobacilles (Janczyk *et al.*, 2009 ; Yan *et al.*, 2012 ; Kang *et al.*, 2013), cohérente avec la stimulation de la croissance en bactéries lactiques en milieu de culture *in vitro*. Son action sur les autres populations bactériennes est aléatoire. Yan *et al.* (2012) ont observé une réduction de la concentration en *E. coli* chez le porcelet sevré recevant une supplémentation en Chlorelle à hauteur de 0,1 ou 0,2 % dans l'aliment mais ces résultats ne sont pas confirmés

Tableau 8 : Effets de la supplémentation en Spiruline et en Chlorelle sur les populations bactériennes commensales

Souche	Fraction / Taux d'incorporation dans l'aliment	Modèle	Méthode d'analyse	Site	Effet sur les populations bactériennes commensales	Auteurs
<i>Spirulina platensis</i>	Biomasse entière / 5%	Souris	Analyse des groupes bactériens par électrophorèse	Fèces	Altération d'une population commensale de bifidobactéries et enrichissement en clostridies	Rasmussen <i>et al.</i> , 2009
<i>Spirulina platensis</i>	Biomasse entière / 5%	Lapin	Comptage des colonies après croissance en milieu de culture	Contenu caecal	Aucun effet sur les principaux phyla	Bónai <i>et al.</i> , 2012
<i>Chlorella vulgaris</i>	Biomasse entière / 0,5%	Poule pondeuse	Analyse des groupes bactériens par électrophorèse	Contenu caecal	Augmentation de la diversité microbienne et augmentation de la diversité en souches de Lactobacilles	Janczyk <i>et al.</i> , 2009
<i>Chlorella vulgaris</i>	Biomasse entière séchée ou fraîche / 1%	Poulet de chair	Comptage de trois types de colonies ( <i>Lactobacillus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> ) après croissance en milieu de culture	Contenu caecal	Augmentation des populations de Lactobacilles chez les animaux recevant la Chlorelle fraîche. Aucun effet sur les populations de <i>E. coli</i> et Salmonelles	Kang <i>et al.</i> , 2013
<i>Chlorella vulgaris</i> (fermentée)	Biomasse fermentée / 0,1 ou 0,2%	Porc	Comptage de deux types de colonies ( <i>Lactobacillus</i> , <i>E. coli</i> ) après croissance en milieu de culture	Fèces	Augmentation des populations de Lactobacilles et diminution des populations de <i>E. coli</i>	Yan <i>et al.</i> , 2012

par les autres études (Janczyk *et al.*, 2009 ; Kang *et al.*, 2013). Toutefois, la Chlorelle utilisée dans l'étude de Yan *et al.* (2012) a subi un procédé de fermentation qui peut être partiellement responsable des effets observés. L'augmentation de la diversité microbienne apportée par la supplémentation en Chlorelle favorise la compétition entre communautés commensales et le maintien d'une homéostasie du microbiote digestif (Janczyk *et al.*, 2009).

## **C. Impact de la méthode de production de la biomasse microalgale sur sa qualité nutritionnelle et fonctionnelle**

### **1. Conditions de culture**

L'utilisation commerciale de la Chlorelle et de la Spiruline nécessite d'assurer une production de biomasse constante sur le plan quantitatif et qualitatif. La croissance des microalgues dans des conditions de culture optimales, c'est à dire répondant à leurs besoins nutritionnels et assurant une croissance optimale, apporte une composition chimique globalement invariable en termes de teneurs en protéines, lipides et glucides (Tableau 2; Hu, 2004). Toutefois, les microalgues ont une capacité importante à modifier leur métabolisme et par conséquent leur composition au sein d'une même espèce, en réponse à des environnements suboptimaux (Hu, 2004). La lumière, la température du milieu de culture et l'apport de nutriments tels que l'azote (Figure 13) représentent les principaux facteurs impactant à la fois la croissance et la composition des microalgues (Hu, 2004). Cette grande capacité d'adaptation à des environnements variés implique la nécessité de maîtriser l'ensemble des paramètres de culture afin d'assurer une composition constante de la biomasse. Toutefois, cette maîtrise n'est pas toujours réalisable, en particulier dans des systèmes de production extérieurs, où l'apport de lumière et la température dépendent de la saison (Hu, 2004). Tredici *et al.* (1991) ont notamment montré que selon le degré d'ensoleillement, la teneur en glucides de la Spiruline (*Spirulina platensis*) cultivée en extérieur variait, bien que la croissance soit faiblement affectée.

### **2. Procédés de traitement et de conditionnement de la biomasse**

#### ***a. Séchage de la biomasse algale***

Le séchage est une étape importante dans la production commerciale des microalgues, permettant de transformer la biomasse récoltée d'une teneur en MS de 5 à 15% à une teneur en MS de plus de 90% (Tokuşoglu et Ünüal, 2003 ; Molina Grima *et al.*, 2004 ; Parages *et al.*, 2012 ; Holman et Malau-Aduli, 2013). La biomasse liquide est instable et se détériore

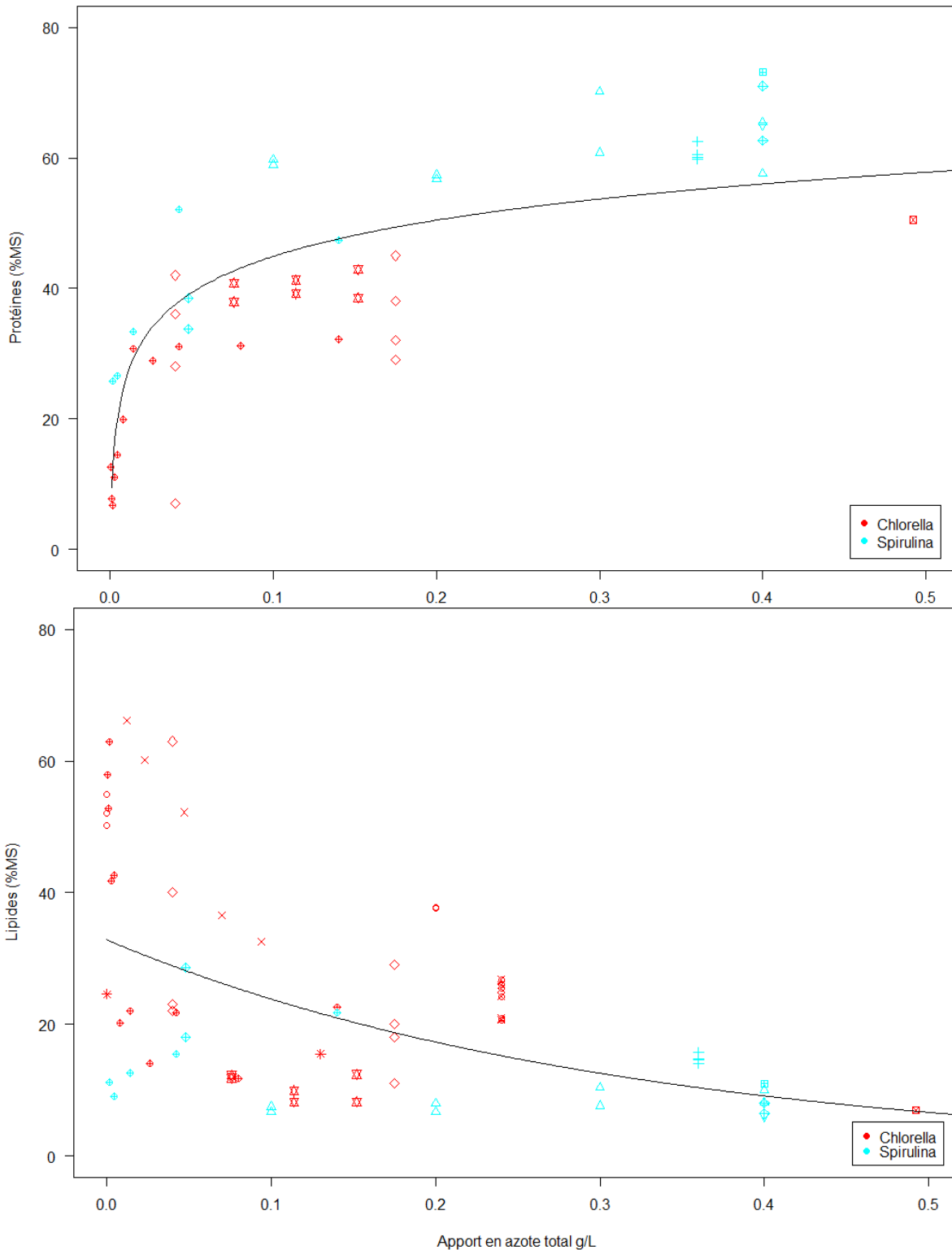


Figure 13 : Influence du niveau d'azote apporté au milieu de culture sur la concentration en protéines et en lipides de la Spiruline (*Spirulina sp.*) et de la Chlorelle (*Chlorella sp.*). Les données sont issues d'un panel d'études portant sur l'effet des méthodes de culture sur la composition des microalgues (Sources : Piorreck *et al.*, 1984 ; Volkman *et al.*, 1989 ; Ilman *et al.*, 2000 ; Morist *et al.*, 2001 ; Olguín *et al.*, 2001 ; Takeuchi *et al.*, 2002 ; Colla *et al.*, 2004 ; Danesi *et al.*, 2004 ; Vetayasuporn, 2004 ; Jaime-Ceballos *et al.*, 2006 ; Morris *et al.*, 2008 ; Hsieh et Wu, 2009 ; Singh *et al.*, 2011 ; Tang *et al.*, 2011 ; Mujtaba *et al.*, 2012 ; Chu *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2013). Les symboles représentent des études distinctes.

rapidement à température ambiante (Molina Grima *et al.*, 2004). Le séchage permet d'assurer son conditionnement et sa conservation pendant plusieurs années sans altération de sa composition chimique et nutritionnelle (Gershwin et Belay, 2007). Il existe de nombreuses méthodes de séchage de la biomasse algale (Gershwin et Belay, 2007). La méthode la plus répandue en production commerciale est le séchage par atomisation ou « spray-dry », car il est économique, réalisable à grande échelle et limite la dégradation des constituants principaux présents dans les microalgues (Molina Grima *et al.*, 2003 ; Gershwin et Belay, 2007). La biomasse algale est maintenue sous pression et pulvérisée dans une large chambre (1 à 10 mètres de diamètre) conduisant à la dissémination du produit sous forme de fines gouttelettes (Molina Grima *et al.*, 2004). La chambre est parcourue d'un flux d'air chaud (environ 150°C), qui permet l'évaporation de l'eau contenue dans les gouttelettes (Molina Grima *et al.*, 2004 ; Gershwin et Belay, 2007). Le séchage par atomisation est rapide (quelques secondes). Cette méthode de séchage peut toutefois causer la détérioration de certains composés sensibles à la chaleur, tels que les pigments (Molina Grima *et al.*, 2003). Les protéines et plus spécifiquement la phycocyanine présente dans la Spiruline, sont sensibles à l'élévation de température (Sarada *et al.*, 1999 ; Desmorieux et Hernandez, 2004). Ainsi, les procédés de séchage de la biomasse nécessitant l'application de traitements thermiques induisent une dégradation considérable de la protéine-pigment contenue dans la Spiruline (55% de la phycocyanine récupérée après le séchage spray-dry ; Sarada *et al.*, 1999). L'impact de la chaleur sur la qualité des composés bioactifs de la Spiruline et de la Chlorelle a tout particulièrement été mis en évidence dans le cadre de l'évaluation des composés à activité antimicrobienne, par Mendiola *et al.* (2007) et Kitada *et al.* (2009). Les auteurs ont évalué le pouvoir antimicrobien de différents extraits de Spiruline et de Chlorelle, obtenus à des températures d'extraction variables. Dans les deux études, l'activité antimicrobienne est décrite comme maximale aux températures d'extraction testées les plus faibles (27°C pour la Spiruline et 120°C pour la Chlorelle), suggérant que les composés capables d'inhiber la croissance des microorganismes présentent une sensibilité à l'élévation de la température.

### ***b. Rupture de la paroi cellulaire***

Certaines microalgues, dont *Chlorella vulgaris*, sont reconnues pour posséder une paroi cellulaire rigide et hautement résistante à la dégradation (Safi *et al.*, 2014a). Cette caractéristique, chez *Chlorella*, est supposée responsable de sa faible digestibilité et d'une mauvaise assimilation par l'animal (Janczyk, 2006 ; 2009). Dans l'étude de Janczyk *et al.*



Tableau 9 : Procédés de rupture de la paroi cellulaire : description, avantages et inconvénients

Méthode de rupture cellulaire	Description	Avantages	Inconvénients	Application grande échelle	Auteurs
Traitement acide	Destruction cellulaire en présence d'acide chlorhydrique ou sulfurique	- Destruction cellulaire jusqu'à 67 % de la biomasse	- Températures élevées - Dégradation de certaines molécules sensibles, dont les protéines et pigments	Oui	Mendes-Pinto <i>et al.</i> , 2001 ; Halim <i>et al.</i> , 2012
Traitement alcalin	Destruction cellulaire en présence d'hydroxyde de sodium	- Spiruline : 68 % de récupération en protéines - Chlorelle : 42 % de récupération en protéines	- Températures élevées - Dégradation de certaines molécules sensibles, dont les protéines et pigments	Oui	Mendes-Pinto <i>et al.</i> , 2001 ; Molina Grima <i>et al.</i> , 2003 ; Safi <i>et al.</i> , 2014b ; Günerken <i>et al.</i> , 2015
Trempe	Biomasse trempée dans l'éthanol absolu pendant 24 heures à température ambiante	- Pas d'élévation de la température	- Procédé long	Non	Serive <i>et al.</i> , 2012
Autoclave	Rupture par choc thermique (121-125°C)	- Destruction totale des parois cellulaires	- Elévation de la température et dégradation des constituants intracellulaires	Oui	Mendes-Pinto <i>et al.</i> , 2001 ; Gerde <i>et al.</i> , 2012
Homogénéisation à haute pression	Rupture cellulaire par cavitation et contrainte de cisaillement	- Reproductibilité - Spiruline : 76 % de récupération en protéines - Chlorelle : 52 % de récupération en protéines	- Peut dégrader certaines molécules sensibles	Oui	Safi <i>et al.</i> , 2014b ; Günerken <i>et al.</i> , 2015
Broyage à billes	Rupture mécanique	- Jusqu'à 99 % de destruction des parois cellulaires de la biomasse algale - Méthode simple - Reproductibilité	- Risque d'élévation de la température, nécessite refroidissement du système - Efficacité du broyage dépend de la méthode utilisée (taille et composition des billes, durée de broyage, concentration de la biomasse)	Oui (mais coûteuse en énergie)	Mendes-Pinto <i>et al.</i> , 2001 ; Doucha et Lívanský, 2008 ; Günerken <i>et al.</i> , 2015 ; Postma <i>et al.</i> , 2015
Cryo-broyage	Rupture mécanique (broyage en présence d'azote liquide)	- Conserve la biomasse algale à une température très basse - Préserve les constituants de la dégradation et de l'oxydation	- Nécessite la manipulation d'azote liquide	Non	Serive <i>et al.</i> , 2012
Lyse enzymatique	Dégradation de la paroi cellulaire par des enzymes	- Forte efficacité de destruction de la paroi cellulaire - Reproductibilité - Dégradation spécifique	- Méthode à adapter pour chaque espèce microalgale, selon la composition de la paroi cellulaire - Efficacité dépendante des enzymes utilisées - Procédé long et nécessitant une maîtrise des paramètres environnementaux (Température...) - Risque de dégradation de certains composés d'intérêt (selon enzymes)	Selon la méthode (disponibilité enzymes)	Fleurence, 1999 ; Mendes-Pinto <i>et al.</i> , 2001 ; Doucha et Lívanský, 2008 ; Günerken <i>et al.</i> , 2015
Micro-ondes	Rupture par choc thermique		- Elévation de la température et dégradation des constituants intracellulaires	Oui	Lee <i>et al.</i> , 2010 ; Gerde <i>et al.</i> , 2012 ; Günerken <i>et al.</i> , 2015
Choc osmotique	Réalisation en présence de NaCl		- Technique restreinte à des microalgues possédant une paroi cellulaire fragile (ou fragilisée)	Oui (mais coûteux en additifs et en traitement des déchets)	Middelberg, 1995 ; Prabakaran et Ravindran, 2011
Ultra-sons	Rupture cellulaire par cavitation	- Reproductibilité - Méthode simple	- Inefficace sur certaines espèces microalgales, dont Chlorelle - Risque d'élévation de la température (hot spots microscopiques jusqu'à 5000°C) - Production de radicaux libres (oxydation)	Non	Molina Grima <i>et al.</i> , 2003 ; Doucha et Lívanský, 2008 ; Gerde <i>et al.</i> , 2012 ; Halim <i>et al.</i> , 2012 ; Serive <i>et al.</i> , 2012 ; Günerken <i>et al.</i> , 2015

(2006), la supplémentation en Chlorelle à hauteur de 21% de la MS entraîne une diminution de la digestibilité fécale des protéines chez le rat (digestibilité fécale vraie de 53 vs. 89% pour un régime non supplémenté ; Janczyk, 2006). Janczyk *et al.* (2006) ont parallèlement montré que l'application d'un procédé technologique (ultrasons) induisant la rupture de la paroi cellulaire de la microalgue, augmentait la digestibilité des protéines des régimes supplémentés en Chlorelle à 21% de la MS (digestibilité fécale vraie de 63 vs. 53%). La rupture cellulaire est un procédé largement étudié pour permettre la récupération des composés intracellulaires d'intérêt présents dans les microalgues (Molina Grima *et al.*, 2003). De nombreuses méthodes de rupture cellulaire ont été développées pour les microorganismes et sont transposables aux microalgues (Tableau 9) (Molina Grima *et al.*, 2003). L'efficacité des procédés de rupture cellulaire est fortement dépendante de l'espèce microalgale utilisée (Safi *et al.*, 2014b). La Spiruline est composée d'une paroi fragile, essentiellement constituée de sucres aminés et d'oligopeptides, facilement destructibles, tandis que l'application de procédés agressifs est nécessaire pour détruire la paroi cellulaire riche en cellulose de la Chlorelle (Safi *et al.*, 2014b). L'une des principales limites associées aux méthodes de rupture cellulaire est leur applicabilité à grande échelle (Safi *et al.*, 2014a). Certaines méthodes de rupture de la paroi cellulaire sont uniquement applicables à l'échelle du laboratoire ou sont coûteuses pour une réalisation à l'échelle industrielle (Tableau 9). Par ailleurs, le risque de dégradation des composés intracellulaires limite l'applicabilité de certaines méthodes (Tableau 9) (Safi *et al.*, 2014b). Une grande majorité des procédés de rupture cellulaire recensés implique l'utilisation de températures élevées, responsables d'une dégradation des molécules sensibles à la chaleur (Tableau 9). La conservation de la biomasse à une température inférieure à 35°C pendant le procédé de rupture cellulaire est généralement nécessaire pour limiter l'élévation de la température et la dégradation ou l'oxydation des composés d'intérêt, notamment les protéines (Safi *et al.*, 2014a ; Postma *et al.*, 2015).



**Conclusion des chapitres I. et II.**

*La perte d'homéostasie dans le tractus digestif du porcelet au sevrage se caractérise par une stimulation des réponses immunitaires et inflammatoires, une altération des fonctions de digestion et de barrière intestinale, une déstabilisation des populations microbiennes commensales, conduisant à l'apparition de désordres digestifs et favorisant la colonisation du tractus digestif par des microorganismes pathogènes. L'émergence de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques représente un enjeu sanitaire majeur et conduit à la recherche d'alternatives pour limiter les conséquences néfastes du sevrage sur le système digestif du porcelet. Un vaste domaine de recherche se développe autour de l'identification d'ingrédients fonctionnels capables de stimuler adéquatement les défenses locales et d'orienter le microbiote intestinal, tout en favorisant la digestion et l'absorption des nutriments. Les effets de la Spiruline et de la Chlorelle sur la santé du porcelet sevré sont méconnus. Leurs propriétés antioxydantes, immunomodulatrices, antimicrobiennes et prébiotiques précédemment décrites pourraient favoriser la santé digestive du porcelet au sevrage.*

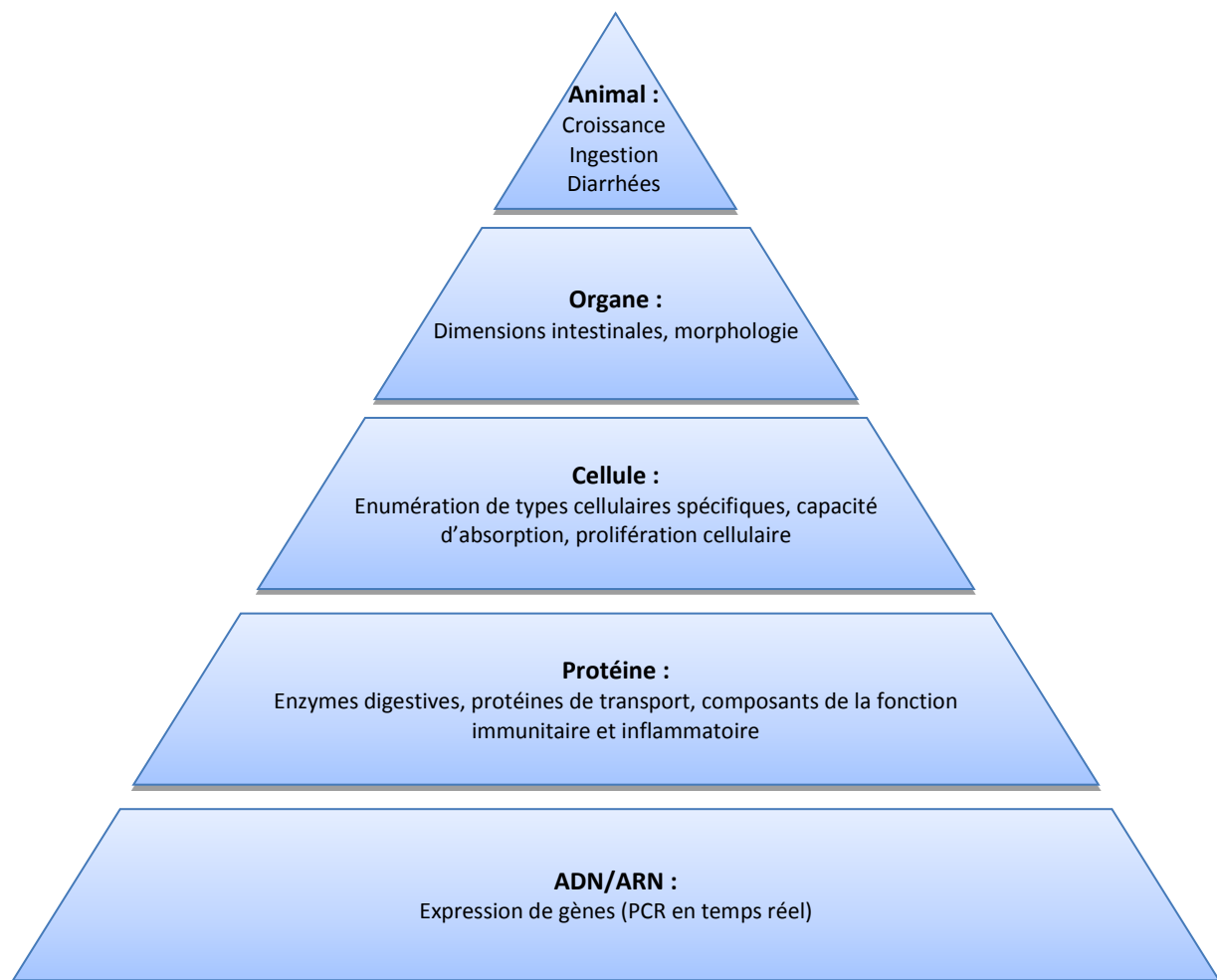


Figure 14 : Niveaux de définition des paramètres de la fonction digestive, selon Pluske *et al.* (2007)

## **Chapitre 3 : Caractérisation de la santé digestive : approche méthodologique**

### **A. Identification des marqueurs de la santé digestive**

La santé digestive dépend des interactions complexes prenant place dans le tractus gastro-intestinal entre la nutrition, la muqueuse du tractus digestif et les populations microbiennes commensales (Pluske *et al.*, 2007). La santé digestive est l'homéostasie de l'ensemble de ces paramètres, qui permet au système digestif d'assurer ses fonctions de digestion et d'absorption tandis qu'une perturbation de cette homéostasie conduit à l'apparition de maladies, y compris sub-cliniques. Caractériser la santé digestive dans sa globalité, nécessite de tenir compte de la multiplicité et de la complexité des mécanismes et des interactions qui prennent place dans le tractus digestif (Pluske *et al.*, 2007). Seule la combinaison d'analyses spécifiques et restreintes permet de décrire les mécanismes généraux sous-jacents aux fonctionnements du système digestif dans des situations contrastées (Pluske *et al.*, 2007). Pour obtenir une évaluation la plus complète possible de la santé et de la fonction digestive dans des conditions expérimentales données, il est nécessaire de multiplier les niveaux d'approche, depuis l'échelle de l'animal à l'échelle moléculaire (Figure 14). L'investigation simultanée des différents niveaux d'échelle (animal, organe, cellule, protéine, ADN ou ARN) permet de maximiser la validité des interprétations et limiter les conclusions erronées. A l'échelle de l'animal, la croissance, l'efficacité alimentaire, la morbidité, la mortalité, constituent des indicateurs primaires de la santé digestive et de la santé générale.

#### **1. Digestion et absorption des nutriments**

Toute altération de la santé digestive a pour répercussion une altération des fonctions de digestion et d'absorption des nutriments (Choct, 2009). A l'inverse, un animal possédant un système digestif sain, digèrera et utilisera les nutriments de manière plus efficiente (Choct, 2009). Les fonctions de digestion et d'absorption sont donc les premiers critères d'intérêt pour évaluer la santé digestive de l'animal. Parallèlement, il est nécessaire d'étudier ces fonctions pour l'évaluation d'additifs alimentaires, puisque certains ingrédients contiennent des facteurs dits « antinutritionnels » (de Lange *et al.*, 2010). Les facteurs antinutritionnels interfèrent avec les nutriments ingérés par des mécanismes divers, tels qu'en réduisant la digestibilité des protéines, en se liant à ces nutriments, en altérant la muqueuse intestinale ou en favorisant la compétition pour l'utilisation des nutriments entre le microbiote et l'hôte (Van der Klis et

Tableau 10 : Méthodes de mesure de l'utilisation digestive chez le porc : avantages et inconvénients

Méthode	Avantages	Inconvénients	Auteur
Digestibilité fécale	Méthode non invasive	Nécessite la collecte totale des fèces. La mesure de la digestibilité apparente ne tient pas compte de l'utilisation des nutriments par les fermentations microbiennes.	Lewis et Bayley, 1995
Cannulation iléale	Permet de mesurer la digestibilité des régimes en s'affranchissant des fermentations microbiennes dans le gros intestin. Permet d'obtenir une information quantitative et qualitative du flux, de la composition, de la sécrétion et de la digestion, selon la méthode utilisée. Plusieurs mesures peuvent être réalisées au cours du temps.	Nécessite l'utilisation de marqueurs indigestibles pour le calcul de la digestibilité, dont le choix est difficile car la majorité des marqueurs traversent le tractus digestif indépendamment des composants alimentaires (solubilité, gravité etc...) La pose des cannules peut interférer avec les flux et les fonctions sécrétoires et altérer la physiologie du tractus digestif.	Lewis et Bayley, 1995 ; Moughan et Miner-Williams, 2013
Anastomose iléo-rectale	Permet de mesurer la digestibilité des régimes en s'affranchissant des fermentations microbiennes dans le gros intestin. Ne nécessite pas l'utilisation de marqueurs (collecte complète).	L'anastomose entraîne une adaptation compensatoire du tractus digestif qui impacte la morphologie intestinale. Chirurgie complexe qui induit un temps de récupération plus long pour l'animal. Technique moins fiable avec des régimes à haute teneur en fibres. Risque de fermentations microbiennes en fin de tractus digestif.	Köhler <i>et al.</i> , 1992 ; Laplace <i>et al.</i> , 1994 ; Redlich <i>et al.</i> , 1997 ; Moughan et Miner-Williams, 2013
Abattage	Permet d'étudier la digestibilité des nutriments à différents points du tractus digestif	Nécessite l'utilisation de marqueurs indigestibles pour le calcul de la digestibilité, dont le choix est difficile car la majorité des marqueurs traversent le tractus digestif indépendamment des composants alimentaires (solubilité, gravité etc...) Ne permet qu'une seule mesure par animal. Peu de contenu digestif récupérable. Difficulté à déterminer le temps optimal pour l'abattage des animaux.	Lewis et Bayley, 1995 ; Moughan et Miner-Williams, 2013
Cathétérisation	Permet de mesurer en cinétique les nutriments absorbés par voie passive ou active au travers de l'intestin et disponibles pour le métabolisme de l'animal	Variabilité Méthode nécessitant une chirurgie. Interfère avec les paramètres de santé de l'animal.	Knudsen <i>et al.</i> , 2006

Jansman, 2002 ; de Lange *et al.*, 2010). Enfin, il est nécessaire de relier les paramètres de santé digestive et les paramètres de croissance pour prédire l'importance des indicateurs de la santé digestive et pour déterminer leur impact dans le contexte d'une altération de la croissance au cours d'un état de santé digestive compromise (Van der Klis et Jansman, 2002).

#### *a. Mesure de l'utilisation digestive in vivo*

Un certain nombre de méthodes ont été développées pour déterminer l'utilisation des nutriments par l'animal. L'ensemble de ces méthodes possèdent leurs propres avantages et inconvénients (Tableau 10). Les méthodes *in vivo* permettant de déterminer l'utilisation digestive des nutriments apportés par le régime nécessitent toutes l'isolement des animaux pour réaliser des mesures à l'échelle de l'individu. Trois méthodes sont principalement référencées pour évaluer la digestion et l'absorption des nutriments apportés par l'alimentation. La digestibilité fécale consiste à comparer la quantité de nutriments ingérés et la quantité de nutriments excrétés par l'animal, par le calcul d'un coefficient d'utilisation digestive selon la formule suivante :

$$\text{CUD}_X = \frac{X_{\text{ingéré}} - X_{\text{excrété}}}{X_{\text{ingéré}}} \times 100$$

Où  $X_{\text{ingéré}}$  est la quantité de nutriment ingérée et  $X_{\text{excrété}}$  la quantité de nutriment excrétée dans les fèces.

Cette méthode non invasive ne nécessite pas l'utilisation de marqueurs spécifiques pour caractériser les flux de nutriments dans le tractus digestif. Elle nécessite cependant de mesurer la quantité d'aliment totale ingérée par l'animal et de collecter la totalité des fèces excrétées par l'animal au cours de la période de mesure. La principale limite de cette méthode est que les fermentations microbiennes prenant place dans le tractus digestif modifient les flux de nutriments ingérés jusqu'aux fèces des animaux, en particulier les acides aminés. En outre, ces fermentations conduisent à l'apparition ou la disparition de certains nutriments inutilisés par l'animal, en fin de tractus digestif, correspondant aux produits ou aux nutriments utilisés par les populations microbiennes commensales (Lewis et Bayley, 1995). En conséquence, la mesure de la digestibilité apparente par comparaison des nutriments ingérés et des nutriments excrétés ne permettent pas de définir la part de nutriments utilisés uniquement par l'animal (Lewis et Bayley, 1995). Afin de s'affranchir des fermentations microbiennes impactant les mesures de l'utilisation digestive propre à l'animal, des méthodes ont été développées afin de mesurer les flux de nutriments au niveau distal de l'iléon, telles que l'anastomose iléo-rectale ou la canulation. Ces méthodes se basent sur le fait que la disparition des nutriments dans la



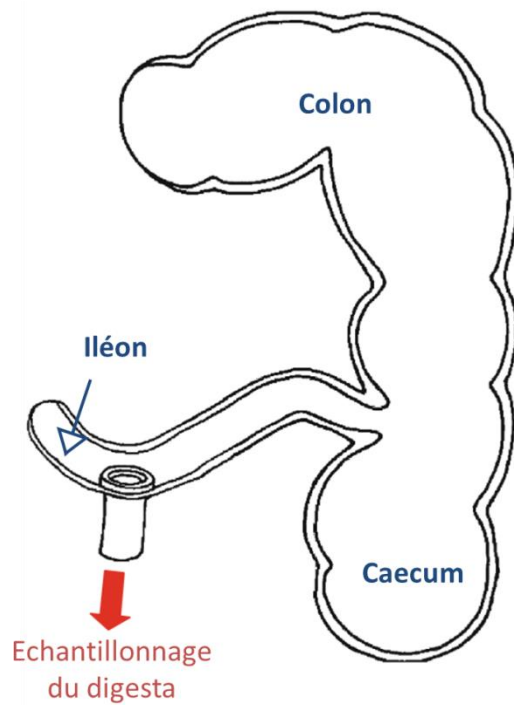


Figure 15 : Mesure de la digestibilité iléale par l'implantation d'une cannule. Exemple de la cannule simple. Selon Moughan et Miner-Williams (2013).

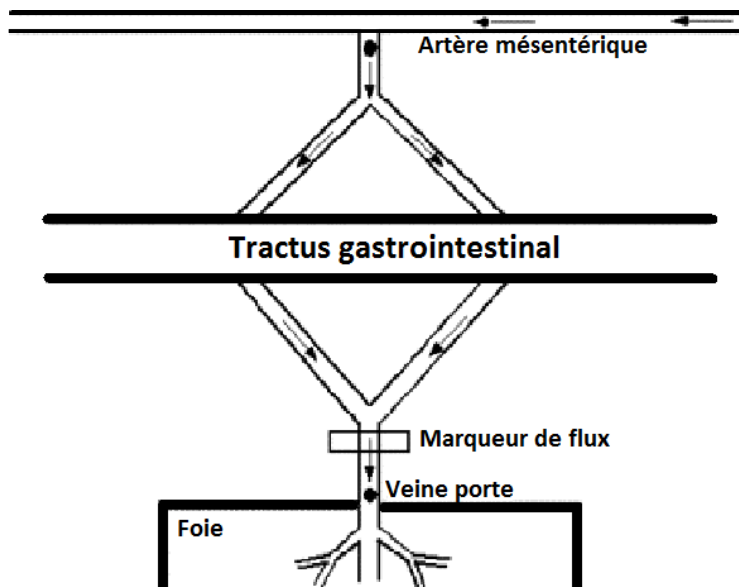


Figure 16 : Mesure de l'absorption des nutriments par la méthode des cathéters. Selon Knudsen *et al.* (2006)

partie terminale de l'iléon résulte de la digestion enzymatique et de l'absorption intestinale et que les dégradations microbiennes à cette localisation de l'intestin sont limitées (Lewis et Bayley, 1995). L'anastomose iléo-rectale est une méthode chirurgicale consistant à isoler le caecum et le gros intestin du restant du tractus digestif, en reliant l'iléon terminal au rectum de l'animal (Laplace *et al.*, 1994). La digestibilité iléale chez les animaux ayant subi l'anastomose est alors mesurée selon le même principe que pour la digestibilité fécale, en mesurant les nutriments excrétés dans les jus iléaux et non dans les fèces. La canulation est un procédé permettant l'accès au contenu iléal de l'animal vigile par implantation d'une canule (Figure 15). La méthode fait donc également appel à la chirurgie. La digestibilité iléale des nutriments est réalisée à l'aide d'un marqueur indigestible. Les coefficients d'utilisation digestive sont mesurés par comparaison des ratios entre la concentration en nutriments et en marqueur indigestible dans l'aliment et dans les jus iléaux, selon le calcul suivant :

$$\text{CUD}_x = 1 - \frac{[X]_{\text{excrété}} / [M]_{\text{excrété}}}{[X]_{\text{ingéré}} / [M]_{\text{ingéré}}}$$

Où  $[X]_{\text{excrété}}$  correspond à la concentration en nutriments dans les jus iléaux,  $[M]_{\text{excrété}}$  correspond à la concentration en marqueur dans les jus iléaux,  $[X]_{\text{ingéré}}$  correspond à la concentration en nutriments dans l'aliment ingéré et  $[M]_{\text{ingéré}}$  correspond à la concentration en marqueur dans l'aliment ingéré.

Il est également possible de mesurer la fonction d'absorption en mesurant les nutriments au niveau sanguin. L'utilisation de cathéters permet de mesurer l'absorption des nutriments par l'intestin après un repas et leur passage dans le sang. Sous anesthésie, deux cathéters sont implantés au niveau de la veine porte et d'une artère au niveau du mésentère respectivement, ce dernier apportant une infusion continue avec un marqueur, permettant le contrôle du flux sanguin (Figure 16 ; Knudsen *et al.*, 2006). Au même titre que les méthodes utilisées pour l'étude de la digestibilité iléale, les mesures par implantation de cathéters nécessitent une intervention chirurgicale interférant avec les paramètres de santé de l'animal.

### ***b. Analyse de l'activité enzymatique***

L'activité enzymatique dans l'intestin apporte une information sur la capacité digestive de l'animal. Dans une étude de Montagne *et al.* (2007), l'activité de la lactase et de la maltase sont considérées comme des marqueurs des phases aiguës et adaptatives au stress du sevrage



respectivement et sont proposées en tant qu'indicateurs de la maturation du système digestif. Cependant, mesurer l'activité des enzymes digestives ne donne qu'une information partielle sur la capacité de digestion de l'animal. Nir *et al.* (1973) ont notamment observé que pour des niveaux d'activité en enzymes digestives variables, la digestibilité des nutriments était similaire.

### *c. Etude de la morphologie intestinale*

La morphologie de la muqueuse intestinale est un indicateur de la fonctionnalité de l'intestin. La morphométrie des villosités et des cryptes intestinales est une mesure largement utilisée pour étudier la santé digestive du porcelet sevré. L'épithélium bordant les villosités intestinales sont composés à 95% d'entérocytes, responsables de l'absorption de nutriments et de la production d'enzymes digestives (Cheng et Leblond, 1974 ; Smith, 1985). La hauteur des villosités de l'intestin est représentative des fonctions de digestion et d'absorption dans l'intestin grêle (Heo *et al.*, 2013) tandis que la profondeur des cryptes est associée à la prolifération et donc au turnover cellulaire de l'épithélium intestinal (Pluske *et al.*, 1996). Le sevrage est associé à une réduction de la taille des villosités et à une hyperplasie des cryptes, qui est caractéristique de la perte des fonctions de digestion et d'absorption de l'intestin (voir figures 3 et 4 ; Heo *et al.*, 2013). Les mesures de hauteur des villosités, de profondeur des cryptes et de ratio entre la hauteur des villosités et la profondeur des cryptes donnent donc des informations sur le statut fonctionnel de l'intestin et sur la balance entre les fonctions de digestion et de maintenance. Il est toutefois difficile d'effectuer une comparaison de la morphologie intestinale entre différentes expériences car il n'existe pas de valeur de référence et que la morphologie dépend de nombreux facteurs, tels que l'âge, la génétique, le régime alimentaire ou les conditions expérimentales (Heo *et al.*, 2013).

## **2. Etude des fonctions de défense**

Il est généralement admis que pour favoriser les performances de croissance, il est nécessaire d'optimiser les fonctions de digestion, d'absorption et de barrière intestinale, en limitant l'utilisation des nutriments pour les réponses immunitaires et inflammatoires (Van der Klis et Jansman, 2002). Parallèlement, l'activation du système immunitaire est considérée comme un levier important pour lutter contre l'infection en post-sevrage, d'autant plus que le porcelet est soumis à la disparition de la protection immunitaire apportée par le lait de la mère. L'enjeu est donc de stimuler adéquatement les réponses immunitaires pour favoriser la défense de l'hôte contre les pathogènes, tout en limitant les effets néfastes d'une sur-stimulation des cellules

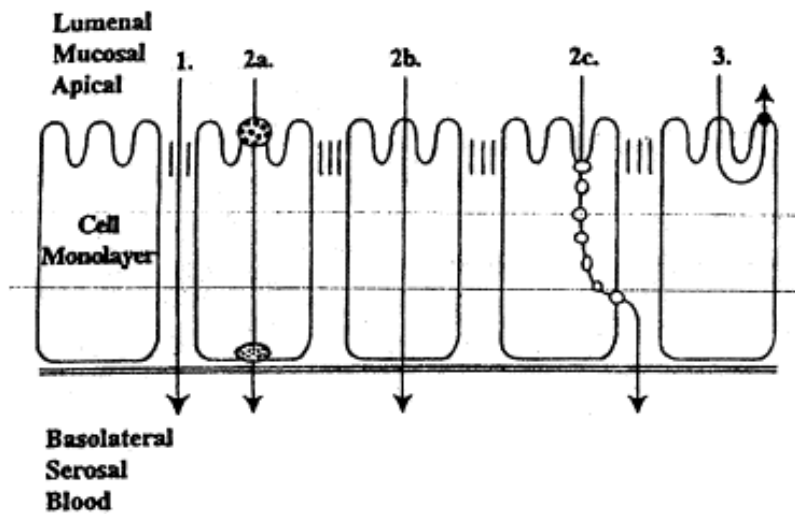


Figure 17 : Voies de transport de molécules au travers de l'épithélium intestinal : (1) Transport par voie paracellulaire; (2) Transport par voie transcellulaire : (2a) médié par un transporteur, (2b) voie passive, (2c) endocytose médiée par un récepteur ; (3) efflux médié par un transporteur. D'après Balimane *et al.* (2000).

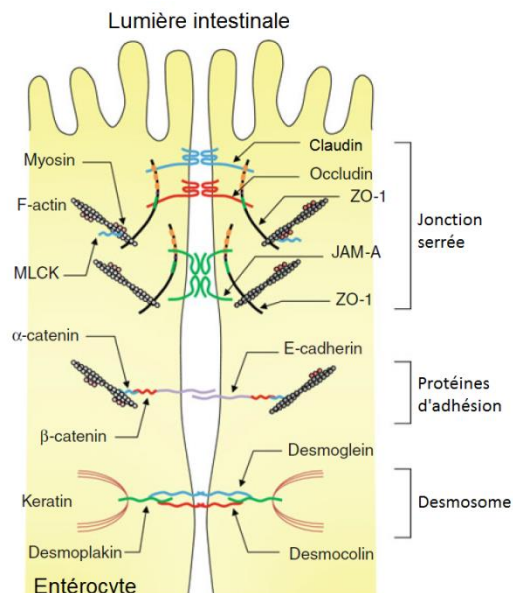


Figure 18 : Protéines de jonction des cellules épithéliales intestinales. D'après Suzuki, 2013.

*La jonction intercellulaire des cellules épithéliales intestinales est assurée par des complexes protéiques, incluant les jonctions serrées, les protéines d'adhésion et les desmosomes. Les complexes protéiques construisant les jonctions serrées (occludin, claudins, JAMs et tricellulins) forment des boucles extracellulaires et créent une barrière sélective contre le passage de molécules par la voie paracellulaire. Les protéines de type zonula ocludens (ZO-1) assurent l'ancrage des complexes protéiques transmembranaires au cytosquelette. La perméabilité paracellulaire est régulée par les « myosin light chain kinases » (MLCK) par contractilité de la myosine. Les protéines d'adhésion et les desmosomes assurent la cohésion des cellules entre elles et la communication intercellulaire mais n'interviennent pas dans la régulation de la perméabilité paracellulaire.*

immunitaires sur la croissance et l'inflammation. Deux grandes fonctions permettent de répondre à cet enjeu. D'une part, la fonction de barrière physique est assurée par les sécrétions de mucus et de molécules antimicrobiennes en surface de l'épithélium intestinal, ainsi que par les jonctions des cellules de proche en proche qui permettent de filtrer le passage d'antigènes vers la lamina propria. D'autre part, la fonction immunitaire assure la défense de l'hôte contre les microorganismes pathogènes.

#### *a. La fonction de barrière*

Le transport de molécules depuis la lumière intestinale vers la lamina propria peut se réaliser soit par diffusion passive entre les jonctions serrées reliant les cellules épithéliales ou par transport transcellulaire, impliquant ou non une endocytose, médiée ou non par un transporteur cellulaire (Figure 17 ; Balimane *et al.*, 2000 ; Menard *et al.*, 2010). L'absorption intestinale est le transport des nutriments depuis la lumière vers la lamina propria par voie transcellulaire passive ou active, à l'aide d'un transporteur (Wijten *et al.*, 2011). La fonction de barrière quant à elle, est assurée d'une part par la détection sélective des antigènes et macromolécules transportés par endocytose vers les cellules de l'immunité, d'autre part par la présence de jonctions serrées qui scellent les cellules épithéliales entre elles de sorte à ne laisser passer que les molécules de petite taille (eau, ions) (Wijten *et al.*, 2011).

#### *- Evaluation de la structure de l'intestin*

Les jonctions serrées, situées au niveau apical des cellules épithéliales intestinales, empêchent la diffusion paracellulaire de substances potentiellement agressives pour l'hôte depuis la lumière intestinale vers la lamina propria (Figure 18 ; Arrieta *et al.*, 2006 ; Ma et Anderson, 2006 ; Suzuki, 2013). La littérature montre que les jonctions serrées de l'épithélium intestinal jouent un rôle critique dans la pathogénèse des maladies intestinales et des maladies systémiques (Suzuki, 2013). La rupture de la barrière paracellulaire conduit à l'altération des transports intercellulaires et à l'inflammation par l'endommagement du tissu ou par le passage d'antigènes dans la lamina propria (Ma et Anderson, 2006). L'abondance et la régulation de la synthèse des protéines composant les jonctions serrées apportent une information sur le statut de la fonction de barrière (Suzuki, 2013 ; Akbari *et al.*, 2016). L'abondance des jonctions serrées au sein de l'épithélium intestinal peut être déterminée par plusieurs méthodes de laboratoire utilisées pour la quantification de protéines, telles que le Western Blot, qui permet une quantification globale des protéines dans un tissu (Kimura *et al.*, 1997) ou l'immunohistochimie (Kimura *et al.*, 1997 ; Johnson, 2005). L'immunohistochimie consiste à

Tableau 11 : Méthodes de mesure *in vivo* et *ex vivo* des transports de molécules au travers de l'épithélium intestinal

	Taille de la molécule (Da)	Mode de transport
<b>Transports <i>in vivo</i></b>		
Marqueurs		
Bovine serum albumin	66 000	Transcellulaire par endocytose
Lactulose	342	Paracellulaire
Mannitol	182	Majoritairement par voie paracellulaire mais voie transcellulaire ne peut pas être exclue
L-Rhamnose	164	Transcellulaire (pores aqueux) ou paracellulaire
D-Xylose	150	Transcellulaire par voie passive, paracellulaire, ou transcellulaire médié par un transporteur
<b>Transports <i>ex vivo</i> (Chambres d'Ussing)</b>		
Marqueurs		
Ovalbumine	45 000	Transcellulaire par endocytose
Horseradish peroxidase (HRP)	40 000	Transcellulaire par endocytose et paracellulaire à travers les jonctions serrées
Na-Flu	376	Transcellulaire par voie passive
Mannitol	182	Majoritairement par voie paracellulaire mais voie transcellulaire ne peut pas être exclue
D-Glucose	180	Transcellulaire, médié par un transporteur
Glutamine	146	Transcellulaire, médié par un transporteur
Glycylsarcosine	146	Transcellulaire, médié par transporteur H <sup>+</sup>
Mesures indirectes à l'aide des paramètres électrophysiologiques		
TEER		Reflète transport paracellulaire
Conductance		Mesure inverse au TEER
Courant de court-circuit		Mesure le transport actif d'ions et donne une indication sur le mouvement d'eau et l'absorption de glucose et d'acides aminés dépendants des électrolytes

mesurer les protéines d'intérêt dans les cellules d'un tissu par microscopie après immuno-marquage des protéines (Johnson, 2005). Les antigènes spécifiques des protéines d'intérêt sont identifiés à l'aide d'anticorps marqués et localisés par coloration ou fluorescence (Johnson, 2005). Cette méthode permet à la fois la quantification et la localisation géographique des jonctions serrées (Johnson, 2005). L'analyse de l'expression des jonctions serrées par PCR en temps réel est également une technique largement utilisée pour caractériser la régulation de la synthèse des jonctions serrées (Suzuki, 2013).

*- Mesure des flux de molécules au travers de la barrière intestinale*

Les méthodes utilisées pour mesurer les flux de molécules au travers de la muqueuse intestinale sont communes pour l'ensemble des voies de transport utilisé (voir Figure 17). Les approches *in vivo* et *ex vivo* décrites ci-dessous permettent donc de mesurer non seulement la fonction de barrière intestinale, mais également des paramètres de la fonction d'absorption des nutriments.

Le passage de molécules au travers de l'intestin peut être quantifiée *in vivo* par administration orale de marqueurs non métabolisables (Wijttten *et al.*, 2011). Les marqueurs utilisés sont généralement des mono- ou disaccharides qui ne sont pas toxiques, ne sont pas dégradés par les enzymes digestives, ne sont pas métabolisés par l'organisme et lorsqu'ils traversent l'épithélium intestinal, sont directement excrétés dans les urines (Bjarnason *et al.*, 1995 ; Wijttten *et al.*, 2011). Par conséquent, il est possible de mesurer le passage des marqueurs au travers de la muqueuse intestinale en dosant leur présence dans le sang ou dans les urines de l'animal. Selon leur mode de transport au travers de l'épithélium intestinal, ils apportent une information sur la fonction d'absorption ou sur la fonction de barrière de l'intestin (Tableau 11 ; Wijttten *et al.*, 2011). Cette approche *in vivo* présente l'intérêt de permettre la mesure des fonctions d'absorption et de perméabilité intestinale sans mise à mort de l'animal. Par conséquent, elle permet également de réaliser des mesures répétées pour un même animal et de mettre en corrélation avec les mesures zootechniques (Wijttten *et al.*, 2011). Néanmoins, elle ne permet pas d'étudier de manière spécifique des sections distinctes de l'intestin (Wijttten *et al.*, 2011). Par ailleurs, les résultats obtenus peuvent être influencés par un large nombre de paramètres propres à l'animal, tels que le temps de transit, les fermentations microbiennes, le métabolisme, la production endogène ou encore la fonction rénale (Wijttten *et al.*, 2011).

La seconde méthode couramment utilisée pour mesurer le transport de molécules à travers la muqueuse intestinale est la méthode des chambres d'Ussing. Elle consiste à monter une section de muqueuse intestinale entre deux chambres, représentatives des milieux muqueux



Tableau 12 : Paramètres immunitaires généralement mesurés lors de l'évaluation d'additifs au potentiel immunomodulateur

Echelle	Site	Marqueur	Méthode	Information	Auteur
<i>In vivo</i>	Systémique (plasma ou sérum)				
	Protéines de la phase inflammatoire aigüe	Haptoglobine	Test colorimétrique (enzymatique)	Protéines de la phase aigüe libérées rapidement lors de l'infection ou de l'inflammation	Hiss et Sauerwein, 2003
		C-reactive protein (CRP)			Ilsley <i>et al.</i> , 2005
	Immunoglobulines circulantes	IgA	Test ELISA	Représentatives de la réponse humorale (adaptive)	Ilsley <i>et al.</i> , 2005 ; Liu <i>et al.</i> , 2010 ; Li <i>et al.</i> , 2012
		IgG			Ilsley <i>et al.</i> , 2005 ; Broom <i>et al.</i> , 2006 ; Kong <i>et al.</i> , 2007 ; Li <i>et al.</i> , 2012 ; Cho <i>et al.</i> , 2006
		IgM			Kong <i>et al.</i> , 2007 ; Li <i>et al.</i> , 2012
	Cytokines circulantes	Pro-inflammatoires (IL-6, IL-1, IL-2, TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ...)	Test ELISA		Li <i>et al.</i> , 2008 ; Liu <i>et al.</i> , 2010 ; Li <i>et al.</i> , 2012 ; Ilsley <i>et al.</i> , 2005 ; Carroll <i>et al.</i> , 2003 ; Kong <i>et al.</i> , 2007 ; Shen <i>et al.</i> , 2009
		Anti-inflammatoires (IL-10)			Shen <i>et al.</i> , 2009 ; Liu <i>et al.</i> , 2010
	Cellules de l'immunité	Leucocytes (globules blancs)	Comptage des types cellulaires. La distinction des lymphocytes T helpers ou cytotoxiques et des macrophages peut se réaliser à l'aide d'anticorps spécifiques des protéines de surface (CD3, CD4, CD8...)		Davis <i>et al.</i> , 2004 ; Cho <i>et al.</i> , 2006 ; Shen <i>et al.</i> , 2009
	Tissu (intestin)				
Immunoglobulines	IgA	Test ELISA	Les IgA sécrétées par la muqueuse neutralisent les bactéries. Représentatives de la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'IgA.	Broom <i>et al.</i> , 2006 ; Johnson <i>et al.</i> , 2006 ; Liu <i>et al.</i> , 2010	
Cytokines	Pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ ) Anti-inflammatoires (IL-10)	Analyse de l'expression de gènes par PCR en temps réel		Reilly <i>et al.</i> , 2008 ; Leonard <i>et al.</i> , 2011 ; Leonard <i>et al.</i> , 2012 Reilly <i>et al.</i> , 2008 ; Leonard <i>et al.</i> , 2011 ; Leonard <i>et al.</i> , 2012	
Cellules de l'immunité	Leucocytes (dans les tissus lymphoïdes ou dans la lamina propria)	Comptage des types cellulaires. La distinction des lymphocytes T helpers ou cytotoxiques et des macrophages peut se réaliser à l'aide d'anticorps spécifiques des protéines de surface (CD3, CD4, CD8...)		Davis <i>et al.</i> , 2004 ; Johnson <i>et al.</i> , 2006 ; Manzanilla <i>et al.</i> , 2006	
<i>Ex vivo</i>	Lymphocytes extraits de la circulation sanguine périphérique, mis en culture puis exposés à un facteur mitogène (exemple Concanavalin A)	Prolifération des lymphocytes		Li <i>et al.</i> , 2012 ; Hiss et Sauerwein, 2003 ; Davis <i>et al.</i> , 2004	
		Production de cytokines par les cellules de l'immunité		Johnson <i>et al.</i> , 2006	

(lumière intestinale) et séreux (lamina propria), et de mesurer le passage de marqueurs depuis le côté muqueux vers le côté séreux du tissu. Au même titre que la méthode *in vivo*, selon le mode de passage, le transport de molécules au travers de la muqueuse intestinale permet d'étudier sa fonction d'absorption et/ou sa fonction de barrière (Tableau 11 ; Wijtten *et al.*, 2011). Contrairement à la méthode par administration de marqueurs *in vivo*, la méthode des chambres d'Ussing permet de réaliser des mesures à des sites spécifiques. Néanmoins, la méthode est plus contraignante, puisqu'elle nécessite la mise à mort de l'animal et ne permet de réaliser qu'une mesure ponctuelle par individu.

#### ***b. Mesure des réponses immunitaires et inflammatoires***

Il existe un large éventail de marqueurs permettant l'analyse des réponses associées au système immunitaire, allant de l'échelle de l'animal à l'échelle moléculaire (Albers *et al.*, 2005). La morbidité et la mortalité constituent des indicateurs primaires pertinents pour évaluer les défenses globales de l'hôte dans des conditions d'exposition à un pathogène (Albers *et al.*, 2005). A l'échelle du tissu ou de la cellule, les principaux marqueurs utilisés pour étudier la modulation des réponses immunitaires et inflammatoires dans le cadre de l'utilisation d'additifs alimentaire pour la santé digestive au sevrage sont résumés dans le tableau 12. De nombreuses méthodes *ex-vivo* permettent d'étudier les spécificités fonctionnelles des cellules de l'immunité (phagocytose, oxydation, production de cytokines) (Albers *et al.*, 2005). Enfin, des marqueurs de l'immunité peuvent être utilisés afin d'étudier l'activité immunitaire *in vivo* au niveau systémique ou local (immunoglobulines, leucocytes, cytokines) (Tableau 12 ; Albers *et al.*, 2005).

### **3. Caractérisation des populations microbiennes commensales**

Une large diversité de facteurs influence la composition du microbiote digestif, tels que les agents antimicrobiens, la composition de l'aliment, les procédés appliqués à l'aliment (granulation), la maladie, le stress ou la génétique (Pluske *et al.*, 2007). Cette diversité de facteurs impliqués dans le développement des populations microbiennes commensales rendent son étude difficile. Elle montre également que ces populations microbiennes peuvent être influencées par l'alimentation (Pluske *et al.*, 2007). Manipuler le microbiote est peu simple, puisqu'il peut à la fois promouvoir la santé et la fonction digestive mais également affaiblir la dynamique et l'homéostasie du système digestif (Pluske *et al.*, 2007). Des niveaux « cible » et des niveaux « à risque » ont été décrits par Apajalahti et Kettunen (2006) afin de définir des orientations microbiennes d'intérêt pour la santé digestive (Tableau 13).

Tableau 13 : Exemples d'activités microbiennes « cible » et « à risque » pour la santé et les performances de croissance chez l'animal, selon Apajalahti et Kettunen (2006)

Exemple d'activité microbienne	Niveau "cible"	Niveau "à risque"
Croissance bactérienne générale dans l'intestin grêle	Restreinte	Croissance élevée
Effet sur la morphologie intestinale	Stabilisation	Rupture, déformation
Croissance des pathogènes	Suppression	Promotion
Adhérence des pathogènes	Empêchement	Facilitation
Activation de l'immunité	Stimulation	Suppression
Production d'acide lactique	Normale	Accumulation
Activité putréfactive (exemple : indole, cresol, scatole, NH <sub>3</sub> )	Restreinte	Elevée

#### 4. Approche clinique des troubles digestifs chez le porc et chez l'homme

L'approche clinique des diarrhées s'effectue généralement par une évaluation visuelle de la consistance des déjections de l'animal. L'utilisation d'une grille de notation permet de classer visuellement les fèces des animaux selon leur consistance et ainsi déterminer la sévérité des diarrhées (Adewole *et al.*, 2016). La méthode de notation la plus répandue est une échelle de 0 à 3 ou 0 correspond à des fèces « normales » et 3 à de la diarrhée « sévère », mais la définition peut être plus détaillée (Tableau 14). L'évaluation de la consistance des fèces apporte une information sur la santé digestive des animaux à l'échelle de l'animal. Néanmoins, il s'agit d'une méthode subjective qui dépend fortement de l'observateur. Pedersen *et al.* (2011) ont étudié l'impact de l'observateur sur l'attribution des scores de consistance fécale chez des porcs en croissance-finition, en utilisant un barème allant de 1 à 3 (1=normal ; 2=mou ; 3=aqueux). Les auteurs ont mis en évidence une variabilité en observateurs dans la définition des scores, plus particulièrement entre les scores « mou » et « aqueux ». L'une des difficultés mise en évidence est l'observation concomitante de fèces molles et aqueuses pour un même animal (Pedersen *et al.*, 2011). Il est donc nécessaire de définir avec un maximum de précision et de description l'échelle de notation utilisée (Pedersen *et al.*, 2011). La subjectivité des observations visuelles implique également la nécessité de comparer et d'interpréter les observations entre études avec précaution (Pedersen *et al.*, 2011).

#### B. Modèles expérimentaux

L'étape du sevrage entraîne des changements majeurs en termes de morphologie du tractus digestif, de microbiote et altère transitoirement les fonctions digestives et immunitaires (Pluske *et al.*, 1997). L'ensemble des modifications associées au stress du sevrage varient selon de multiples facteurs, développés au cours du premier chapitre, dont les facteurs environnementaux. Etant donnée la complexité des changements associés au sevrage, identifier les propriétés fonctionnelles d'un additif alimentaire nécessite de diversifier les approches expérimentales (de Lange *et al.*, 2010). Le sevrage en lui-même constitue un modèle de déstabilisation de l'homéostasie du système digestif. L'utilisation de modèles expérimentaux spécifiques permet également d'étudier plus finement certains mécanismes associés à la perte d'homéostasie et de fonction digestive.

Tableau 14 : Description des barèmes utilisés pour l'évaluation de la consistance des fèces chez le porc et chez l'homme

Espèce		Niveaux de description de la consistance des fèces										Auteur	
Porc	Normal	Mou	Diarrhée modérée	Diarrhée sévère								Spreeuwenberg <i>et al.</i> , 2001 Owusu-Asiedu <i>et al.</i> , 2003 Nyachoti <i>et al.</i> , 2006	
Porc	Solide	Semi-solide	Semi-liquide	Liquide								Li <i>et al.</i> , 2012	
Porc	Normal ou Formé (plus de 30% de matière sèche)	Mou (entre 25 et 30% de matière sèche)	Semi-solide (entre 20 et 25% de matière sèche)	Liquide (moins de 20% de matière sèche)								Huang <i>et al.</i> , 2004	
Porc	Normal (fèces fermes et bien formées)	Consistance molle (fèces molles et formées)	Diarrhée modérée (fèces fluides)	Diarrhée sévère (fèces aqueuses et projectiles)								Cho <i>et al.</i> , 2006	
Porc	Très solide	Moyennement solide	Modérément mou	Très mou	Aqueux						Hill <i>et al.</i> , 2000		
Porc	Normal	Mou	Diarrhée modérée	Diarrhée sévère	Diarrhée aqueuse						Song <i>et al.</i> , 2012		
Homme	Formé (inférieur à 200 grammes)	Formé (entre 200 et 250 grammes)	Formé (plus de 250 grammes) ou semi-solide (inférieur à 200 grammes)	Liquide (moins de 200 grammes)	Semi-solide (entre 200 et 250 grammes)	Semi-solide (plus de 250 grammes)	Liquide (entre 200 et 250 grammes)	Liquide (plus de 250 grammes)				Hart et Dobb, 1988	
Homme	Dur et formé (inférieur à 100 grammes)	Dur et formé (entre 100 et 200 grammes)	Dur et formé (plus de 200 grammes)	Mou et formé (inférieur à 100 grammes)	Mou et formé (entre 100 et 200 grammes)	Mou et formé (plus de 200 grammes)	Délié et non formé (inférieur à 100 grammes)	Délié et non formé (entre 100 et 200 grammes)	Délié et non formé (plus de 200 grammes)	Liquide (inférieur à 100 grammes)	Liquide (entre 100 et 200 grammes)	Liquide (plus de 200 grammes)	Whelan <i>et al.</i> , 2004

## 5. Challenge infectieux

L'une des considérations majeures dans l'apparition de troubles digestifs en post-sevrage, concerne le risque de colonisation par des souches bactériennes de type pathogène, majoritairement *E. coli* productrices de toxines, dites « entérotoxigènes ». L'inoculation par voie orale des porcelets sevrés avec une souche *E. coli* identifiée comme pathogène constitue un modèle expérimental d'intérêt pour caractériser la santé digestive. Elle permet de mimer, de façon contrôlée, une infection colibacillaire chez le porcelet sevré, dont les mécanismes liés à la déstabilisation de l'homéostasie au sein du tractus digestif sont relativement bien connus. En outre, la colonisation du tractus digestif par une souche *E. coli* entérotoxigène induit chez l'animal une pathologie liée à la production de toxines spécifiques, LT (heat labile toxin) ou ST (heat stable toxin) (Fairbrother *et al.*, 2005). Ces toxines sont responsables d'une stimulation de la sécrétion en eau par les cellules des cryptes intestinales et une réduction de l'absorption en électrolytes et en eau par les entérocytes dans les villosités, conduisant à l'apparition de diarrhées aqueuses (Fairbrother *et al.*, 2005). La pathogénicité des bactéries entérotoxigènes ont des répercussions en parallèle, telles qu'une activation de la réponse immunitaire et inflammatoire (Van den Broeck *et al.*, 1999), une réduction de la hauteur des villosités intestinales (Wellock *et al.*, 2008a), une diminution du gain ou une perte de poids au cours des premiers jours post-infection (Wellock *et al.*, 2008b ; Adewole *et al.*, 2016).

L'utilisation de ce modèle est répandue pour évaluer des additifs alimentaires alternatifs à l'utilisation d'antibiotiques, car il permet d'identifier les effets d'un produit dans un contexte de présence avérée d'un agent pathogène dans le tractus digestif (de Lange *et al.*, 2010). Les critères de réponse évalués dans le cadre de ce type de challenge sont généralement les performances de croissance, les paramètres de santé au niveau de l'animal (mortalité, température rectale, consistance des fèces) et au niveau cellulaire ou moléculaire (urée plasmatique, concentrations sériques en protéines de la phase aigüe et en cytokines, adhérence des bactéries à la muqueuse intestinale, morphologie intestinale, comptage des bactéries au niveau fécal)(Adewole *et al.*, 2016). Toutefois, ce type de modèle est souvent confronté à une variabilité individuelle non contrôlée de la réponse de l'animal à l'inoculation (de Lange *et al.*, 2010). Cette variabilité dépend de la souche bactérienne utilisée et de la quantité administrée, mais également pour une même souche et un même niveau d'inoculation, de la réponse individuelle dans le temps (de Lange *et al.*, 2010). Par conséquent, l'expression des symptômes cliniques associés à la prolifération de la souche bactérienne varient entre l'absence de diarrhée (Wellock *et al.*, 2008b), l'apparition de diarrhée modérée ou, de manière



exceptionnelle, le déclenchement d'une entérotoxémie conduisant à la mort de l'animal (de Lange *et al.*, 2010). Parallèlement, le challenge infectieux n'affecte pas systématiquement la croissance des animaux inoculés.

## 6. LPS

Le lipopolysaccharide (LPS) est un constituant de la paroi externe des bactéries gram négatives et possède un fort pouvoir immunostimulant et inflammatoire (Adewole *et al.*, 2016). Il constitue le principal composant toxique des endotoxines responsables de la pathogénicité de certaines bactéries gram négatives (Adewole *et al.*, 2016). L'administration de LPS représente un modèle largement utilisé pour mimer la réponse inflammatoire associée à l'infection bactérienne aigüe (Adewole *et al.*, 2016). L'administration de LPS au niveau systémique (intraveineuse ou intramusculaire) induit une augmentation rapide des concentrations en haptoglobine et en cytokines pro-inflammatoires IL-1, IL-6, IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$  circulantes dans le sang (Rakhshandeh et de Lange, 2012 ; Campos *et al.*, 2014). L'induction d'un état inflammatoire par le LPS conduit à l'anorexie, la fièvre et une baisse des performances de croissance (Rakhshandeh et de Lange, 2012 ; Campos *et al.*, 2014 ; Adewole *et al.*, 2016). Le challenge au LPS permet d'étudier les critères de performance de croissance et les paramètres associés à l'inflammation au niveau systémique (urée plasmatique, concentrations en cytokines, protéines de la phase aigüe) (Adewole *et al.*, 2016). L'utilisation du LPS a constitué un modèle d'intérêt pour la compréhension des mécanismes associés à l'infection et à l'inflammation. Il possède toutefois l'inconvénient de ne mimer qu'en partie les symptômes associés à l'infection bactérienne. Le challenge au LPS induit un état inflammatoire de courte durée seulement, développe une tolérance graduelle chez les animaux soumis à des administrations consécutives et induit des profils immunologiques distincts de ceux observés avec une souche *E. coli* entérotogène vivante (Campos *et al.*, 2014 ; Adewole *et al.*, 2016).

## 7. Challenge sanitaire

Le challenge sanitaire est un modèle basé sur la dégradation du statut sanitaire du logement. Ce modèle, développé par Le Floc'h *et al.* (2006), se caractérise originellement par l'absence de nettoyage et de désinfection à la suite de la bande occupant précédemment le logement, l'absence de traitement antibiotique et l'ajout d'animaux étrangers (non-expérimentaux) en cours d'expérience. Selon les auteurs utilisant ce modèle, les techniques utilisées pour dégrader les conditions d'hygiène peuvent cependant varier légèrement (Adewole *et al.*,





2016). L'utilisation de conditions d'hygiène dégradées du logement a pour objectif de favoriser l'exposition des animaux à des facteurs de stress divers, stimulant le système immunitaire (Le Floch *et al.*, 2006 ; Adewole *et al.*, 2016). Le challenge sanitaire induit donc une faible inflammation chronique et altère les performances de croissance (Adewole *et al.*, 2016). L'une des principales limites associée au modèle de challenge sanitaire est liée à la difficulté à standardiser les conditions d'hygiène et par conséquent à reproduire le modèle, y compris dans le temps (Adewole *et al.*, 2016). Il est également difficile de déterminer avec certitude l'agent responsable des réponses immunitaires observées (Adewole *et al.*, 2016).



## OBJECTIFS DE THESE



La littérature nous a permis de mettre en évidence que le sevrage du porcelet entraîne l'apparition de troubles digestifs d'origine multifactorielle. La déstabilisation de l'homéostasie du système digestif favorise la colonisation de l'hôte par les pathogènes, conduisant à l'utilisation d'antibiotiques en élevage pour limiter la mortalité en post-sevrage. Dans un contexte de réduction de l'utilisation d'antibiotiques en médecine vétérinaire, il est nécessaire de développer des stratégies et des outils pour favoriser la santé digestive du porcelet au sevrage. L'un des leviers d'action consiste à développer des ingrédients dits « fonctionnels », capables de limiter les troubles digestifs en modulant les paramètres de défense et les populations microbiennes commensales en faveur de la santé et de la fonction digestive.

La Spiruline et la Chlorelle sont très largement référencées dans le domaine de la santé humaine, entre autres pour leurs propriétés antioxydantes, immunomodulatrices, antimicrobiennes et prébiotiques. Ces diverses propriétés leur confèrent un potentiel considérable pour répondre aux enjeux actuels en santé animale. Leur action sur la santé digestive du porcelet est cependant méconnue.

L'objectif général de la thèse était d'évaluer le potentiel d'une supplémentation en Spiruline et en Chlorelle en tant qu'ingrédients capables de favoriser la santé digestive et la croissance du porcelet au sevrage. Notre travail s'est décliné en trois questions de recherche :

- QR1 : Une supplémentation en Spiruline et en Chlorelle en post-sevrage favorise-t-elle la fonction et la santé digestive et par quels mécanismes ?
- QR2 : Le traitement technologique des microalgues modifie-t-il les effets de la supplémentation en microalgues sur la santé digestive du porcelet sevré ?
- QR3 : Quels sont les effets d'une supplémentation en microalgues pendant la lactation sur les altérations précoces de la fonction et de la santé digestive induites par le sevrage ? Contribue-t-elle à réduire le risque d'apparition de troubles digestifs en post-sevrage ?

Nos questions de recherche ont été construites afin d'évaluer les hypothèses suivantes :

Hypothèses associées à l'animal :

- H1 : La supplémentation en microalgues favoriserait le maintien de la santé digestive en limitant l'altération de la structure de l'intestin induite par l'inflammation et/ou en stimulant les mécanismes de défense (physique et immunitaire) en faveur de la tolérance aux populations microbiennes commensales et de la lutte contre le développement des bactéries pathogènes. Un maintien de la santé digestive aurait pour

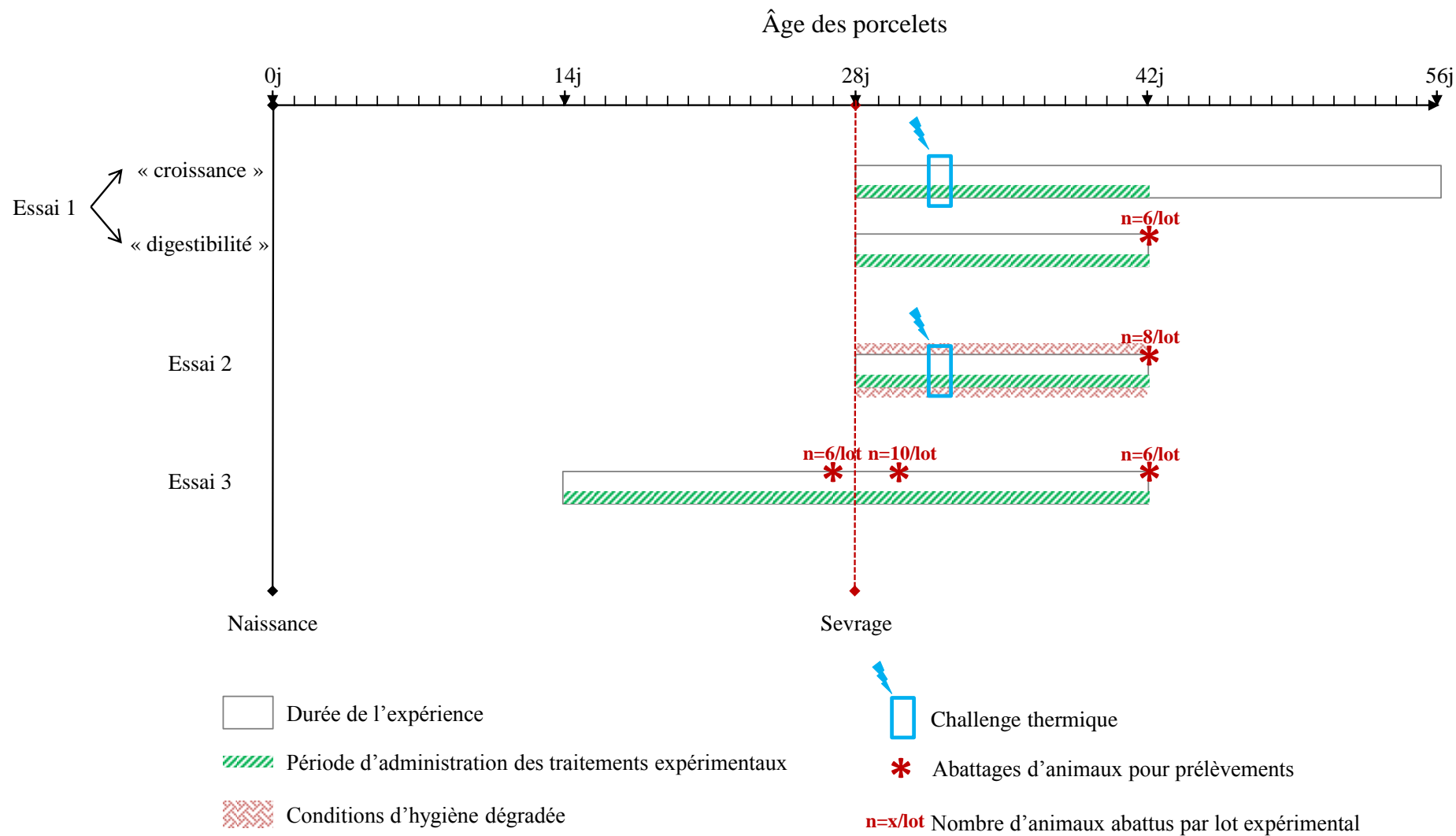


Figure 19 : Déroulement des expériences réalisées au cours de la thèse

conséquence une amélioration des fonctions de digestion et de la croissance après le sevrage.

- H2 : L'effet des microalgues sur la santé digestive en post-sevrage serait plus prononcé chez des animaux exposés à un environnement défavorable à la croissance et à la santé digestive.
- H3 : La supplémentation en amont du sevrage permettrait de moduler la réponse inflammatoire aigüe associée au sevrage et par conséquent limiterait l'altération de l'architecture intestinale et la perte de fonction digestive. Elle réduirait donc le développement de troubles digestifs et le ralentissement de la croissance en post-sevrage.

Hypothèses associées au traitement technologique des microalgues :

- H4 : La rupture de la paroi cellulaire des microalgues favoriserait la biodisponibilité des constituants intracellulaires et donc leur utilisation par l'animal
- H5 : La réduction des traitements thermiques appliqués lors du séchage de la biomasse algale limiteraient la dégradation des composés d'intérêt pour la santé de l'animal (exemple : phycocyanine)

Afin de répondre à nos questions de recherche, le travail de thèse s'est déroulé en trois expériences permettant d'évaluer la santé digestive du porcelet dans des conditions expérimentales contrastées (Figure 19).

Un premier essai (Publication 1, chapitre 1) a été construit afin de déterminer les effets d'une supplémentation en Spiruline et Chlorelle spray-dry (forme standard) sur les paramètres de croissance, l'incidence des diarrhées, la digestibilité des nutriments du régime et des indicateurs de la santé digestive au niveau tissulaire et moléculaire. Cet essai a été décliné en deux expérimentations afin d'analyser, d'une part, les performances zootechniques et l'incidence des troubles digestifs en post-sevrage et d'autre part, la digestibilité fécale des nutriments et la morphologie intestinale.

Un second essai (Publication 2, chapitre 2) a été réalisé afin de définir les effets d'une supplémentation en microalgues sur la croissance et la santé digestive du porcelet élevé dans des conditions d'élevage défavorables, favorisant la dégradation des performances de croissance et l'apparition de troubles digestifs. Les animaux ont donc été élevés en conditions d'hygiène dégradée, reconnues pour altérer la croissance et la santé, via le développement d'une inflammation systémique modérée (Le Floc'h *et al.*, 2006). Le deuxième objectif de cet





essai était de définir si un procédé augmentant théoriquement la biodisponibilité des composés d'origine microalgale pouvait modifier l'action des microalgues sur la fonction et la santé digestive. Nous avons donc comparé l'effet d'un séchage spray-dry standard d'une biomasse microalgale intacte à un broyage à billes puis une lyophilisation, permettant de rompre la paroi cellulaire et sécher la biomasse à basse température, respectivement.

Enfin, un troisième essai (Publication 3, chapitre 3) a été mis en place afin de définir les effets d'une supplémentation en microalgues en amont et en aval du sevrage, avec un focus sur les réponses « aigues » et « tardives » au sevrage en termes de réponse inflammatoire et d'architecture de la muqueuse intestinale. L'essai a également eu pour objectif de définir les conséquences de la supplémentation en amont et en aval du sevrage sur les performances zootechniques et l'apparition de troubles digestifs en post-sevrage.



## TRAVAIL EXPERIMENTAL

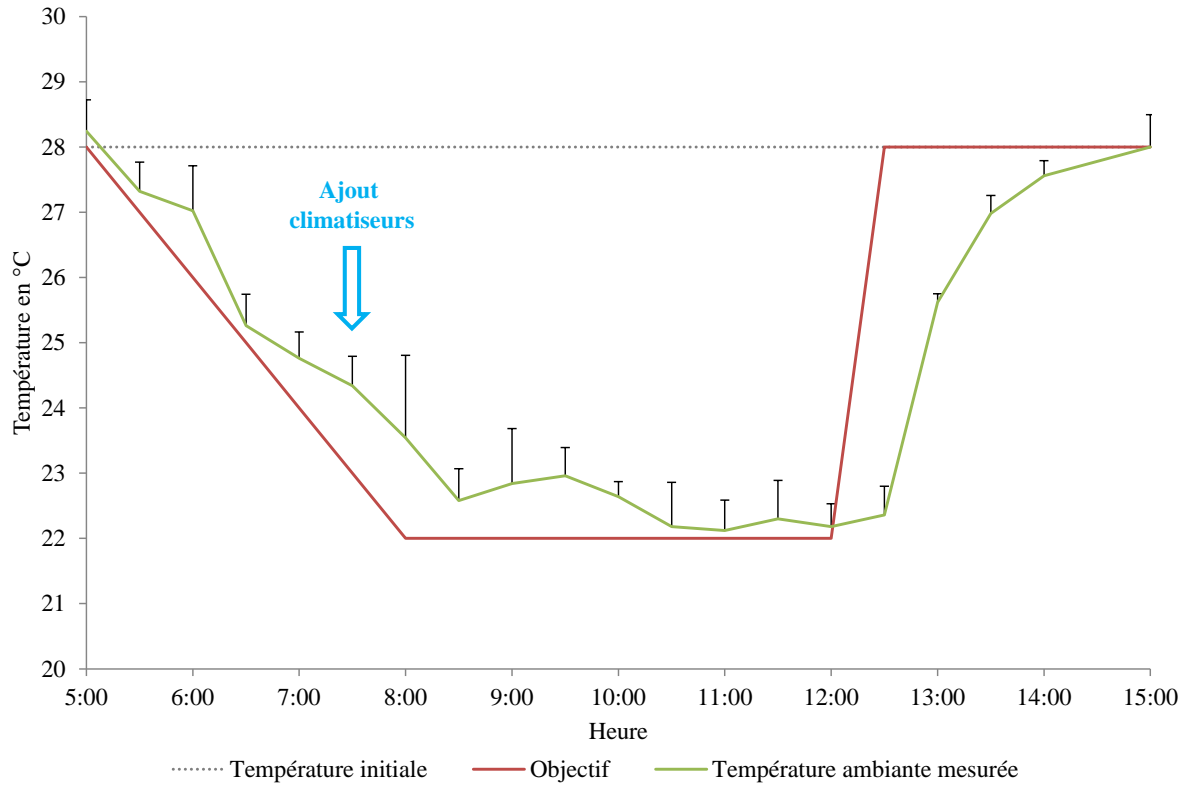


Figure 20 : Représentation graphique de la température ambiante souhaitée (Objectif) et de la température ambiante réelle mesurée dans les cellules au cours du challenge thermique à 32 jours d'âge (Essai 2).

## A. Stratégie expérimentale

Les trois essais réalisés au cours de cette thèse se sont déroulés au sein de l'Unité Expérimentale Porcine de Rennes (UE PR) située à Saint-Gilles (35). Les expériences ont été conduites à partir d'un modèle expérimental commun. Les animaux utilisés pour ces études étaient des porcelets croisés de mère Large White × Landrace et de père Piétrain sevrés à l'âge de 28 jours, correspondant à un sevrage classique en élevage porcin. Le choix des animaux utilisés pour l'expérience s'est réalisé en tenant compte d'un certain nombre de facteurs pouvant interférer avec la santé digestive du porcelet, à savoir la génétique et l'état de santé général (maladie, état inflammatoire, blessure). Ainsi, pour chacune des trois expériences, les animaux ont été sélectionnés de manière à distribuer les traitements expérimentaux (avec ou sans microalgues) au sein d'un bloc de porcelets de poids homogène et de même sexe, d'origine génétique identique, élevés par la même mère (absence d'animaux adoptés) et indemnes de maladie quelconque (boiterie, abcès, diarrhée, ...) au moment de la sélection. Dans les essais 1 et 2, les effectifs d'animaux disponibles lors de la sélection étaient trop faibles pour satisfaire pleinement l'ensemble de ces conditions. Il fut donc nécessaire d'avoir recours à des demi-frères ou demi-sœurs au sein d'un même bloc (3 dans l'essai 1, 13 dans l'essai 2), qui furent répartis équitablement entre les traitements expérimentaux.

### 1. Logement des animaux

Au cours des essais 1, 2 et 3, les porcelets ont été élevés sous la mère, puis logés en cages individuelles (dimensions : 60 × 82 cm) après le sevrage, afin de permettre la réalisation de mesures à l'échelle de l'animal (ingestion, fonction digestive et signes cliniques de diarrhée). L'isolement des animaux est une source de stress ayant un impact sur leur comportement, y compris alimentaire. Afin de limiter le stress occasionné par ce mode de logement, les cages dans lesquelles ont été placés les animaux étaient pourvues de parois transparentes et étaient disposées les unes à côté des autres. Ainsi, les animaux ont pu conserver un contact visuel, auditif et olfactif entre eux. Par ailleurs, les dimensions des cages permettaient le déplacement libre des animaux. Les cellules disponibles sur le site expérimental sont conçues pour contenir un maximum de 12 ou 24 cages individuelles chacune. Les effectifs utilisés dans nos expériences ont nécessité l'utilisation de plusieurs cellules, au sein desquelles les paramètres d'ambiance étaient similaires. Toutefois, afin d'éviter un effet de l'environnement sur nos

Tableau 15 : Composition des aliments utilisés pour la fabrication des régimes expérimentaux

	Essai 1	Essais 2 & 3
<b>Ingrédients (%)</b>		
Orge	45.31	45.78
Tourteau de soja	17.50	17.50
Concentré protéique de soja	2.50	2.50
Lactosérum doux	20.00	20.00
Poudre de lait	4.80	4.80
Huile végétale	5.50	5.50
Blé tendre	-	0.04
Remoulage de blé tendre	-	0.06
Carbonate de calcium	1.41	1.60
Phosphate monocalcique	0.80	0.66
Complément vitamines et minéraux <sup>1</sup>	0.50	0.50
L-lysine HCl	0.41	0.41
DL-méthionine	0.26	0.26
L-thréonine	0.17	0.17
L-tryptophane	0.46	0.04
L-valine	0.07	0.07
Acidifiant	0.10	0.10
Phytase	0.01	0.01
<b>Composition chimique (%MS)</b>		
MAT	21.12	21.29
Matière grasse	7.50	7.97
Matière minérale	7.80	7.82
Cellulose brute	3.30	3.23
NDF	11.81	11.61
ADF	3.99	3.90
ADL	0.62	0.57
Amidon	27.20	26.51
Sucres totaux	18.27	21.69
ED (MJ/kgMS)	16.19	16.27
EM (MJ/kgMS)	15.47	15.59
EN (MJ/kgMS)	11.80	11.93

paramètres mesurés, les traitements expérimentaux ont été distribués de manière égale entre les cellules, en conservant au sein de chaque cellule des blocs de porcelets complets.

Dans le cadre de l'essai 1 « digestibilité » et de l'essai 3, la température ambiante a été maintenue à 28°C durant la première semaine post-sevrage, puis réduite graduellement de 1°C chaque semaine. Au cours de l'essai 1 « croissance », une panne de chauffage à 32 jours d'âge a entraîné une diminution de la température ambiante de l'ensemble des cellules. La température ambiante des cellules, initialement à 28°C, a été réduite à 22°C pendant environ quatre heures. Ce « challenge thermique » a eu pour conséquence le déclenchement de diarrhées pour une large proportion d'animaux. Le déclenchement d'une forte proportion de diarrhée à l'aide de ce challenge thermique nous a mené à construire un modèle contrôlé de chute de température (Figure 20), qui fut utilisé dans l'essai 2 pour favoriser l'apparition de diarrhées. La réduction de la température des salles a été effectuée à 32 jours d'âge en réduisant graduellement la consigne de chauffage des cellules et en ajoutant des climatiseurs. La température ambiante a été diminuée de 28°C à 22°C à raison d'un degré toutes les demi-heures, puis maintenue à 22°C pendant 4 heures. La température a été remontée à 28°C à l'issue des 4 heures.

## 2. Alimentation

Pour l'ensemble des essais, les animaux ont eu un accès à volonté à l'aliment solide et à l'eau après le sevrage. Les aliments expérimentaux ont été fabriqués au moulin expérimental de Saint-Gilles, à partir d'une base de farine d'un aliment premier âge correspondant au stade des animaux, fournie par Cooperl Arc Atlantique (Tableau 15). Dans les essais 1 et 2, les animaux ont reçu un aliment supplémenté ou non avec 1% de Spiruline ou de Chlorelle à partir du sevrage jusqu'à 42 jours d'âge (deux semaines). Dans l'essai 3, la supplémentation en microalgues a été effectuée par administration orale pendant toute la durée de l'expérience. Les porcelets n'ont pas reçu d'aliment pendant la lactation afin d'effectuer une transition abrupte de l'alimentation lactée à l'aliment solide. A partir du sevrage, l'ensemble des animaux ont reçu un aliment standard premier âge équivalent aux précédents essais. La quantité de microalgues administrées pendant la durée totale de l'essai 3 a été fixée à 385 mg par kilogramme de PV par jour. Cette quantité a été déterminée à partir des quantités moyennes de microalgues ingérées par kilogramme de PV au cours des essais précédents, afin de respecter un niveau de supplémentation en microalgues similaire au niveau moyen apporté avec un régime supplémenté à 1%. Pour des questions de charge de travail, il n'a pas été



Tableau 16 : Répartition des traitements expérimentaux au cours des essais 1, 2 et 3

	Traitements expérimentaux						Nombre d'animaux par traitement
	« Témoin négatif »	« Témoin positif »	Spiruline standard (atomisée)	Spiruline broyée et lyophilisée	Chlorelle standard (atomisée)	Chlorelle broyée et lyophilisée	
Essai 1							
« croissance »	X	X	X		X		18
« digestibilité »	X	X	X		X		6
Essai 2	X		X	X	X	X	15
Essai 3	X			X		X	36

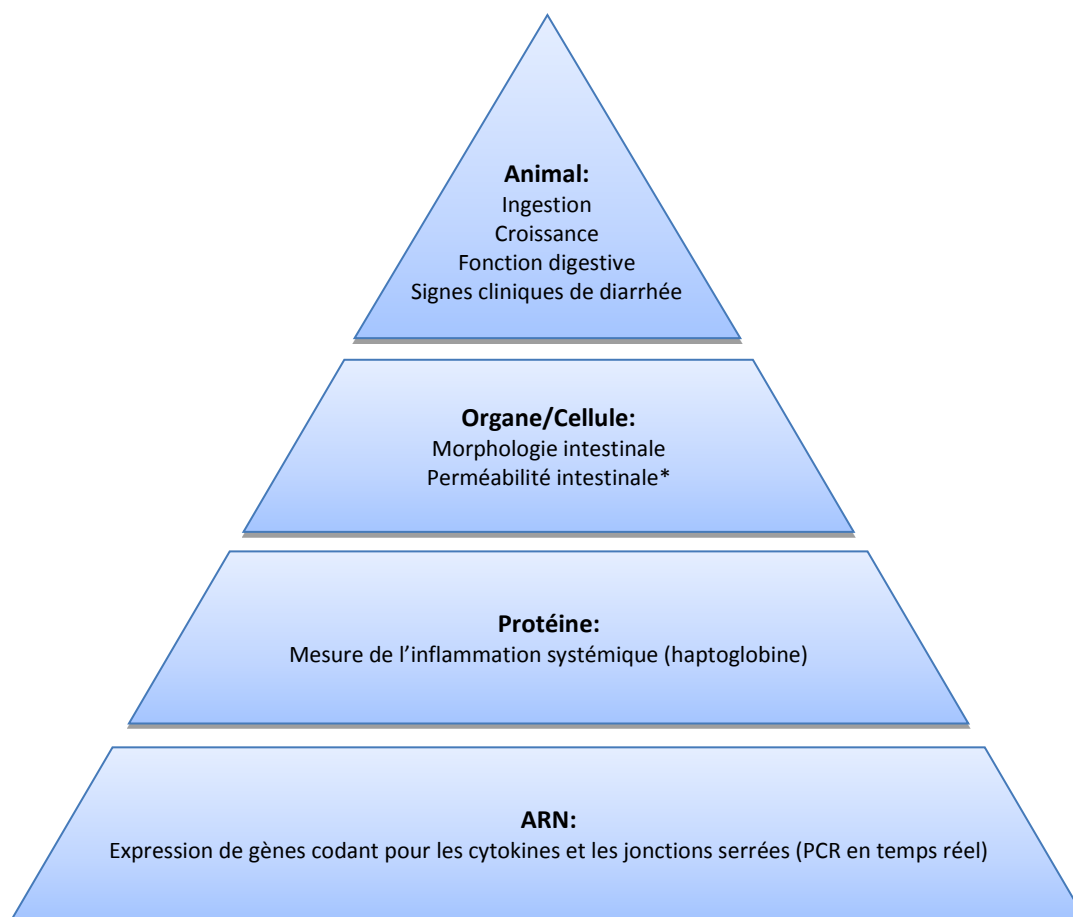


Figure 21 : Approche méthodologique utilisée pour caractériser la croissance et la fonction digestive (\* uniquement mesuré dans l'essai 2)

possible d'ajuster les quantités administrées individuellement. La quantité totale administrée par animal a donc été calculée chaque jour sur la base du PV moyen de la veille calculé pour la totalité des animaux présents dans l'expérience.

Dans l'essai 1, les biomasses de Spiruline et de Chlorelle utilisées correspondaient à des biomasses commerciales provenant de Setalg (Pleubian, France), séchées par atomisation. Dans l'essai 2, deux procédés technologiques appliqués aux microalgues ont été testés. Un premier procédé a consisté en un séchage standard par atomisation. Dans un second procédé, la biomasse fraîche de microalgues (environ 15 % de MS) a été broyée à l'aide d'un broyeur à billes (billes en Zirmil de 0,6 mm de diamètre) maintenu à une température maximale de 20°C puis congelée à -20°C et lyophilisée. La cumulation de ces deux procédés a été choisie afin d'assurer la libération des constituants intracellulaires par la rupture de la paroi cellulaire et de limiter l'élévation de la température de la biomasse, reconnue pour altérer certaines molécules bioactives. Dans l'essai 3, ce dernier procédé a été sélectionné uniquement. Les microalgues broyées et lyophilisées ont été conditionnées sous forme sèche (95 % de MS) à 4°C. Le matin, les quantités de microalgues à distribuer ont été pesées et diluées dans de l'eau pour la constitution d'une pâte, à une concentration d'environ 30 % de MS. Les solutions de microalgues ont ensuite été conditionnées en seringues individuelles, puis administrées aux porcelets par voie orale, immédiatement après la préparation.

Dans les trois essais, les animaux recevant une supplémentation en microalgues ont été comparés à un groupe d'animaux « témoin négatif », sans supplémentation. Les groupes « témoin négatif » et les groupes supplémentés n'ont reçu aucun traitement médicamenteux pendant les expériences. Dans l'essai 1, en parallèle du groupe témoin sans microalgues et sans traitement médicamenteux, un groupe « témoin positif » recevant un régime supplémenté en antibiotique contre *E. coli* (colistine ; Acti Coli B, Biove, France ; 10<sup>6</sup> IU/g) a été ajouté au dispositif. Les traitements expérimentaux sont récapitulés dans le tableau 16.

## B. Méthodes

En se basant sur le principe énoncé par Pluske *et al.* (2007), la méthodologie appliquée pour évaluer l'effet d'une supplémentation en Spiruline et en Chlorelle sur la santé digestive du porcelet s'est définie selon une approche multidimensionnelle, depuis l'échelle de l'animal à l'échelle moléculaire (Figure 21). Cette méthodologie est commune aux trois essais, à l'exception de la mesure de la perméabilité intestinale par la méthode des chambres d'Ussing, réalisée uniquement au cours de l'essai 2.



## 1. Mesures en cours d'expérience

### a. Ingestion et croissance

Au cours des essais 1 et 2, les porcelets ont été pesés au sevrage (début d'expérience), puis chaque semaine jusqu'à la fin de la période expérimentale. Au cours de l'essai 3, les porcelets ont été pesés tous les jours en même temps que l'administration orale des traitements expérimentaux. Aucune mise à jeun n'a été réalisée avant les pesées afin de maintenir les animaux dans des conditions d'alimentation constantes et d'éviter un effet d'une période de jeûne sur les paramètres de santé digestive.

Les quantités d'aliment distribuées en post-sevrage ont été pesées et distribuées individuellement chaque matin. Un échantillon de chaque régime expérimental a été conservé à 4°C pour chaque jour de distribution. Une partie de ces échantillons a été séchée en étuve pendant 24 heures à 103°C afin de calculer la distribution d'aliment sur la base de sa teneur en MS. Un échantillon moyen a été créé pour chaque régime expérimental et pour la période de distribution en cumulant chaque échantillon quotidien au sein d'un même échantillon. Cet échantillon a été utilisé pour analyser en laboratoire la composition chimique de l'aliment distribué. Enfin, les quantités d'aliment refusées par chaque animal ont été collectées avant la nouvelle distribution d'aliment et immédiatement séchées en étuve pendant 24 heures à 103°C. L'ingestion des animaux a été calculée comme la différence entre l'aliment sec distribué et l'aliment sec refusé, puis standardisée à un taux de MS de 87 %.

### b. Digestibilité fécale des régimes expérimentaux

#### - Méthode de collecte totale (Essai 1 « digestibilité »)

Dans l'essai 1 « digestibilité », les fèces et urines des animaux ont été collectées totalement. Le sol en caillebotis des cages des animaux était muni d'un bac de collecte, surmonté d'une grille fine permettant la collecte séparée des fèces et des urines. Les fèces ont été collectées quotidiennement sur la grille et les urines ont été récupérées depuis le bac de collecte dans un seau contenant 120 mL d'acide sulfurique à 10%, permettant leur conservation à un pH inférieur à 2. Les fèces et urines collectées ont été cumulées sur deux périodes de sept et six jours (de 28 à 34 jours d'âge et de 35 à 41 jours d'âge). Après chaque collecte, les fèces et urines ont été conservées à 4°C. En fin de période, les fèces ont été pesées. Un ajout d'eau en quantité connue a été réalisé afin d'assurer l'homogénéisation des fèces. Après homogénéisation des fèces et urines cumulées, deux échantillons de fèces ont été pesés puis séchés à 103°C pendant 48 heures en étuve pour la détermination de la teneur en MS. En

Tableau 17 : Prélèvements ponctuels de fèces pour la mesure des coefficients d'utilisation digestive

	Nombre de prélèvements	Age au prélèvement	Nombre d'animaux par traitement
Essai 2	5	32, 34, 36, 39 et 41 jours d'âge	6
Essai 3	3	34, 37 et 41 jours d'âge	9

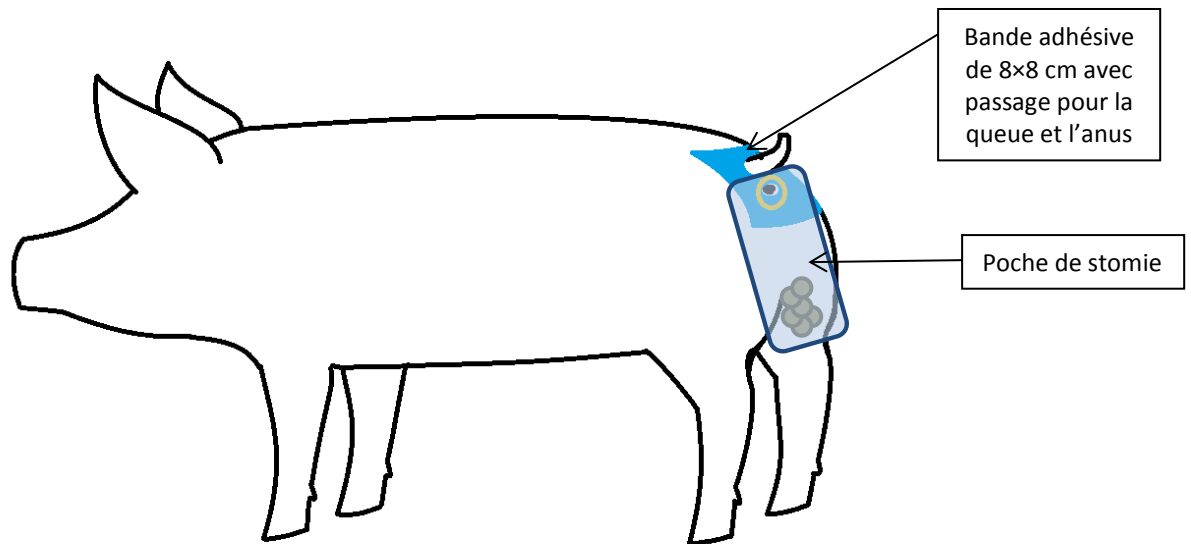







Figure 22 : Collecte partielle des fèces à l'aide d'une poche de stomie fixée à l'arrière de l'animal. La poche de stomie (réf. 3778, Hollister, Paris, France) était fixée à l'animal avec une bande adhésive (Tensoplast®, BSN Medical, Le Mans, France).

Tableau 18 : Grille de notation de la consistance des fèces d'après les descriptions de Whelan *et al.* (2004) et Song *et al.* (2010)

Score	Consistance	Apparence visuelle	Statut/Pathologie
0	Fèces dures et formées		Animal sain
1	Fèces molles et formées		
2	Fèces déliées et non formées		Diarrhée modérée
3	Fèces liquides		Diarrhée sévère
4	Fèces aqueuses et incolores		Diarrhée très sévère ou aqueuse

parallèle, un échantillon d'urine et un échantillon de fèces ont été constitués et congelés à -20°C pour l'analyse chimique des échantillons. L'échantillon de fèces a été lyophilisé et broyé (broyeur à marteaux Gondard équipé d'une grille de 1 mm) avant analyses au laboratoire.

*- Méthode de collecte partielle (Essais 2 et 3)*

Dans les essais 2 et 3, nous avons analysé la digestibilité des régimes en réalisant des collectes ponctuelles et partielles en cours d'expérience (Tableau 17) et en utilisant le dioxyde de titane comme marqueur indigestible, introduit à hauteur de 0,3 % dans l'aliment expérimental. Afin de collecter de manière ponctuelle les fèces des animaux, la seule méthode actuellement utilisée est la contention et la stimulation de la défécation des animaux. Au-delà d'être contraignante pour l'expérimentateur et pour l'animal, les fèces collectées par cette méthode ne proviennent que rarement de la défécation naturelle. Au cours de ces deux essais, nous avons mis en place un système de collecte ponctuelle des fèces par défécation naturelle. Le matin de la collecte, une poche en plastique (poche de stomie de marque Hollister, Paris, France ; réf. 3778) a été fixée à l'arrière de l'animal à l'aide de bande adhésive (Tensoplast®, BSN Medical, Le Mans, France) afin de collecter les fèces après défécation naturelle (Figure 22). La poche a été décollée de l'animal après que l'animal ait déféqué. Cette méthode n'a pu cependant être réalisée que sur des animaux mâles afin d'assurer la collecte unique des fèces. Les fèces collectés ont été conservés à -20°C pour analyse chimique ultérieure.

*c. Signes cliniques de diarrhée*

La consistance des fèces a été évaluée quotidiennement après la collecte des refus d'aliment pour chaque porcelet sevré, afin de détecter et de quantifier l'apparition de diarrhées en cours d'expérience. La consistance des fèces a été évaluée visuellement selon une échelle de notation décrite dans le tableau 18, adaptée des descriptions de Whelan *et al.* (2004) et de Song *et al.* (2012). Dans les essais 1 et 3, le nettoyage quotidien des sols a permis d'observer les déjections des animaux sous les cages par période de 24 heures. Dans l'essai 2, l'absence de nettoyage du logement a induit la cumulation des déjections sous les cages, ne permettant pas d'évaluer les déjections quotidiennes des porcelets. Afin d'évaluer la consistance des fèces des animaux sans confusion avec les fèces cumulées sous les cages, des plaques en plastique blanc ont été glissées sous chaque cage le matin à l'entrée dans les salles et laissées



pendant deux heures. La consistance a été évaluée à partir de l'observation des fèces récoltées sur les plaques à la fin des deux heures.

## 2. Analyses chimiques de l'aliment, des fèces et des urines

La composition chimique des aliments expérimentaux distribués a été analysée en laboratoire à partir des échantillons moyens constitués pour les trois essais. Une partie des échantillons moyens d'aliment a été broyée à l'aide d'un broyeur à rotor (ZM 100, Retsch®, Eragny sur Oise, France, équipé d'une grille de 1 mm) pour réaliser les analyses. La teneur en matière sèche (MS) a été mesurée sur les aliments broyés par passage à l'étuve à 103°C pendant 24 heures. Les teneurs en azote (N), en énergie brute, en matière minérale (MM), en matière grasse (MG), en cellulose brute (CB) et en fibres NDF, ADF, ADL (méthode van Soest) ont été analysées sur les échantillons moyens broyés. La teneur en azote a été analysée selon la méthode Dumas à l'aide d'un analyseur (Rapid N, Elementar, Lyon, France) selon la description de l'AOAC (1990). La teneur en énergie brute a été mesurée selon la méthode ISO 9831:1998 (méthodes ISO, <http://www.iso.org>) à l'aide d'une bombe calorimétrique (IKA, Staufen, Allemagne). La teneur en MM a été déterminée par combustion de l'échantillon à 550°C pendant 6 heures, selon la description de l'AOAC (1990). La teneur en cellulose brute a été mesurée selon la description de l'AOAC (1990), après digestion de l'échantillon dans une solution contenant 1,25 % d'acide sulfurique et 1,25 % d'hydroxyde de sodium. Les fractions NDF, ADF et ADL ont été mesurées par la méthode séquentielle de Van Soest *et al.* (1991).

Lors de l'essai 1 « digestibilité », les teneurs en MS, en énergie brute, en N, en MM, en CB et en fibres NDF, ADF et ADL ont été analysées selon les méthodes décrites précédemment pour l'aliment. La teneur en N des échantillons d'urine a été mesurée selon la méthode Dumas adaptée aux échantillons liquides. La teneur en énergie brute des échantillons d'urine a été déterminée à l'aide d'une bombe calorimétrique selon la méthode ISO précédemment décrite, à partir d'un volume d'urine de 30 mL lyophilisé dans un sachet en polyéthylène dont la teneur en énergie brute était connue.

Pour les essais 2 et 3, les échantillons ponctuels de fèces ont été lyophilisés puis broyés. La teneur en titane des aliments et des fèces a été mesurée selon une méthode adaptée de Njaa (1961). La minéralisation a été réalisée selon le principe de la méthode Kjeldahl, adaptée pour la minéralisation micro-ondes. Un échantillon d'environ 200 mg a été digéré avec 6 mL d'acide sulfurique et 3 mL d'acide nitrique, à l'aide d'un minéralisateur à micro-ondes





(ETHOS ONE, Milestone, Sorisole, Italie). Les échantillons digérés ont ensuite été dilués dans 50 mL d'eau microfiltrée. La teneur en titane de l'échantillon a été déterminée par méthode colorimétrique après ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et lecture de l'absorbance à 400µm à l'aide d'un automate (Konelab 20i; Thermo Scientific, France). Les teneurs en N et en MS ont été mesurées dans l'essai 2 ainsi que les teneurs en N, en MS, en MM et en énergie dans l'essai 3, ont été mesurées selon les méthodes précédemment décrites.

### 3. Calculs de digestibilité

Pour l'essai 1 « digestibilité », les coefficients d'utilisation digestive de la MS, de la MO (différence entre la teneur en MS et la teneur en MM), de l'N, de l'énergie brute, de la CB et des fibres NDF, ADF et ADL ont été calculés selon la formule suivante :

$$\text{Coefficient d'utilisation digestive de X (\%)} = \frac{\text{MS ingérée} \times [\text{X}]_{\text{aliment}} - \text{MS fèces excrétée} \times [\text{X}]_{\text{fèces}}}{\text{MS ingérée} \times [\text{X}]_{\text{aliment}}} \times 100$$

Où [X]<sub>aliment</sub> = teneur en X dans l'aliment et [X]<sub>fèces</sub> = teneur en X dans les fèces, exprimés en % MS

Pour les essais 2 et 3, les digestibilités de la MS et de l'N ont été calculées à partir des rapports de concentration entre la MS ou l'N et le dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) ingérés et excrétés, selon la formule suivante :

$$\text{Coefficient d'utilisation digestive de X (\%)} = \left( 1 - \frac{[\text{X}]_{\text{fèces}} / [\text{TiO}_2]_{\text{fèces}}}{[\text{X}]_{\text{aliment}} / [\text{TiO}_2]_{\text{aliment}}} \right) \times 100$$

Où [TiO<sub>2</sub>]<sub>fèces</sub> = teneur en dioxyde de titane dans les fèces et [TiO<sub>2</sub>]<sub>aliment</sub> = teneur en TiO<sub>2</sub> dans l'aliment

Tableau 19 : Succession des bains de rinçage et de déshydratation des échantillons de jéjunum et d'iléon avant inclusion en paraffine et montage des coupes d'intestin sur lame. Méthodologie appliquée en vue de l'analyse morphométrique des villosités et des cryptes intestinales dans le jéjunum et l'iléon.

Etape	Bain	Durée (heure)	Méthode
1	Ethanol 70%	1	Manuelle
2	Ethanol 70%	1	
3	Ethanol 70%	1	
4	Ethanol 95%	1	
5	Ethanol 95%	1	Automate Citadel 2000 (Thermofisher Scientific, Waltham, USA)
6	Ethanol 95%	1	
7	Ethanol 95% / Butanol-1	3	
8	Butanol-1	3	
9	Butanol-1	3	
10	Butanol-1	3	
11	Paraffine	2	
12	Paraffine	3	

Tableau 20 : Succession des bains pour la coloration hématoxyline et éosine des coupes d'intestin, en vue de l'analyse morphométrique des villosités et des cryptes intestinales dans le jéjunum et l'iléon. Bains réalisés à l'aide de l'automate Gemini AS (Thermofisher Scientific, Waltham, USA)

Etape	Bain	Durée (minute)
1	Xylène	5
2	Xylène	5
3	Ethanol 100%	3
4	Ethanol 95%	3
5	Ethanol 90%	3
6	Ethanol 70%	3
7	Eau distillée	3
8	Hématoxyline	14
9	Eau courante	8
10	Eau distillée	5 s
11	Ethanol 80%	1
12	Eosine-Phloxine	30 s
13	Ethanol 95%	1
14	Ethanol 95%	1
15	Ethanol 100%	1
16	Ethanol 100%	1
17	Xylène	-

#### 4. Mesures post-mortem

Dans les essais 1 et 2, une partie des animaux a été abattue à 42 jours d'âge afin de réaliser des prélèvements de sang et d'intestin, pour l'analyse de la concentration en haptoglobine plasmatique, de la morphologie intestinale, de la perméabilité intestinale et de l'expression de gènes au niveau de l'intestin. Dans l'essai 3, afin d'étudier les modifications morphologiques et moléculaires durant les phases de réponse aiguë et tardive au sevrage, des prélèvements de sang et d'intestin ont été réalisés à trois étapes de l'expérience : la veille sur sevrage (27 jours), deux jours après le sevrage (30 jours) et en fin d'expérience (42 jours). L'abattage a été réalisé par électroanesthésie puis exsanguination. Les effectifs d'animaux abattus pour chaque essai sont récapitulés dans la figure 19.

##### *a. Mesure de l'haptoglobine plasmatique*

L'haptoglobine est une protéine plasmatique synthétisée au niveau hépatique en réponse à un stimulus inflammatoire, médié par IL-6 essentiellement (Baumann et Gaudie, 1994). A l'abattage, un prélèvement de 10 mL de sang a été effectué à l'exsanguination puis stocké à 4°C. L'échantillon a ensuite été centrifugé à 3000 g pendant 15 minutes à 4°C. La phase supérieure translucide, correspondant au plasma, a été prélevée puis stockée à -20°C. La concentration plasmatique en haptoglobine a été mesurée par méthode colorimétrique (Phase Haptoglobin Assay T801; Tridelta Ltd, Maynooth, Ireland) à l'aide d'un automate (Konelab 20i; Thermo Scientific, Courtaboeuf, France).

##### *b. Morphologie intestinale*

Après l'exsanguination, le tractus digestif a été extrait de l'animal. L'intestin grêle a été isolé, désolidarisé du mésentère et déroulé. Deux zones ont été identifiées : l'une représentative du jéjunum, à équidistance du début et de la fin de l'intestin grêle et l'une représentative de l'iléon, à 10 centimètres de la jonction caecale. Une section de 2 à 3 centimètres au niveau du jéjunum et de l'iléon a été prélevée puis rincée dans une solution de sérum physiologique (NaCl à 0,9%). Après dissection, une section intacte de un à deux centimètres a été plongée dans une solution de formol à 4% puis conservée pendant 72 heures à 4°C pour fixation du tissu. A l'issue des 72 heures, le tissu a été rincé dans trois bains successifs d'éthanol à 70% d'une heure chacun (Tableau 19). Le tissu a été ensuite disséqué afin de ne conserver qu'une section transverse d'environ 2 millimètres d'épaisseur. L'échantillon a été ensuite déshydraté

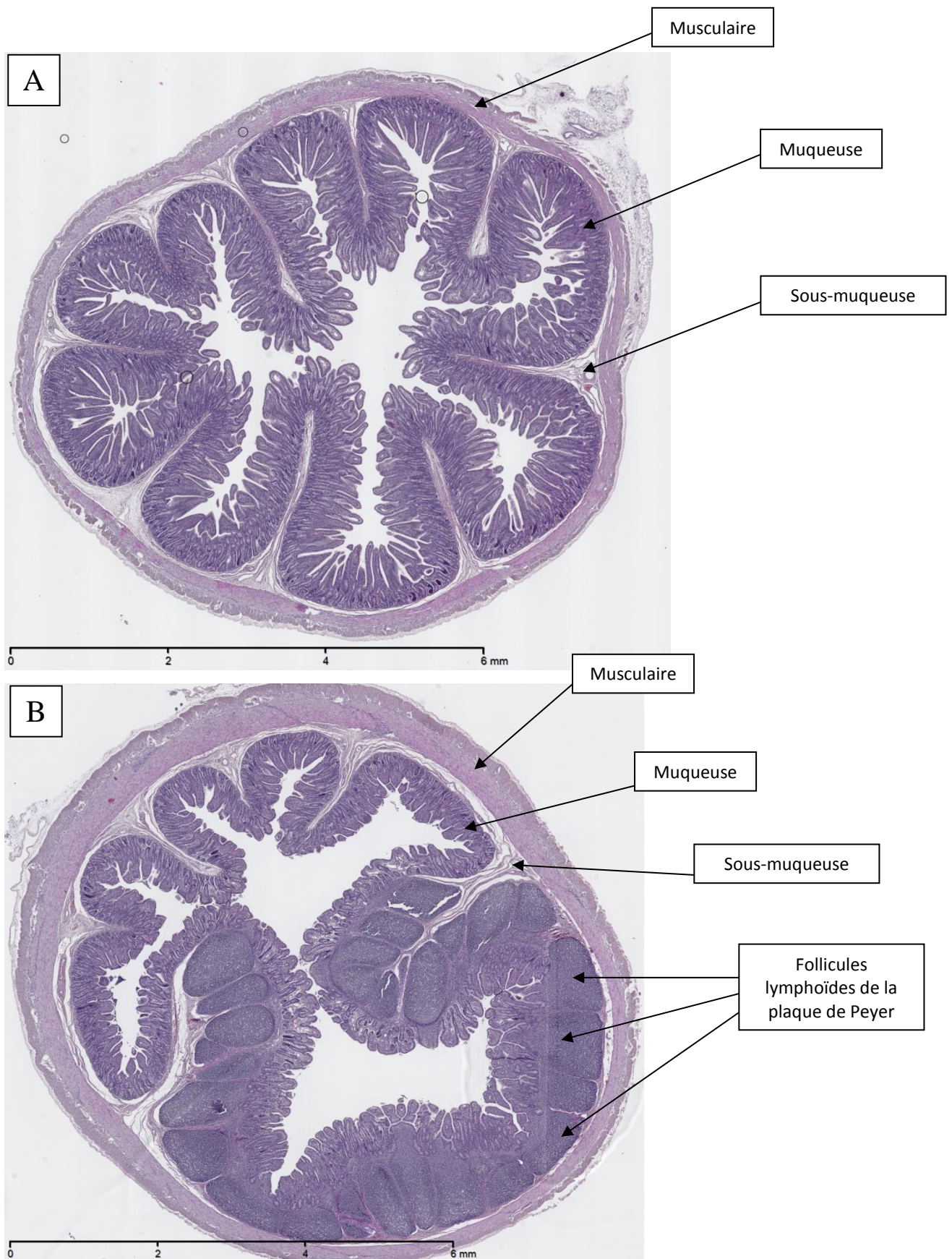


Figure 23 : Coupes transversales de jéjunum (A) et d'iléon (B). Coloration hématoxyline/éosine. Agrandissement  $\times 1,25$ . Images obtenues à l'aide du scanner de lames Hamamatsu (Plateforme d'histopathologie H2P2, Université de Rennes 1, Rennes)

dans une succession de bains réalisés à l'aide d'un automate (Citadel 2000, Thermofisher Scientific, Waltham, USA), dont la description figure dans le tableau 19. La section de tissu a été disposée dans un moule puis incluse à l'aide d'un distributeur de paraffine liquide maintenue à 60°C (WD-4, Kunz Instruments, Fontenay-sous-Bois, France). Pour chaque échantillon, une coupe de 7 µm d'épaisseur a été réalisée à l'aide d'un microtome (Leica RM2145, Nanterre, France) et déposée sur lame (Superfrost™, Thermofisher Scientific, Waltham, USA). Les lames ont été ensuite soumises à une coloration hématoxyline et éosine. L'hématoxyline est une solution de couleur bleue marquant spécifiquement les acides nucléiques du noyau des cellules. L'éosine est une solution rose marquant de manière non spécifique les protéines et donc le cytoplasme des cellules. Cette méthode de coloration est très largement utilisée pour marquer la structure d'un tissu et réaliser des études morphométriques (Fischer *et al.*, 2008). La coloration s'effectue par une succession de bains (Tableau 20) qui a été réalisée avec un automate (Gemini AS, Thermofisher Scientific, Waltham, USA). A l'issue de la coloration, les coupes sont montées sous lamelles à l'aide d'un milieu de montage (Safemount, VWR Q Path®, Fontenay-sous-Bois, France).

Pour chaque coupe de jéjunum et d'iléon (Figure 23), la hauteur de 15 villosités et de 10 cryptes ont été mesurées (Figure 24). Dans l'iléon, la muqueuse surmonte, sur environ la moitié de la circonférence du tissu, les follicules lymphoïdes de la plaque de Peyer (Figure 23). D'après la littérature, la muqueuse surmontant les follicules lymphoïdes possède une fonction spécifique associée au système immunitaire et non aux fonctions de digestion et d'absorption des nutriments. Les mesures ont donc été réalisées uniquement aux endroits où la muqueuse ne surmonte pas les follicules lymphoïdes. Une hauteur moyenne des villosités et une profondeur moyenne des cryptes a été calculée pour chaque échantillon.

### *c. Perméabilité intestinale par la méthode des chambres d'Ussing (essai 2)*

La méthode des chambres d'Ussing a été utilisée dans l'essai 2 afin de mesurer la perméabilité intestinale. Cette méthode *ex vivo*, décrite précédemment, permet de réaliser des mesures de passages de marqueurs au travers d'un tissu maintenu en vie artificielle. La chambre d'Ussing est constituée de deux réservoirs (ou demi-chambres) reconstituant de manière artificielle le milieu physiologique nécessaire à la survie du tissu hors de l'organisme (Figure 25). Dans l'essai 2, une section de jéjunum adjacente à la section prélevée pour l'analyse morphométrique a été conservée dans une solution préservative (milieu DMEM) et transportée immédiatement au laboratoire. Le jéjunum a été strippé (retrait des couches



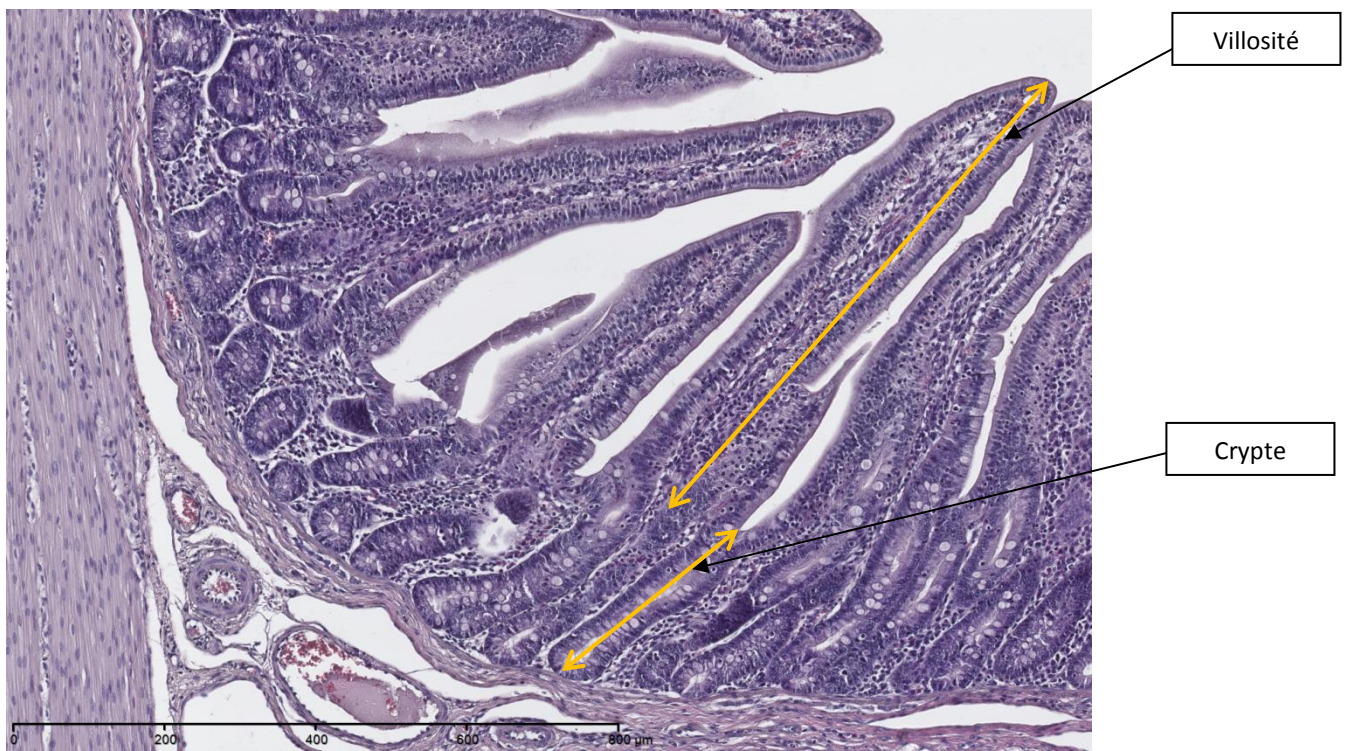


Figure 24 : Coupe transversale de jéjunum. Agrandissement  $\times 5$ . Sont représentées en jaune les mesures de hauteur de villosité et de profondeur de crypte. Image obtenue à l'aide du scanner de lames Hamamatsu (Plateforme d'histopathologie H2P2, Université de Rennes 1, Rennes).

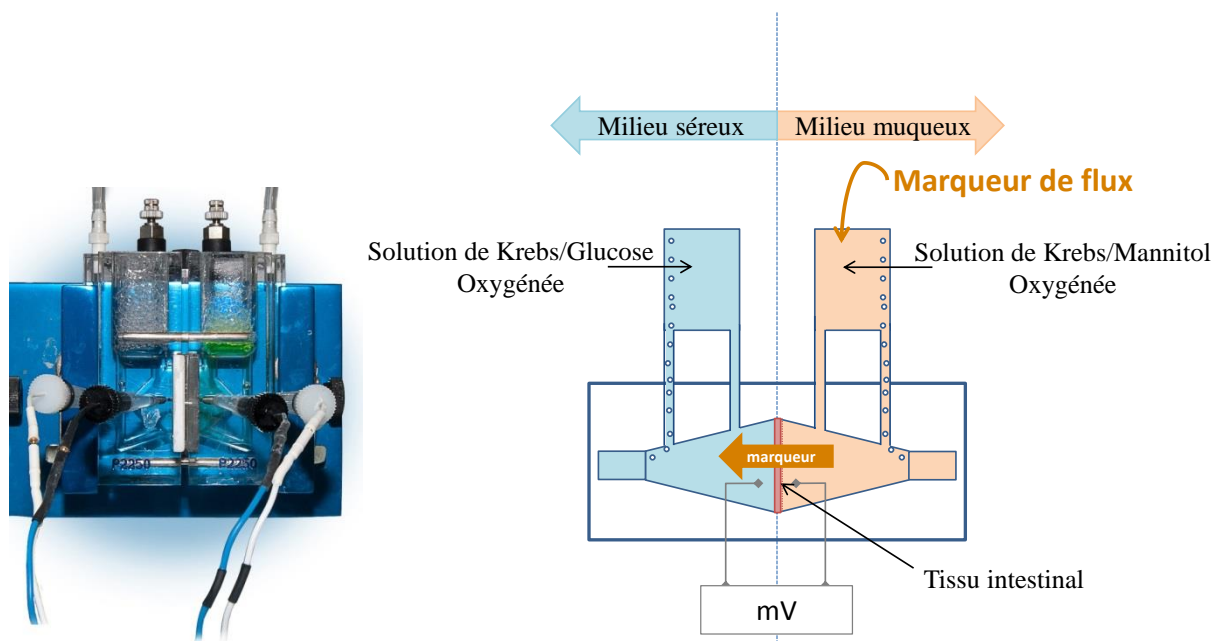


Figure 25 : Photo et représentation schématique d'une chambre d'Ussing (© Henri Flageul)

musculaires afin de ne conserver que la muqueuse, Figure 26) et coupé longitudinalement du côté opposé à la bordure reliée au mésentère. La muqueuse jéjunale a été ensuite placée entre les deux demi-chambres, remplies chacune d'une solution physiologique de Krebs (145 mM Na<sup>+</sup>, 128 mM Cl<sup>-</sup>, 0,32 mM PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, 2 mM Ca<sup>+</sup>, 1 mM Mg<sup>2+</sup>, 25 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 1 mM SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 6,3 mM K<sup>+</sup>) à un pH de 7,4. Les milieux physiologiques ont été complétés avec 16 mM de Mannitol du côté muqueux et 16 mM de D-Glucose du côté séreux. Les milieux muqueux et séreux ont été maintenus à une température de 39°C et oxygénés en continu.

Le FITC-dextran 4000 (FD-4) et la peroxydase du raifort (HRP) ont été utilisés comme marqueurs pour analyser la perméabilité intestinale. Le FD-4 est un marqueur du passage de molécules par voie paracellulaire. La HRP est un marqueur du passage de macromolécules par les voies transcellulaire par endocytose et paracellulaire. Au début de l'expérience (t<sub>0</sub>), les marqueurs FD-4 (400 µg/ml) et HRP (200 µg/ml) ont été ajoutés dans le milieu muqueux. Le milieu séreux a été échantillonné au début de l'expérience puis à 45 et 90 minutes après l'ajout des marqueurs. Les concentrations en FD-4 et HRP ont été mesurées dans le milieu séreux à 0, 45 et 90 minutes. La concentration en FD-4 a été mesurée à l'aide d'un fluorimètre (LB940 Mithras, Berthold Technologies, Thoiry, France). La concentration en HRP a été mesurée par spectrophotométrie (Multiskan spectrum, Thermo Labsystem, Midland, Canada) après réaction enzymatique avec de l'O-dianisidine (Sigma-Aldrich). Les flux de passage de marqueurs ont été calculés en ng/cm<sup>2</sup>/h.

#### *d. Expression des cytokines et des jonctions serrées par PCR en temps réel*

Lors du prélèvement des sections de jéjunum et d'iléon pour les analyses morphométriques, des portions de muqueuse au niveau jéjunale et des portions de plaque de Peyer au niveau iléal ont été disséquées. Ces échantillons de tissu ont été immédiatement congelés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C pour analyser ultérieurement l'expression de gènes dans la muqueuse jéjunale et dans les plaques de Peyer iléales par PCR en temps réel. Cette méthode a été choisie afin de mesurer l'expression de cytokines pro- et anti-inflammatoires (Tableau 21), représentatives de l'activation et de la régulation des réponses immunitaires à l'échelle de l'intestin. En parallèle, la méthode a été utilisée pour mesurer l'expression des gènes codant pour les jonctions serrées de l'épithélium intestinal, en tant qu'indicateur d'éventuelles régulations de la synthèse des jonctions serrées dans l'intestin.

Pour chaque échantillon de muqueuse jéjunale et de plaque de Peyer iléale, l'ARN total a été extrait à l'aide de Trizol® (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) après broyage dans des tubes





Figure 26 : Retrait des couches musculaires de l'intestin (stripping) pour montage du tissu en chambre d'Ussing (© Henri Flageul)

Tableau 21 : Identification des gènes analysés par PCR en temps réel

\*Uniquement dans l'essai 3

Nom de la protéine	Référence du gène	Séquences des couples d'amorces
Tumor Necrosis Factor $\alpha$ (TNF $\alpha$ )	NM_214022.1	F:GGTTATCGGCCCCAGAA R:TGGGCGACGGGCTTATC
Interleukine 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )	NM_214055.1	F:GCCAGTCTTCATTGTTTCAGGTTT R:TTGTCACCGTAGTTAGCCATCACT
Interleukine 8 (IL-8)	NM_213867.1	F:GCTCTCTGTGAGGCTGCAGTTC R:AAGGTGTGGAATGCGTATTTATGC
Interleukine 10 (IL-10)	NM_214041.1	F:CGGCGCTGTCATCAATTTCTG R:CCCCTCTCTTGGAGCTTGCTA
Transforming Growth Factor $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)*	NM_214015.1	F:AGCGGCAACCAAATCTATGATAA R:CGACGTGTTGAACAGCATATATAAGC
Zonula Occludens 1 (ZO-1)	XM_003480423.3	F:AGGCGATGTTGTATTGAAGATAAATG R:TTTTTGCATCCGTCAATGACA
Occludin	NM_001163647.2	F:CACCCTCCAGATTGGCTGAT R:ATCAGGTGACCCGCTGACA

à billes à l'aide du broyeur Precellys® (Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, France). L'ARN extrait a été suspendu dans de l'eau exempte de RNAses. La concentration et la pureté des ARN extraits ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre (Denovix Inc., Wilmington, USA). L'intégrité des ARN a été analysée par électrophorèse à l'aide du Bioanalyzer 2100 (Agilent, Les Ulis, France). Les ADN complémentaires (ADNc), ont été ensuite synthétisés à partir des ARN totaux extraits, au cours de la « Reverse Transcription », par l'initiation d'une réaction enzymatique permettant la transcription non-spécifique de l'ADNc (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA).

Les couples d'amorces spécifiques des gènes TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10, TGF- $\beta$ 1, ZO-1 et Occludin ont été dessinés à partir du logiciel Primer Express (Applied Biosystems, USA) à partir des séquences existantes chez le porc. Les gènes codant pour les protéines sélectionnées (Tableau 21) ont été amplifiés par PCR en temps réel (StepOnePlus™ Real Time PCR system, Applied Biosystems), au cours de 40 cycles d'amplification, réalisés en présence des couples d'amorces spécifiques des gènes. Les cycles d'amplification ont été constitués comme suit : 50°C pendant 2 minutes, 95°C pendant 20 secondes, puis 40 cycles de dénaturation à 95°C pendant 3 secondes et d'appariement à 60°C pendant 30 secondes. L'amplification a été réalisée en présence d'une molécule fluorescente, permettant la quantification du nombre de copies de gènes à chaque cycle par mesure de la fluorescence. L'amplification du gène a été quantifiée en Ct (« cycle threshold » ou cycle seuil). Le Ct correspond au point à partir duquel la fluorescence est supérieure à une limite seuil (correspondant généralement à 10  $\times$  l'écart type de la fluorescence de base). Un ou plusieurs gènes de référence ont été analysés en parallèle des gènes d'intérêt et sélectionnés lorsque leur expression n'était pas influencée par les conditions expérimentales. L'expression des gènes d'intérêt a été calculée en expression relative selon la méthode semi-quantitative de Pfaffl (2001), comme suit :

$$\text{Expression relative du gène cible} = \frac{E_c^{-\Delta Ct \text{ cible}}}{E_r^{-\Delta Ct \text{ ref}}}$$

Où  $E_c$  = Efficacité du gène cible,  $E_r$  = Efficacité du gène de référence,  $\Delta Ct$  cible = différence entre le Ct de l'échantillon et le Ct du calibrateur interne pour le gène cible,  $\Delta Ct$  ref = différence entre le Ct de l'échantillon et le Ct du calibrateur interne pour le gène de référence. Lorsque plusieurs gènes de référence sont utilisés,  $\Delta Ct$  ref est remplacé par un facteur de normalisation, calculé à partir de l'application GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002).



## 5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées dans l'objectif de tester l'effet du traitement expérimental (effet fixe) sur les paramètres mesurés. Pour l'ensemble des essais, les résultats associés aux mesures quantitatives à l'échelle de l'animal (poids, GMQ, consommation alimentaire, efficacité alimentaire, digestibilité) et aux mesures quantitatives à l'échelle tissulaire et moléculaire (morphologie intestinale, perméabilité intestinale, haptoglobine plasmatique, expression de gènes) ont été analysées par ANOVA, à l'aide du logiciel SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Les sous-essais « croissance » et « digestibilité » dans l'essai 1 ayant été conduits dans deux environnements distincts et présentant des profils de croissance contrastés, les résultats des performances de croissance ont été analysés séparément. Dans l'essai 1 (« croissance » et « digestibilité »), l'effet du bloc a été inclus dans l'analyse statistique et le poids initial au sevrage a été pris en compte en covariable pour l'analyse des performances de croissance. Dans l'essai 2, les effets de la mère, du sexe et de la cellule ont été pris en compte comme effet aléatoire.

Dans l'essai 3, les performances de croissance ont été calculées et analysées séparément pour la période d'allaitement et la période post-sevrage parce que les effectifs d'animaux différaient entre les deux périodes. Les analyses ont été réalisées par ANOVA à l'aide de la procédure MIXED de SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). En parallèle, la croissance en post-sevrage était très variable entre individus et était donc délicate à analyser. Nous avons donc calculé pour chaque individu son « retard de croissance », comme la différence entre le poids effectif mesuré quotidiennement en post-sevrage et le poids « potentiel » de l'animal au même âge. Ce poids « potentiel » correspond à un poids théorique calculé par individu et à chaque âge selon l'équation suivante :

$$\text{Poids potentiel à X jours post-sevrage} = \text{Poids au sevrage} + (\text{GMQ maternité} \times X)$$

Où GMQ maternité correspond au GMQ moyen de chaque individu de 14 à 27 jours d'âge.

La différence de poids (ou « retard de croissance ») a été analysée en mesures répétées à l'aide de la procédure MIXED de SAS. Les analyses en mesures répétées de la croissance en maternité et en post-sevrage ont inclus l'effet du traitement, l'effet du bloc, l'effet de l'âge et l'interaction entre le traitement et l'âge.



Les résultats obtenus dans l'essai 3 pour les concentrations en haptoglobine plasmatique et la morphologie intestinale ont été analysés par ANOVA en incluant les effets du traitement, de l'âge (27, 30 et 42 jours) et de l'interaction entre le traitement et l'âge (Procédure GLM de SAS). La même procédure a été appliquée aux résultats d'expression de gènes à 27 et 30 jours d'âge, mais les résultats à 42 jours d'âge ont dû être analysés séparément car l'expression moyenne des gènes de référence utilisés différait entre 27/30 jours et 42 jours d'âge.

Nous avons choisi d'analyser les troubles digestifs en post-sevrage par l'observation de la consistance des fèces, à l'aide d'un barème de notation allant de 0 à 4. Les méthodes d'analyse statistique de ces données qualitatives sont variées. Dans certaines études, ces données qualitatives sont transformées en données quantitatives par la création d'un score cumulé (somme des scores sur la période d'observation visuelle). D'autres études utilisent des analyses de fréquence des diarrhées, soit quotidiennes (Montagne *et al.*, 2012), soit par création d'une fréquence globale pour une période donnée, appelée incidence (Huang *et al.*, 2004). Pour des raisons de variabilité individuelle forte liée à nos modèles expérimentaux favorisant les troubles digestifs, nous avons choisi cette dernière méthode pour analyser ces données. L'incidence des diarrhées a été calculée pour chaque régime expérimental comme suit :

$$\text{Incidence \%} = \frac{\text{Nombre de diarrhées recensées sur la période totale d'observation}}{\text{Nombre de porcs} \times \text{Nombre de jours d'observation}}$$

L'effet du traitement expérimental sur l'incidence des diarrhées observées a été analysé par test de Khi deux à l'aide de la procédure FREQ de SAS. Dans l'essai 3, nous avons également testé la probabilité de survie à l'évènement « diarrhée ». Les analyses de survie sont généralement utilisées en recherche biomédicale afin d'étudier l'effet d'un traitement sur la survie des individus à un évènement clinique (maladie). L'analyse de survie a été réalisée à l'aide de la procédure LIFETEST de SAS. Pour chaque animal, la durée de survie a été définie comme le nombre de jours écoulés entre le sevrage et l'apparition d'un épisode de diarrhée. Les individus ne présentant aucun signe de diarrhée pendant la période d'observation avaient une durée de survie égale au nombre total de jours d'observation (14 jours) et ont été identifiés comme censurés. La méthode de Kaplan-Meier a été utilisée pour estimer la probabilité de survie à l'évènement « diarrhée » au cours des 14 jours d'observation post-sevrage, pour chaque traitement expérimental. Les probabilités de survie



au cours du temps des groupes supplémentés en Spiruline et en Chlorelle ont été comparées à la probabilité de survie du groupe non supplémenté, en utilisant le test de Wilcoxon.

Pour l'ensemble des analyses statistiques réalisées, l'effet du traitement expérimental a été considéré significatif lorsque la *P*-value était inférieure à 0,05 et les *P*-values entre 0,05 et 0,10 ont été considérées comme des tendances.





## **Chapitre 1**

Effets d'une supplémentation en microalgues en post-sevrage  
sur les performances de croissance, la digestibilité des  
nutriments et la santé digestive du porcelet sevré



- A. **Publication 1** : Effects of dietary supplementation with freshwater microalgae on growth performance, nutrient digestibility and gut health in weaned piglets





# Effects of dietary supplementation with freshwater microalgae on growth performance, nutrient digestibility and gut health in weaned piglets

H. Furbeyre<sup>1,2</sup>, J. van Milgen<sup>1</sup>, T. Mener<sup>2</sup>, M. Gloaguen<sup>2</sup> and E. Labussière<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>PEGASE, Agrocampus Ouest, INRA, 35590 Saint Gilles, France; <sup>2</sup>Cooperl Arc Atlantique, 1, rue de la gare, 22640 Plestan, France

(Received 9 May 2016; Accepted 23 June 2016; First published online 25 July 2016)

*In pigs, digestive disorders associated with weaning lead to antibiotic use to maintain intestinal health. Microalgae have been studied in humans and rodents for their beneficial effects on health. The nutritional value of microalgae in animal diets has been assessed, but results were not conclusive. Dietary supplementation with microalgae as an alternative to antibiotic use was studied in two trials (72 piglets with initial BW = 9.1 ± 1.1 kg in trial 1 and 24 piglets with initial BW = 9.1 ± 0.9 kg in trial 2). All piglets were weaned at 28 days of age and then housed in individual cages. Piglets were randomly allocated to one of the four diets during 2 weeks after weaning: a standard diet with no supplementation (NC) or the standard diet supplemented with 1% Spirulina (SP), with 1% Chlorella (CV), or with 0.2% of colistin as positive control (PC). Trial 1 was performed to determine the effect of microalgae supplementation from 28 to 42 days on performance and incidence of diarrhoea. Animals received then a standard diet from 42 to 56 days of age. Trial 2 was performed from 28 to 42 days of age to assess nutrient digestibility of the experimental diets and to determine inflammatory status and intestinal morphology at 42 days of age. In trial 1, 94% of the pigs had diarrhoea in the 1st week after weaning with no beneficial effect of colistin on diarrhoea incidence, average daily feed intake (ADFI), average daily gain (ADG), and gain : feed (G : F) ratio. This suggests that the diarrhoea was due to digestive disorders that did not result from enterotoxigenic Escherichia coli infection. Supplementation with either Spirulina or Chlorella did not affect ADFI, ADG and G : F in trials 1 and 2 (P > 0.10). Diarrhoea incidence was reduced in CV pigs compared with NC, SP and PC pigs (P < 0.05). Total tract digestibility in pig receiving microalgae was greater for gross energy (P < 0.05), and tended to be greater for dry matter, organic matter and NDF (P < 0.10) compared with NC and PC pigs. Villus height at the jejunum was greater in SP and CV pigs compared with NC and PC pigs (P < 0.05). This study shows a potential effect of both Spirulina and Chlorella supplementation on intestinal development and a potential of Chlorella supplementation to manage mild digestive disorders. Further investigation is necessary to determine the mechanism action of Spirulina and Chlorella on gut health and physiology.*

Keywords: nutrition, digestion, microalgae, diarrhoea, weaning

## Implications

Weaning contributes to the appearance of digestive disorders in piglets, which are the main cause of the decrease in growth performance and use of antibiotics. Microalgae have been studied in humans and rodents for their beneficial effects on health and could represent an alternative to antibiotic use to ensure gut health after weaning.

## Introduction

Weaning is a critical period in pig production because of social, environmental and dietary changes that result from

the separation of piglets from the sow, mixing of litters and the transition from a liquid to solid feed. During this stage, piglets may exhibit post-weaning diarrhoea and lower growth performance leading to the use of antibiotics to control digestive disorders. There is an increasing interest and need to reduce the use of antibiotics and to look for alternatives to manage disorders caused by weaning. Cyanobacteria *Spirulina platensis* and freshwater microalga *Chlorella vulgaris* are frequently referenced in human nutrition for their physicochemical properties with a potential benefit on gut health, such as antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities (Kitada *et al.*, 2009; Hoseini *et al.*, 2013). In pigs, *Spirulina* and *Chlorella* could help maintaining digestive function after weaning by limiting

<sup>†</sup> E-mail: etienne.labussiere@rennes.inra.fr





Furbeyre, van Milgen, Mener, Gloaguen and Labussière

intestinal damage caused by immune and inflammatory responses to dietary transition and oxidative stress (Lallès *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2012). Dietary supplementation with *Spirulina* and *Chlorella* has been considered for their nutritional value (Lipstein and Hurwitz, 1980; Yap *et al.*, 1982), but few studies considered *Spirulina* and *Chlorella* as functional ingredients (Janczyk *et al.*, 2009). Besides, information on their effect on digestive health and function during the early stages of growth in piglets is scarce. The objective of this study is to determine the ability of dietary supplementation of *Spirulina* and *Chlorella* to alleviate digestive disorders after weaning, by evaluating their effects on growth performance and gut structure and function in piglets.

### Material and methods

The protocol for the experiments was performed in accordance with French law on animal experimentation under the supervision of E.L. and J.v.M. (agreement nos 35 to 110 and 7704, respectively).

#### Experimental design

Two trials were conducted simultaneously in 96 piglets ((Large White × Landrace) × Piétrain, initial BW = 9.1 ± 1.1 kg) weaned at 28 days of age from the experimental herd of INRA, Saint-Gilles, France. Blocks of four pigs each from the same litter, with the same sex, and with a similar BW were created, resulting in 12 blocks of barrows and 12 blocks of females. Piglets within a block were allocated to one of four dietary treatments (Table 1): (i) a negative control (NC) standard weaner diet without antibiotics, formulated to meet the requirements for 10 to 20 kg pigs; (ii) a supplementation with *S. platensis* (SP), corresponding to 99% of NC + 1% of spray-dried *S.*; (iii) a supplementation with *C. vulgaris* (CV), corresponding to 99% of NC + 1% of spray-dried *C. vulgaris*; (iv) a positive control (PC) corresponding to 99.8% of NC + 0.2% colistin sulphate (Acti Coli B, Biove, France; 10<sup>6</sup> IU/g). The spray-dried *S. platensis* and *C. vulgaris* powders were obtained from Setalg<sup>®</sup>, Pleubian, France.

**Trial 1.** The first trial aimed to determine the effects of *Spirulina* and *Chlorella* supplementation on growth performance and their potential to prevent or limit digestive disorders. In total, 72 piglets (nine blocks of males and nine blocks of females; 18 pigs for each treatment) were housed individually in cages (0.6 × 0.8 m) in an environmentally controlled facility until 56 days of age and were provided with *ad libitum* access to feed and water. Ambient temperature of housing was maintained at 28°C and decreased by 1°C each week until 25°C at the end of the experiment. From 28 to 42 days of age, piglets received one of the four experimental diets according to the treatment they were assigned to. From 42 to 56 days of age, all pigs received a standard weaner diet (23% wheat, 25% corn, 24% barley and 23% soya bean meal) without antibiotics.

**Trial 2.** The second trial was performed to determine digestibility coefficients of nutrients and energy of the experimental diets and to explore the intestinal health status of piglets after having received the experimental diets for 14 days. In all, 24 piglets (three blocks of males and three blocks of females; six pigs for each treatment) were housed individually in cages (0.6 × 0.8 m) equipped with a grid and a slurry pit under a slatted floor for faeces and urine collection and were provided with *ad libitum* access to feed and water until 42 days of age. Ambient temperature of housing was maintained at 28°C. Piglets were stunned electrically and killed by exsanguination at the end of the experiment for blood and tissue sampling.

#### Measurements and sampling

**Trial 1.** Pig weights were recorded at 28, 35, 42, 49 and 56 days of age without fasting. Offered feed was weighed each day individually and a sample of daily distribution of the experimental diets (from 28 to 42 days) and of the standard weaner diet (from 43 to 56 days) was stored at 4°C. A first set of aliquots for each daily sample was used to measure dry matter (DM) after drying at 103°C for 24 h. A second set of aliquots for daily samples of each experimental diet and of the weaner diet was pooled for the respective periods of distribution excluding transitory feeding for three days, from 42 to 44 days between experimental and weaner diet. Then, pools were ground in a hammer mill equipped with a 1 mm grid for further laboratory analyses. Feed refusals were collected individually each day and dried at 103°C for 24 h before weighing. Diarrhoea score of each pig was assessed visually for each day of the experiment with a score ranging from 0 to 3 according to the description of Whelan *et al.* (2004): 0 = hard and formed corresponding to normal faeces, 1 = soft and formed corresponding to moist faeces, 2 = loose and unformed corresponding to mild diarrhoea and 3 = liquid or severe diarrhoea. Diarrhoea incidence was calculated for each treatment according to the formula reported by Huang *et al.* (2004): diarrhoea incidence (%) = (number of diarrhoea recorded)/(number of pigs by treatment × total experimental days) × 100, where the number of diarrhoea recorded was the sum of the number of pigs with diarrhoea observed each day for the total experimental period.

**Trial 2.** Pig weights were recorded at 28, 35 and 42 days of age. Offered feed was weighed every day for each animal and a sample was collected daily. Offered feed and refused feed were weighed and analysed as described for trial 1. Faeces and urine were collected during two 1-week periods: from 28 to 34 days and from 35 to 41 days of age. Faeces were collected daily and stored at 4°C. Urine was collected daily, acidified with a 10% sulphuric acid solution to maintain pH below 2, and stored at 4°C. Faeces and urine were pooled for a 1-week period of collection and weighed. After homogenisation of pooled urine and faeces, one urine sample and three faeces samples were weighed and stored at -20°C for further laboratory analyses. DM was measured on two samples of faeces after drying at 103°C for 24 h. The third sample of faeces was freeze-dried and then ground





Table 1 Composition of experimental diets

Items	Experimental diets				Standard weaner diet (trial 1 – 28 to 42 days)
	NC	SP	CV	PC	
Ingredients (%)					
Wheat					23.20
Corn					25.00
Barley	45.31	44.86	44.86	45.22	24.05
Soya bean meal	17.50	17.33	17.33	17.47	22.57
Soy protein concentrate	2.50	2.47	2.47	2.49	–
Whey powder	20.00	19.80	19.80	19.96	–
Skim milk	4.80	4.75	4.75	4.79	–
Vegetal fat	5.50	5.44	5.44	5.49	0.45
Calcium carbonate	1.41	1.40	1.40	1.41	1.13
Monocalcium phosphate	0.80	0.79	0.79	0.80	0.97
Vitamin and mineral premix <sup>1</sup>	0.50	0.49	0.49	0.50	0.50
L-lysine HCl	0.41	0.41	0.41	0.41	0.78
DL-methionine	0.26	0.26	0.26	0.26	0.20
L-threonine	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
L-tryptophan	0.46	0.45	0.45	0.46	0.43
L-valine	0.07	0.07	0.07	0.07	0.04
Acidifier	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Phytase	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
<i>Spirulina platensis</i> (spray-dried)	–	1.00	–	–	–
<i>Chlorella vulgaris</i> (spray-dried)	–	–	1.00	–	–
Colistin	–	–	–	0.20	–
Chemical composition (% in DM)					
Analysed					
CP (N × 6.25)	20.62	20.75	21.37	20.69	21.29
GE (MJ/kg DM)	18.84	18.86	18.82	18.89	18.08
Fat	6.85	5.89	6.77	6.38	2.40
Ash	6.63	6.04	6.53	6.58	5.73
Crude fibre	3.46	3.43	3.39	3.40	3.51
NDF	12.43	13.88	13.47	13.17	12.80
ADF	3.58	3.58	3.66	3.64	4.80
ADL	0.39	0.49	0.43	0.49	0.42
Calculated <sup>2</sup>					
DE (MJ/kg)	14.15	14.17	14.14	14.19	13.58
ME (MJ/kg)	13.49	13.50	13.47	13.52	12.99
NE (MJ/kg)	10.03	10.05	10.02	10.06	9.66
Amino acid composition <sup>3</sup> (%)					
Lys	1.22	1.22	1.22	1.22	1.13
Thr	0.76	0.76	0.76	0.76	0.71
Met	0.51	0.51	0.51	0.51	0.44
Cys	0.25	0.25	0.25	0.25	0.28
Trp	0.23	0.23	0.23	0.23	0.22
Ile	0.68	0.68	0.68	0.68	0.64
Val	0.82	0.82	0.82	0.82	0.76
Leu	1.15	1.15	1.15	1.15	1.20

NC = pigs in the negative control group were fed a basal diet; SP = pigs were fed basal diet + 1% spray-dried *Spirulina*; CV = pigs were fed basal diet + 1% spray-dried *Chlorella*; PC = pigs in the positive control group were fed a basal diet supplemented with 0.2% colistin; DM = dry matter; DE = digestible energy; ME = metabolisable energy; NE = net energy; GE = gross energy.

<sup>1</sup>Supplied the following per kilogram of diet: vitamin A, 10 000 IU; vitamin D<sub>3</sub>, 2000 IU; vitamin E, 20 mg; vitamin C, 40 mg; vitamin B<sub>1</sub>, 2 mg; vitamin B<sub>2</sub>, 5 mg; calcium panthoate, 10.85 mg; niacin, 20 mg; vitamin B<sub>12</sub>, 0.03; vitamin B<sub>6</sub>, 5 mg; vitamin K<sub>3</sub>, 2 mg; folic acid, 1 mg; biotin, 0.2 mg; choline chloride, 600 mg; Fe, 103.75 mg; Cu, 20 mg; Zn, 99.3 mg; Mn, 40 mg; I, 0.6 mg; Co, 1 mg; Se, 0.3 mg.

<sup>2</sup>Calculations for DE, NE and ME have been performed using EvaPig<sup>®</sup> software. Calculations are based on tabular values (Sauvant *et al.*, 2004). DE/GE = 82.7; ME/DE = 95.3; NE/ME = 74.4.

<sup>3</sup>Standardized ileal digestible values.



Furbeyre, van Milgen, Mener, Gloaguen and Labussière

in a hammer mill equipped with a 1 mm grid for further laboratory analyses.

Blood samples were collected immediately after slaughter in heparinized tubes and stored at 0°C. Blood samples were then centrifuged for 15 min at 3000 × g at 4°C for plasma collection. Plasma samples were stored at -20°C for further measurement of haptoglobin concentration. Three centimetre segments were collected from the exact middle of the small intestine, which was considered as the jejunum and at 10 cm from the ileo-caecal junction, which was considered as the ileum, flushed with a 0.9% NaCl solution, fixed with a 4% formaldehyde-phosphate buffer, and stored at 4°C for microscopic assessment of mucosal morphology.

#### Laboratory analyses

Pools of offered feed from trials 1 and 2 and faeces from trial 2 were dried for 24 h at 103°C for DM determination. Pools of offered feed and collected faeces were analysed for ash, gross energy (GE), nitrogen (N), crude fibre and the fibre fractions NDF, ADF and ADL. Ash was determined after ignition at 550°C for 6 h according to the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) method (1990) and organic matter was calculated as the difference between DM and ash. The GE content was measured using an adiabatic bomb calorimeter (IKA, Staufen, Germany) with the method described by the International Organization for Standardisation (ISO 9831:1998; ISO methods, <http://www.iso.org>). The Dumas method was used for determination of N content using a Rapid N analyser (Elementar, Lyon, France) according to the AOAC (1990). The NDF, ADF and ADL fractions were analysed as described by Van Soest *et al.* (1991). Urine samples were analysed for N content using the Dumas method on liquid samples. GE in the urine was analysed in an adiabatic bomb calorimeter (IKA) after freeze-drying 30 ml in polyethylene bags of known GE content (ISO 9831:1998).

Plasma concentration of haptoglobin was analysed using a colorimetric method (Phase Haptoglobin Assay T801; Tridelta Ltd, Maynooth, Ireland) with an automatic analyser (Konelab 20i; Thermo Scientific, Courtaboeuf, France).

The fixed intestinal tissues were embedded in paraffin, sectioned at a 7 µm thickness and stained with hematoxylin and eosin. Villus height and crypt depth were measured at 40 × magnification using an Eclipse E400 microscope (Nikon, Champigny-sur-Mame, France) and NIS-Elements AR v3.0 software for numeric image acquisition. In all, 15 straight and complete villi and 10 crypts were selected from each sample for mucosal morphometry for the jejunum and ileum.

#### Calculations

The average daily gain (ADG) was calculated for each piglet per period in trial 1 (from 28 to 41 days, from 42 to 56 days and total period) and trial 2 (from 28 to 34 days, from 35 to 42 days and total period). The DM intake was calculated as follows:

$$\text{Dry matter intake} = \text{daily offered feed (g)} \times \text{percentage of DM of daily offered sample} - \text{daily dried refusal (g)}$$

The average daily feed intake (ADFI) was calculated per period in trial 1 (from 28 to 41 days, from 42 to 56 days and total period) and trial 2 (from 28 to 34 days, from 35 to 42 days and total period) by meaning daily feed intake adjusted for 87% DM.

The gain : feed ratio (G : F) was calculated as follows:

$$G : F = \text{Average daily gain (g)} / \text{Average daily feed intake (g)}$$

Digestibility coefficients were calculated for DM, GE, N, crude fibre, NDF, ADF and ADL as the difference between amounts ingested and excreted in faeces and expressed in percentage of ingested quantity. Nitrogen retained and metabolisable energy were calculated as the difference between ingested and excreted in faeces and urine. Nitrogen retained is expressed in percentage of ingested quantity and metabolisable energy is expressed in percentage of digested quantity.

#### Statistical analyses

Growth performance, total tract digestibility, haptoglobin concentration and intestinal morphology were analysed using the Proc Mixed of SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The pig was considered as the experimental unit. The statistical model included the fixed effects of diet and block. Weaning weight was added as a covariable for growth performance analysis. The Shapiro-Wilk's normality test was performed on the residuals for each trait. Data for G : F from 28 to 42 days were transformed logarithmically before the statistical analysis to validate this assumption. Diarrhoea incidence was analysed by a  $\chi^2$  contingency test using the Proc Freq of SAS (SAS Institute, Inc.). Probability values under 0.05 were considered to be significant and probability values under 0.10 were considered as a trend.

## Results

### Trial 1

An unforeseen drop in ambient temperature from 28°C to 22°C during 4 h occurred in pigs' housing at 32 days of age. As a consequence, digestive disorders appeared so that 94% of animals had at least 1 day of diarrhoea during the first phase of the experiment. Nevertheless, only four piglets, one from each experimental group, had a drastic decrease of feed intake and vitality requiring an antibiotic treatment. Measurements performed on these animals were excluded from the statistical analysis.

There was no difference between treatments for ADFI and ADG of piglets during the experiment ( $P > 0.10$ ; Table 2). Piglet BW increased from 9.1 kg at 28 days of age to 20.1 kg at 56 days of age, resulting in an ADG of  $394 \pm 63$  g/day for the total duration of the experiment. Statistical analysis with contrasts showed a significant improvement in G : F in CV pigs compared with SP pigs from 28 to 42 days and for the total period ( $P < 0.05$ ), but no overall effect of supplementation with microalgae was observed, compared with NC and PC pigs ( $P > 0.10$ ). Colistin supplementation did not affect G : F ratio compared with NC ( $P > 0.10$ ).





**Table 2** Effect of dietary supplementation with *Spirulina* and *Chlorella* on BW, average daily feed intake (ADFI), average daily gain (ADG), and gain:feed (G:F) ratio in weaned piglets (trial 1)<sup>1</sup>

	Experimental diets					P value <sup>2</sup>		
	NC	SP	CV	PC	RSD	Main effect		
						Ab	M	SP/CV
Number of piglets	17	17	17	17				
BW (kg)								
28 days	9.2	9.1	9.2	8.9	0.8	0.40	0.59	0.83
42 days	12.4	12.3	12.6	12.5	0.8	0.74	0.87	0.21
56 days	20.1	20.0	20.1	20.3	1.4	0.69	0.79	0.87
ADFI (g/day)								
28 to 42 days	355	360	352	355	49	0.96	0.92	0.64
42 to 56 days <sup>3</sup>	927	976	912	966	121	0.85	0.88	0.43
28 to 56 days	641	668	632	660	79	0.49	0.97	0.20
ADG (g/day)								
28 to 42 days	237	231	255	244	54	0.72	0.85	0.21
42 to 56 days	548	553	535	556	69	0.74	0.60	0.45
28 to 56 days	393	392	395	400	50	0.69	0.79	0.87
G:F (g/g)								
28 to 42 days <sup>3</sup>	0.66	0.63	0.71	0.67	—	0.58	0.99	0.02
42 to 56 days	0.60	0.57	0.59	0.58	0.05	0.34	0.53	0.41
28 to 56 days	0.61	0.59	0.62	0.60	0.04	0.56	0.73	0.02

<sup>1</sup>Data are presented as least-squares means of 17 individually housed piglets. NC = pigs in the negative control group were fed a basal diet; SP = pigs were fed 99% basal diet + 1% spray-dried *Spirulina*; CV = pigs were fed 99% basal diet + 1% spray-dried *Chlorella*; PC = pigs in the positive control group were fed a basal diet supplemented with 0.2% colistin.

<sup>2</sup>ANOVA performed on BW, ADFI, ADG and G:F ratio using MIXED model (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) including the effects of dietary treatment and block, considering the effects of antibiotic supplementation compared with NC (Ab), microalgae supplementation compared with NC and PC (M) and pairwise comparison between SP and CV (SP/CV) by application of orthogonal contrasts.

<sup>3</sup>Logarithmic transformations were previously performed on G:F 28 to 42 days data to assess the statistical analysis. Values are presented in table as means of the estimated data from the MIXED model after exponential transformation. SD = 0.07.

The percentage of piglets having at least 1 day of diarrhoea after weaning (Figure 1) increased quickly until 33 days of age and attained 88% after 1 week. From weaning until the end of the experiment, 94% of piglets had diarrhoea and 60% exhibited severe diarrhoea. The incidence of diarrhoea (Table 3) decreased in CV pigs compared with NC, PC and SP pigs, for the period of experimental diet distribution ( $P = 0.01$ ) and also for the total period ( $P < 0.01$ ). Severe diarrhoea was also reduced in CV pigs compared with NC, PC and SP pigs for the total period ( $P < 0.05$ ).

#### Trial 2

Growth performance was similar for NC, PC, CV and SP pigs ( $P > 0.10$ ; Table 3). Total tract digestibilities of DM, organic matter, N, GE, crude fibre, NDF and ADF were similar between NC and PC pigs and between SP and CV pigs ( $P > 0.10$ ; Table 4). Digestibility of GE was significantly greater in SP and CV piglets compared with NC and PC piglets ( $P < 0.05$ ; Table 4). Dietary supplementation with *Spirulina* and *Chlorella* tended to improve DM, organic matter and NDF digestibilities compared with NC and PC diets ( $P < 0.10$ ; Table 4). Metabolised energy and nitrogen retained did not differ between dietary treatments ( $P > 0.10$ ).

The plasma haptoglobin concentration at the end of the experiment was not affected by the dietary treatment ( $P > 0.10$ ; Table 5). At the end of the distribution period, villus height at the jejunum was reduced in PC pigs compared with NC pigs (356 v. 481  $\mu\text{m}$ ) ( $P < 0.04$ ; Table 5). The CV and SP pigs had higher villus height and V:C ratio at jejunum site compared with NC and PC pigs ( $P < 0.05$ ; Table 5). The dietary treatment did not affect crypt depth at the jejunum ( $P > 0.10$ ). Mucosal morphometry did not differ between the experimental diets at the ileum ( $P > 0.10$ ).

#### Discussion

The objective of this study was to determine the effects of *Spirulina* and *Chlorella* on growth performance and intestinal morphology in weaned piglets. To our knowledge, there is no information about the effects of these microalgae on the digestive tract in pigs. Nutritional properties of *Spirulina* and *Chlorella* have been evaluated in pigs (Yap *et al.*, 1982), poultry (Lipstein and Hurwitz, 1980) and rabbits (Peiretti and Meneiri, 2008) because of their high content in proteins, polyunsaturated fatty acids, vitamins and minerals (Tokuşoglu and Ünal, 2003), but these studies reported contradictory results on their bioavailability. Some authors



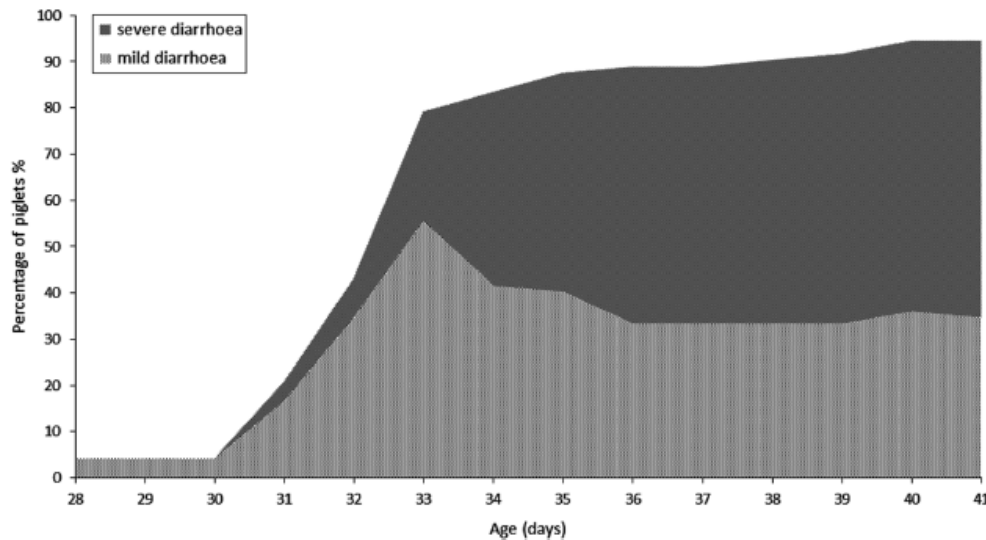


Figure 1 Percentage of piglets in trial 1 that exhibited mild or severe diarrhoea during the first phase of the experiment, considering the maximal severity recorded since weaning.

Table 3 Effect of dietary supplementation with *Spirulina* and *Chlorella* on diarrhoea incidence in weaned piglets (trial 1)<sup>1</sup>

	Experimental diets				P value <sup>2</sup>
	NC	SP	CV	PC	
Number of piglets	17	17	17	17	
Diarrhoea incidence <sup>3</sup> (%)					
Diarrhoea <sup>3</sup>					
28 to 42 days	36 <sup>a</sup>	36 <sup>a</sup>	24 <sup>b</sup>	34 <sup>a</sup>	0.01
42 to 56 days	31	31	25	34	0.31
28 to 56 days	34 <sup>a</sup>	34 <sup>a</sup>	24 <sup>b</sup>	33 <sup>a</sup>	<0.01
Severe diarrhoea					
28 to 42 days	11	9	6	11	0.20
42 to 56 days	6	6	3	6	0.35
28 to 56 days	9 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	5 <sup>b</sup>	9 <sup>a</sup>	0.05

<sup>a,b</sup>Values within a row with different superscripts differ significantly at  $P < 0.05$ .

<sup>1</sup>Incidence was calculated by treatment with 17 piglets in each as follows: diarrhoea incidence (%) = (number of diarrhoea recorded)/(number of pigs by treatment × total experimental days) × 100, where the number of diarrhoea recorded was the sum of the number of pigs with diarrhoea observed each day for the experimental period. NC = pigs in the negative control group were fed a basal diet; SP = pigs were fed basal diet + 1% spray-dried *Spirulina*; CV = pigs were fed basal diet + 1% spray-dried *Chlorella*; PC = pigs in the positive control group were fed a basal diet supplemented with 0.2% colistin.

<sup>2</sup>Statistical analysis was conducted by  $\chi^2$ -test on diarrhoea incidences. P = effect of dietary treatment.

<sup>3</sup>Diarrhoea = number of pig days with diarrhoea score  $\geq 2$ . Severe diarrhoea = number of pig days with diarrhoea score  $\geq 3$ . Diarrhoea score = 0, normal faeces; 1, moist faeces; 2, mild diarrhoea; 3, severe diarrhoea.

observed a growth depression in animals receiving diets supplemented with *Spirulina* and *Chlorella* in relation with increasing levels of inclusion and suggested a low bioavailability of nutrients from microalgae (Lipstein and Hurwitz, 1980; Yap *et al.*, 1982). This hypothesis was confirmed by Peiretti and Meneiri (2008) who reported a decrease in nutrient digestibility in rabbits supplemented with 15% of *Spirulina* in the diet. Our experiment was performed with a

low level of inclusion to minimise the potential deleterious effect of *Spirulina* and *Chlorella* on growth performance. Pigs receiving diets supplemented with 1% *Spirulina* or *Chlorella* did not show a lower nutrient digestibility than control pigs.

To consider the effects of *Spirulina* and *Chlorella* supplementation on gut health, the occurrence of diarrhoea was chosen as a criterion to describe digestive disorders. Montagne *et al.* (2004) assessed clinical disorders in piglets on the basis of a daily frequency of diarrhoea. In our experiment, this method was not satisfactory because of the high variability in individual responses. Alternatively, the calculation of a global diarrhoea incidence for the total period was used in our study, as described by Huang *et al.* (2004).

#### Health status

The first trial was conducted with piglets weaned at 28 days of age and housed individually in a clean barn. Almost 90% of piglets exhibited moderate or severe diarrhoea during the 1st week post-weaning, which is much greater than in a study of Montagne *et al.* (2012; 29% of piglets with diarrhoea) in the same facilities. The maximal frequency of pigs with diarrhoea recorded in our experiment occurred at 33 days of age, which is 24 h after the decrease in ambient temperature from 28°C to 22°C during 4 h. Le Dividich (1981) indicated that piglets under fluctuating temperatures may be more susceptible to diarrhoea because of an altered thermoregulation during the 1st days after weaning and an activation of neuroendocrine function by thermal stress, increasing gastrointestinal disturbances. Considering the negative effect of fluctuations in ambient temperature on digestive health in newly weaned piglets, the high diarrhoea occurrence in trial 1 is likely the result from the unforeseen drop in ambient temperature 4 days after weaning.

Despite a high occurrence of digestive disorders in trial 1, growth and feed intake were similar or higher than those reported in previous studies (Bikker *et al.*, 2006; Le Floc'h





**Table 4** Effect of dietary supplementation with *Spirulina* and *Chlorella* on total tract digestibility in weaned piglets from 28 to 42 days of age (trial 2)<sup>1</sup>

	Experimental diet					P value <sup>2</sup>		
	NC	SP	CV	PC	RSD	Main effect		
						Ab	M	SP/CV
Number of piglets	6	6	6	6				
Growth performance								
Initial BW (28 days)	9.1	9.1	8.9	9.3	0.7	0.63	0.51	0.69
Final BW (42 days)	14.0	13.8	13.7	13.6	0.8	0.39	0.94	0.98
ADFI (g/day)	355	355	354	324	54	0.34	0.51	0.97
ADG (g/day)	325	310	315	289	53	0.26	0.81	0.88
G : F (g/g)	0.91	0.87	0.87	0.88	0.05	0.41	0.31	0.97
Digestibility coefficients (%)								
DM	91.3	93.0	92.2	91.8	1.2	0.48	0.06	0.26
Organic matter	92.4	93.8	93.1	92.8	1.0	0.57	0.06	0.27
Nitrogen	89.4	90.7	89.6	89.5	1.7	0.89	0.32	0.26
Gross energy	90.9	92.8	92.0	91.3	1.3	0.61	0.03	0.30
Crude fibre	64.7	70.0	66.1	65.5	5.9	0.80	0.25	0.28
NDF	77.3	81.0	77.8	75.9	3.6	0.52	0.07	0.14
ADF	64.9	72.4	66.7	66.7	5.5	0.58	0.12	0.10
Nitrogen retained (%)	79.0	78.4	76.1	76.5	4.4	0.34	0.79	0.38
Metabolised energy (%)	98.1	98.2	98.0	98.1	0.4	0.76	0.90	0.37

<sup>1</sup>Data are presented as least-squares means of six individually caged pigs. NC = pigs in the negative control group were fed a basal diet; SP = pigs were fed basal diet + 1% spray-dried *Spirulina*; CV = pigs were fed basal diet + 1% spray-dried *Chlorella*; PC = pigs in the positive control group were fed a basal diet supplemented with 0.2% colistin.

<sup>2</sup>ANOVA performed on BW, ADFI, ADG, G : F ratio and digestibility coefficients using MIXED model (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) including the effects of dietary treatment and block, considering the effects of antibiotic supplementation compared with NC (Ab), microalgae supplementation compared with NC and PC (M) and pairwise comparison between SP and CV (SP/CV) by application of orthogonal contrasts.

**Table 5** Effect of dietary supplementation with *Spirulina* and *Chlorella* on intestinal morphology and inflammatory status in weaned piglets at 42 days of age (trial 2)<sup>1</sup>

	Experimental diet					P value <sup>2</sup>		
	NC	SP	CV	PC	RSD	Main effect		
						Ab	M	SP/CV
Number of piglets	6	6	6	6				
Intestinal morphometry								
Villus height (µm)								
Jejunum	481	524	523	356	102	0.05	0.02	0.98
Ileum	415	484	435	440	108	0.69	0.48	0.44
Crypt depth (µm)								
Jejunum	295	275	295	316	47	0.48	0.32	0.46
Ileum	299	257	278	283	36	0.47	0.13	0.33
V : C ratio (µm/µm)								
Jejunum	1.59	1.93	1.85	1.13	0.45	0.12	0.01	0.74
Ileum	1.42	1.89	1.63	1.58	0.47	0.56	0.19	0.36
Plasma concentration of inflammatory acute phase protein (mg/ml)								
Haptoglobin	1.99	1.25	1.57	1.64	0.68	0.38	0.17	0.43

<sup>1</sup>Data are presented as least-squares means of six individually caged pigs. NC = pigs in the negative control group were fed a basal diet; SP = pigs were fed basal diet + 1% spray-dried *Spirulina*; CV = pigs were fed basal diet + 1% spray-dried *Chlorella*; PC = pigs in the positive control group were fed a basal diet supplemented with 0.2% colistin.

<sup>2</sup>ANOVA performed on villus height, crypt depth, V : C ratio and plasma concentration of haptoglobin using MIXED model (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) including the effects of dietary treatment and block, considering the effects of antibiotic supplementation compared with NC (Ab), microalgae supplementation compared with NC and PC (M) and pairwise comparison between SP and CV (SP/CV) by application of orthogonal contrasts.



*et al.*, 2006; Montagne *et al.*, 2012). Especially, growth performance was similar or higher than those reported by Le Floch *et al.* (2006) and Montagne *et al.* (2012) in piglets weaned at 28 days of age with a similar BW and raised in the same facilities (with good sanitary conditions). In our first trial, the colistin supplementation in PC pigs did not affect growth performance or the incidence of diarrhoea. Colistin sulphate is an antibiotic commonly used against gram-negative bacilli including *Escherichia coli* (Lamb, 1968). It is known that colistin enhances growth performance in weaned piglets infected by enterotoxigenic *E. coli* (Torrallardona *et al.*, 2003). The absence of effect of colistin supplementation on growth performance and incidence of diarrhoea in piglets in trial 1 suggests that piglets did not suffer from digestive disorders caused by enterotoxigenic *E. coli* infections. Due to the good sanitary conditions during the experiment, the unforeseen thermal stress induced only mild digestive troubles without involving colibacillosis. High faecal scores observed during trial 1 may result essentially from post-weaning destabilisation of microbial populations in the digestive tract and the inability of piglets to regulate immune and inflammatory responses involved in dietary transition from a liquid to a solid feed (Lallès *et al.*, 2004), which was degraded further by the thermal stress (Le Dividich, 1981).

The occurrence of diarrhoea in trial 2 was lower than in trial 1, because of an appropriate control of ambient temperature and the daily collection of faeces and urine, which enhanced the good sanitary conditions. The incidence of diarrhoea for trial 2 was not analysed statistically because of the low number of piglets. A total of 14 piglets out of 24 (i.e. 58%) had diarrhoea during the 1st week, but only five piglets had diarrhoea for >2 days on the total period. Digestive disorders in trial 2 essentially occurred during the 1st week and did not have a negative impact on total tract digestibility during the 2nd week. Consequently, growth and feed efficiency in trial 2 were higher than in the first trial.

Plasma concentration of haptoglobin was used to assess the inflammatory status of piglets after weaning. Haptoglobin is produced in the liver and released after activation by the pro-inflammatory cytokine Interleukin 6 (Wassell, 2000). Haptoglobin is considered as a good indicator for infections or acute inflammations (Eckersall and Bell, 2010). Plasma concentration of haptoglobin did not differ between dietary treatments in our study, and the observed concentrations were similar to those reported by Pastorelli *et al.* (2012), but higher than those reported by Le Floch *et al.* (2009) in piglets raised in good sanitary conditions. However, the low plasma concentrations of haptoglobin in the study of Le Floch *et al.* (2009) may have been due to the in-feed administration of avilamycin, an antibiotic against gram-positive germs. Weaning is associated with a rapid increase in local expression of IL-6 in the intestine of piglets, but this increase is limited in time since the IL-6 expression returns to a basal level in the 2 days after weaning (Pié *et al.*, 2004). In our study, plasma concentration of haptoglobin was

determined 2 weeks after weaning in piglets without enterotoxigenic *E. coli* diarrhoea and it is not representative of the local inflammatory response in the intestine. Considering these points, the plasma haptoglobin concentration may not have been a valuable criterion to determine the inflammatory response to weaning stress in our experiment.

No effect of colistin supplementation was observed on growth performance and nutrient digestibility in trial 2. However, colistin supplementation decreased villus height in the jejunum, which may be indicative for a reduction in absorption capacity (Pluske *et al.*, 1997). This result is in contradiction with that of Barton (2000), who reported that chronic in-feed supplementation with antibiotics positively affects animal growth, due to a wide range of actions such as reducing the number of pathogens and bacterial toxins in the gut, a decreased nutrient use by bacteria and improving nutrient absorption. Other studies demonstrated that colistin supplementation in piglets infected by enterotoxigenic *E. coli* resulted in higher villus height compared with diets without antibiotics (Torrallardona *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2012). Piglets receiving colistin in our experiment had a lower jejunal villus height than those in the aforementioned studies. However, the villus heights observed by Torrallardona *et al.* (2003) and Wu *et al.* (2012) illustrate that mucosal morphometry is a highly variable criterion between studies due to factors such as rearing conditions, genetics or diet. Colistin supplementation is recognised for its damaging effect on *E. coli* strains (Lamb, 1968). The alteration of intestinal morphology due to colistin supplementation could also be associated with a deleterious effect on commensal bacteria playing a role in gut development (Sommer and Bäckhed, 2013). Yin *et al.* (2008) reported that colistin supplementation during the 2 weeks after weaning altered the *E. coli* population in the jejunum and ileum, but also that of *Lactobacilli* colonies, which are recognised for their beneficial effect on the mucosal structure of the intestine (Mao *et al.*, 2016). The observed reduction of villus height in the jejunum of non-infected piglets supplemented with colistin may be explained by an alteration of microbial populations in the intestine, with a deleterious effect on mucosal development after weaning. The increase in microbial concentrations and diversity in the lower parts of the intestine (Sommer and Bäckhed, 2013) could explain a limited effect of colistin supplementation on mucosal morphology of the ileum.

#### *Effect of dietary supplementation with Spirulina and Chlorella on growth performance and gut health*

Our experiment showed that piglets receiving diet supplemented with *Spirulina* and *Chlorella* had higher villus heights in the jejunum with no impact on crypt depth compared with control pigs. Compared with control pigs, the total tract energy digestibility was greater in pigs receiving diets supplemented with *Spirulina* or *Chlorella* and the digestibility tended to be greater for DM, organic matter and NDF. The dietary transition at weaning involves an intestinal release of free radicals responsible for oxidative stress (Zhu *et al.*, 2012)





and an increased expression of pro-inflammatory cytokines (Pié *et al.*, 2004). These cytokines are supposed to be responsible for the alteration in mucosal structure (Pluske *et al.*, 1997), with a drastic decrease in villus height and brush border enzyme activities during the first 5 days after weaning (Pluske *et al.*, 1997; Lallès *et al.*, 2004), reducing nutrient absorption and growth performance (Lallès *et al.*, 2004). These mechanisms may be responsible for the results observed in trial 2, since we observed a lower DM digestibility in the 1st week after weaning compared with the 2nd week (DM digestibility of 89% in the 1st week *v.* 92% in the 2nd week). Lallès *et al.* (2004) reported that mucosal integrity is progressively restored to reach a steady state 2 weeks after weaning. The increased nutrient digestibility from 35 to 42 days of age in our trial may be the consequence of an early restoration of mucosal integrity and function, probably due to the good health status of the piglets. The increased nutrient digestibility from 35 to 42 days in pigs receiving diets supplemented with microalgae may be explained by an earlier or a greater restoration of intestinal structure and function. This is confirmed by the increased villus height in the jejunum at 42 days of age, which reflects an enhancement of absorptive function, especially because villus height is considered to be strongly linked with activities of brush border enzymes (Pluske *et al.*, 1997). These results suggest a positive effect of *Spirulina* and *Chlorella* supplementation on mucosal restoration or development after weaning.

Antioxidant and anti-inflammatory properties from *Spirulina* and *Chlorella* compounds have been highlighted by *in vitro* and *in vivo* studies (Vijayavel *et al.*, 2007; Cherng *et al.*, 2010; Pak *et al.*, 2012). A greater villus height in the jejunum of pigs receiving diets supplemented with *Spirulina* and *Chlorella* could result from a reduction in mucosal damage caused by oxidative stress (Zhu *et al.*, 2012) or local inflammation (Pié *et al.*, 2004) after weaning, and explain the increased nutrient digestibility in trial 2. However, the beneficial effect of *Spirulina* supplementation on intestinal morphology and function seems to be observed only in healthy piglets without diarrhoea. Indeed, *Spirulina* supplementation in piglets from trial 1 showed no effect on diarrhoea incidence compared with NC and PC pigs. In comparison with CV pigs, piglets receiving *Spirulina* had a lower G:F in the 1st week after weaning. However, this result must be considered as mostly due to the high G:F ratio recorded in CV pigs. C-phycoyanin is one of the bioactive compounds from *Spirulina* with antioxidant and anti-inflammatory properties, but is also known for its high sensitivity to thermal processing (Chaiklahan *et al.*, 2012). Using spray-dried *Spirulina* in our study may not have been the best technological process to benefit from the actions of *Spirulina* on oxidative stress and local inflammation.

Morphological and functional changes in the gut are related to a significant decrease in diarrhoea incidence in piglets supplemented with *Chlorella*. Janczyk *et al.* (2009) reported a higher microbial diversity in laying hens receiving 0.5% *Chlorella*, especially for *Lactobacilli* strains. Post-weaning

diarrhoea is partially caused by a destabilisation in gut microbiota (Lallès *et al.*, 2004). Huang *et al.* (2004) reported that *Lactobacilli* improved microbial balance in the digestive tract of piglets during the first 2 weeks after weaning and resulted in fewer cases of diarrhoea and an increase in growth. *Lactobacilli* strains also play a role in improving the mucosal barrier function and reducing mucosal injury caused by pathogenic microorganisms (Mao *et al.*, 2016). Therefore, a reduced incidence of diarrhoea, enhancement of intestinal morphology and a trend to increased nutrient digestibility in *Chlorella* supplemented pigs may result from a decrease in oxidative stress and local inflammation, but also from a positive effect on microbial balance in the gut.

This study provides information on the effects of *Spirulina* and *Chlorella* supplementation on gut structure, and function in piglets after weaning. *Spirulina* and *Chlorella* supplementation improved mucosal architecture from the intestine and as a consequence, nutrient digestibility. *Chlorella* supplementation also seems to impact the regulation of digestive disorders after weaning. However, the beneficial effects of microalgae supplementation remain slight and further investigation is necessary to determine their potential in the management of digestive disorders in pigs after weaning and to understand the associated mechanisms. Moreover, as our study was performed with piglets that experienced non enterotoxigenic *E. coli* diarrhoea, further studies in pigs with a lower health status would be necessary to determine the potential of *Spirulina* and *Chlorella* as an alternative to antibiotic use to prevent diarrhoea.

#### Acknowledgements

The authors thank M. Alix, G. Guillemois, Y. Jaguelin-Peyraud, J. Liger, A. Marchais, V. Piedvache, J. F. Rouaud and P. Touanel for skilful technical assistance in animal care and laboratory analyses. This study was financially supported by Cooperl Arc Atlantique (Lamballe, France).

#### References

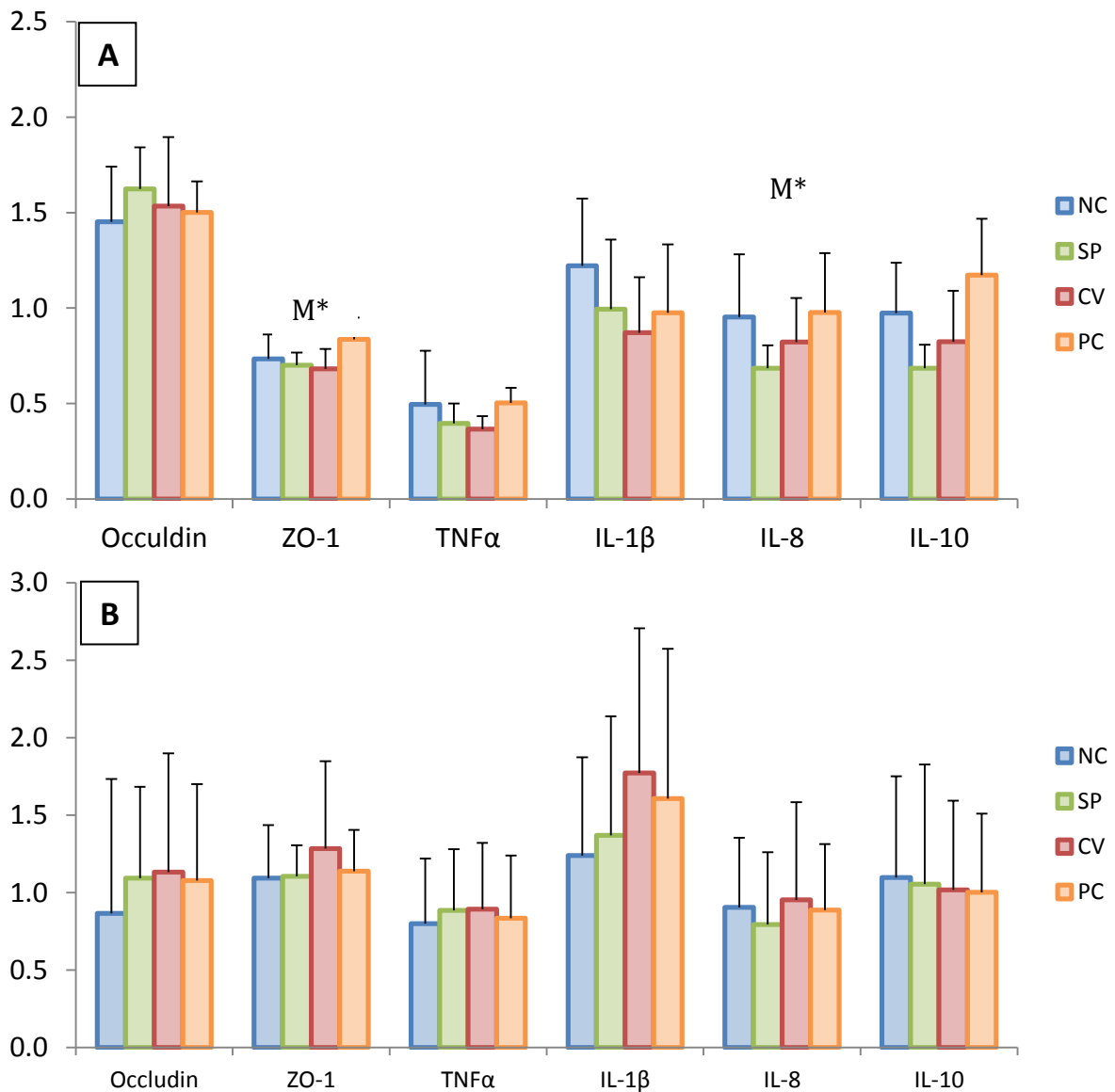
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) 1990. Official methods of analysis, 15th edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
- Barton MD 2000. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition Research Reviews* 13, 279–299.
- Bikker P, Dirkwzager A, Fledderus J, Trevisi P, Le Huërou-Luron I, Lallès JP and Awati A 2006. The effect of dietary protein and fermentable carbohydrates levels on growth performance and intestinal characteristics in newly weaned piglets. *Journal of Animal Science* 84, 3337–3345.
- Chaiklahan R, Chirasuwan N and Bunnag B 2012. Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina sp.*: influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochemistry* 47, 659–664.
- Cherng J, Liu C, Shen C, Lin H and Shih M 2010. Beneficial effects of *Chlorella*-11 peptide on blocking LPS-induced macrophage activation and alleviating thermal injury-induced inflammation in rats. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 23, 811–820.
- Eckersall PD and Bell R 2010. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *The Veterinary Journal* 185, 23–27.
- Hoseini SM, Khosravi-Darani K and Mozafari MR 2013. Nutritional and medical applications of *Spirulina* microalgae. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 13, 1231–1237.





- Huang C, Qiao S, Li D, Piao X and Ren J 2004. Effects of *Lactobacilli* on the performance, diarrhea incidence, VFA concentration and gastrointestinal microbial flora of weaning pigs. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences* 17, 401–409.
- Janczyk P, Halle B and Souffrant WB 2009. Microbial community composition of the crop and ceca contents of laying hens fed diets supplemented with *Chlorella vulgaris*. *Poultry Science* 88, 2324–2332.
- Kitada K, Machmudah S, Sasaki M, Goto M, Nakashima Y, Kumamoto S and Hasegawa T 2009. Antioxidant and antibacterial activity of nutraceutical compounds from *Chlorella vulgaris* extracted in hydrothermal condition. *Separation Science and Technology* 44, 1228–1239.
- Lallès J-P, Boudry G, Favier C, Le Floc'h N, Luron I, Montagne L, Oswald IP, Pié S, Piel C and Sève B 2004. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Animal Research* 53, 301–316.
- Lamb R 1968. Colistin sulphate in the treatment of specific bacterial intestinal infections. *Scottish Medical Journal* 13, 9–12.
- Le Dividich J 1981. Effects of environmental temperature on the growth rates of early-weaned piglets. *Livestock Production Science* 8, 75–86.
- Le Floc'h N, Jondreville C, Matte JJ and Sève B 2006. Importance of sanitary environment for growth performance and plasma nutrient homeostasis during the post-weaning period in piglets. *Archives of Animal Nutrition* 60, 23–34.
- Le Floc'h N, Le Bellego L, Matte JJ, Melchior D and Sève B 2009. The effect of sanitary status degradation and dietary tryptophan content on growth rate and tryptophan metabolism in weaning pigs. *Journal of Animal Science* 87, 1686–1694.
- Lipstein B and Hurwitz S 1980. The nutritional value of algae for poultry. Dried *Chlorella* in broiler diets. *British Poultry Science* 21, 9–21.
- Mao X, Gu C, Hu H, Tang J, Chen D, Yu B, He J, Yu J, Luo J and Tian G 2016. Dietary *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation improves the mucosal barrier function in the intestine of weaned piglets challenged by porcine rotavirus. *PLoS One* 11, e0146312.
- Montagne L, Cavaney FS, Hampson DJ, Lallès JP and Pluske JR 2004. Effect of diet composition on postweaning colibacillosis in piglets. *Journal of Animal Science* 82, 2364–2374.
- Montagne L, Le Floc'h N, Arturo-Schaan M, Foret R, Urdaci MC and Le Gall M 2012. Comparative effects of level of dietary fiber and sanitary conditions on the growth and health of weaning pigs. *Journal of Animal Science* 90, 2556–2569.
- Pak W, Takayama F, Mine M, Nakamoto K, Kodo Y, Mankura M, Egashira T, Kawasaki H and Mori A 2012. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Spirulina* on rat model of non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 51, 227–234.
- Pastorelli H, Floc'h L, Merlot E, Meunier-Salaün M, Van Milgen J and Montagne L 2012. Feed restriction applied after weaning has different effects on pig performance and health depending on the sanitary conditions. *Journal of Animal Science* 90, 4866–4875.
- Peiretti PG and Meineri G 2008. Effects of diets with increasing levels of *Spirulina platensis* on the performance and apparent digestibility in growing rabbits. *Livestock Science* 118, 173–177.
- Pié S, Lallès J, Blazy F, Laffitte J, Sève B and Oswald I 2004. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *Journal of Nutrition* 134, 641–647.
- Pluske JR, Hampson DJ and Williams IH 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science* 51, 215–236.
- Sauvant D, Perez J-M and Tran G 2004. Tables of composition and nutritional value of feed materials: pigs, poultry, cattle, sheep, goats, rabbits, horses and fish. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.
- Sommer F and Bäckhed F 2013. The gut microbiota – masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology* 11, 227–238.
- Tokuşoglu Ö and Ünal MK 2003. Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *Journal of Food Science* 68, 1144–1148.
- Torrallardona D, Conde MR, Badiola I, Polo J and Brufau J 2003. Effect of fishmeal replacement with spray-dried animal plasma and colistin on intestinal structure, intestinal microbiology, and performance of weaning pigs challenged with *Escherichia coli* K991. *Journal of Animal Science* 81, 1220–1226.
- Van Soest PJ, Robertson J and Lewis B 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583–3597.
- Vijayavel K, Anbuselvam C and Balasubramanian M 2007. Antioxidant effect of the marine algae *Chlorella vulgaris* against naphthalene-induced oxidative stress in the albino rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 303, 39–44.
- Wassell J 2000. Haptoglobin: function and polymorphism. *Clinical Laboratory* 46, 547–552.
- Whelan K, Judd P and Taylor M 2004. Assessment of fecal output in patients receiving enteral tube feeding: validation of a novel chart. *European Journal of Clinical Nutrition* 58, 1030–1037.
- Wu S, Zhang F, Huang Z, Liu H, Xie C, Zhang J, Thacker PA and Qiao S 2012. Effects of the antimicrobial peptide cecropin AD on performance and intestinal health in weaned piglets challenged with *Escherichia coli*. *Peptides* 35, 225–230.
- Yap TN, Wu J. F., Pond W. G. and Krook L 1982. Feasibility of feeding *Spirulina maxima*, *Arthrospira platensis* or *Chlorella sp.* to pigs weaned to a dry diet at 4 to 8 days of age. *Nutrition Reports International* 25, 10.
- Yin F, Yin Y, Kong X, Liu Y, He Q, Li T, Huang R, Hou Y, Shu X and Tan L 2008. Dietary supplementation with *Acanthopanax senticosus* extract modulates gut microflora in weaned piglets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 21, 1330–1338.
- Zhu L, Zhao K, Chen X and Xu J 2012. Impact of weaning and an antioxidant blend on intestinal barrier function and antioxidant status in pigs. *Journal of Animal Science* 90, 2581–2589.





**Figure 2 :** Expression relative en jonctions serrées Occludin and ZO-1 et en cytokines TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 (pro-inflammatoires) et IL-10 (anti-inflammatoires) dans la muqueuse jéjunale (A) et dans la plaque de Peyer iléale (B) à 42 jours d'âge<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup> Les valeurs sont présentées comme les moyennes et les écarts types pour 6 porcelets/traitement élevés en cage individuelle. NC = porcelets témoin négatif recevant un aliment standard sans supplémentation ; SP = porcelets recevant un aliment standard + 1% Spiruline spray-dried ; CV = porcelets recevant un aliment standard + 1% Chlorelle spray-dried; PC= porcelets recevant un aliment standard + 0.2% colistine.

<sup>2</sup> Les données ont été analysées par ANOVA à l'aide d'un modèle MIXED (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), incluant les effets du régime alimentaire et du bloc. Des contrastes orthogonaux ont été appliqués afin de définir les effets de la supplémentation en antibiotiques en comparaison au témoin négatif (Ab), de la supplémentation en microalgues en comparaison aux groupes témoin NC et PC (M) et la comparaison de la supplémentation en Spiruline et en Chlorelle deux à deux (SP vs. CV).

<sup>3</sup> Les expressions au niveau du jéjunum ont été normalisées avec les gènes de référence Actin (F : CACGCCATCCTGCGTCTGGA / R : AGCACCGTGTGGCGTAGAG) et B2M (F : AAACGGAAAGCCAAATTACC / R : ATCCACAGCGTTAGGAGTGA). Les expressions au niveau de la plaque de Peyer iléale ont été normalisées avec les gènes de référence HPRT (F : TACCTAATCATTATGCCGAGGATTT / R : AGCCGTTTCAGTCCTGTCCAT) et RPL4 (F : AGGAGGCTGTTCTGCTTCTG / R : TCCAGGGATGTTTCTGAAGG).

B. Effets de la supplémentation en Spiruline et en Chlorelle sur l'expression des jonctions serrées et des cytokines pro-inflammatoires dans la muqueuse jéjunale et dans la plaque de Peyer iléale

**Résumé :** Dans le cadre de la réalisation de cette étude, l'un des objectifs était de définir l'effet de la supplémentation en microalgues sur l'intégrité de la muqueuse intestinale et sur le statut inflammatoire local du porcelet sevré. Les résultats précédemment décrits (Publication 1 – Chapitre 1) ont montré que les animaux supplémentés en Spiruline et en Chlorelle présentaient des villosités plus hautes que les animaux des groupes témoin négatif (NC) et positif (PC), ainsi qu'une digestibilité fécale augmentée. Une hypothèse associée à cette amélioration de la structure et de la fonction intestinale pourrait provenir des propriétés antioxydantes et antiinflammatoires provenant des constituants des microalgues (Cherng *et al.*, 2010 ; Pak *et al.*, 2012). Nous avons analysé, sur les animaux précédemment utilisés pour mesurer la morphologie intestinale à 42 jours d'âge, l'expression des jonctions serrées ZO-1, Occludin et des cytokines IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-8 et IL-10 dans la muqueuse jéjunale et dans les plaques de Peyer iléales (Figure 2). Les résultats montrent que la supplémentation en Spiruline et en Chlorelle réduit le niveau d'expression en IL-8 au niveau jéjunal ( $P < 0,05$ ), ce qui suggère que la supplémentation en microalgues aurait favorisé la structure et la fonction de l'intestin en post-sevrage au travers d'un mécanisme antiinflammatoire. Néanmoins, la faible incidence des troubles digestifs chez les animaux étudiés ne permet pas de conclure sur le bénéfice de ces observations pour réduire les troubles digestifs en post-sevrage.

Tableau 6 : Effets de la supplémentation en Spiruline et en Chlorelle sur la concentration totale en AGV, sur les proportions molaires des AGV et sur la concentration en NH<sub>3</sub> dans les contenus du caecum et du colon des porcelets à 42 jours d'âge

	Traitements expérimentaux <sup>1</sup>				ETR <sup>2</sup>	P-value <sup>3</sup>	Effets principaux <sup>3</sup>		
	NC	SP	CV	PC			Ab	M	SP/CV
<b>Caecum</b>									
AGV totaux (mmol/g digesta)	125	133	114	111	28	0.58	0.42	0.65	0.29
Acide acétique	56.4	58.4	58.0	62.4	4.7	0.21	0.04	0.57	0.89
Acide propionique	31.4 <sup>a</sup>	27.4 <sup>ab</sup>	28.3 <sup>ab</sup>	25.8 <sup>b</sup>	2.9	0.03	<0.01	0.54	0.62
Acide butyrique	9.2	10.3	9.7	8.9	2.4	0.81	0.86	0.37	0.71
Acide valérique	1.6	1.9	1.7	1.3	0.6	0.40	0.35	0.16	0.75
Acides gras ramifiés <sup>4</sup>	1.4	2.0	2.2	1.6	0.6	0.16	0.58	0.04	0.59
NH <sub>3</sub> (mg/L digesta)	149	407	292	249	186	0.20	0.37	0.07	0.33
<b>Colon</b>									
AGV totaux (mmol/g digesta)	111	116	106	100	17	0.42	0.27	0.45	0.31
Acide acétique	58.1	58.1	60.2	62.3	3.5	0.17	0.06	0.47	0.33
Acide propionique	24.5	23.8	23.1	22.5	1.8	0.28	0.07	0.94	0.49
Acide butyrique	10.4	10.9	9.6	9.2	1.7	0.35	0.23	0.58	0.22
Acide valérique	2.5	2.6	2.4	2.0	0.5	0.25	0.10	0.31	0.52
Acides gras ramifiés <sup>4</sup>	4.3	4.5	4.6	3.9	1.0	0.65	0.57	0.28	0.83
NH <sub>3</sub> (mg/L digesta)	583	666	508	559	129	0.24	0.75	0.77	0.05

<sup>1</sup> Les valeurs sont présentées comme les moyennes des moindres carrés pour 6 porcelets/traitement élevés en cage individuelle. NC = porcelets témoin négatif recevant un aliment standard sans supplémentation ; SP = porcelets recevant un aliment standard + 1% Spiruline spray-dry ; CV = porcelets recevant un aliment standard + 1% Chlorelle spray-dry; PC= porcelets recevant un aliment standard + 0.2% colistine.

<sup>2</sup> ETR = Ecart Type Résiduel

<sup>3</sup> Les données ont été analysées par ANOVA à l'aide d'un modèle MIXED (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), incluant les effets du régime alimentaire et du bloc. Des contrastes orthogonaux ont été appliqués afin de définir les effets de la supplémentation en antibiotiques en comparaison au témoin négatif (Ab), de la supplémentation en microalgues en comparaison aux groupes témoin NC et PC (M) et la comparaison de la supplémentation en Spiruline et en Chlorelle deux à deux (SP vs. CV).

<sup>4</sup> Acides gras ramifiés = Isovalérique + Isobutyrique

C. Effets de la supplémentation en Spiruline et en Chlorelle sur les fermentations microbiennes dans les contenus digestifs (caecum et colon) à 42 jours d'âge

**Résumé :** Dans le cadre de la réalisation de cette étude, nous avons souhaité évaluer l'impact de la supplémentation en microalgues sur les fermentations microbiennes dans les parties distales du tractus digestif. Les contenus du caecum et du colon ont été pesés, homogénéisés et un échantillon a été prélevé et conservé dans une solution préservative pour le dosage ultérieur des AGV (solution d'acide orthophosphorique) et du  $\text{NH}_3$  (solution de NaCl à 20%). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 6. Les animaux supplémentés en Spiruline et en Chlorelle présentaient des proportions d'acides gras ramifiés en plus grande proportion que les animaux des groupes témoin négatif (NC) et positif (PC) ( $P < 0.05$ ). Les acides gras ramifiés sont les produits de la fermentation protéolytique (Williams et al., 2001 ; Htoo et al., 2007). Les composés indigestibles des régimes supplémentés en microalgues pourraient échapper à la digestion ou à l'absorption par l'animal et favoriser le développement de bactéries protéolytiques dans de caecum et le gros intestin (Williams *et al.*, 2001).



## **Chapitre 2**

Effets d'une supplémentation en Spiruline et en Chlorelle et du traitement technologique des microalgues sur la croissance et la santé digestive du porcelet sevré élevé en conditions d'hygiène dégradée



- A. **Publication 2** : Dietary supplementation with *Spirulina* and *Chlorella* does not promote growth and intestinal health in piglets weaned under poor sanitary conditions





**Dietary supplementation with *Spirulina* and *Chlorella* does not promote growth and intestinal health in piglets weaned under poor sanitary conditions**

**H. Furbeyre\*†, J. van Milgen\*, T. Mener†, M. Gloaguen†, E. Labussière\***

\* PEGASE, Agrocampus Ouest, INRA, 35590, Saint Gilles, France

† Cooperl Arc Atlantique, 1, rue de la Gare, 22640, Plestan, France

<sup>1</sup> This work was financially supported by Cooperl Arc Atlantique (Lamballe, France). The authors thank M. Alix, M. Debarre, G. Guillemois, Y. Jaguelin-Peyraud, J. Liger, A. Marchais, H. Renoult, J.F. Rouaud and P. Touanel for skilful technical assistance in animal care and laboratory analyses.

<sup>2</sup> Corresponding author: [etienne.labussiere@inra.fr](mailto:etienne.labussiere@inra.fr)

## **Abstract**

Weaning is associated with important changes in gut structure and function in piglets resulting from the transition from mostly liquid to exclusively solid food. Pigs may have post-weaning diarrhoea, resulting in a decreased growth and high antibiotic use in farms to limit these negative effects. *Spirulina* and *Chlorella* are two freshwater microalgae, which have been recognized for their beneficial effects on health, such as antioxidant, immunomodulatory and prebiotic properties. The objective of this study was to determine the effects of dietary supplementation with *Spirulina* and *Chlorella* on growth performance and health of weaned piglets. Before being included in the diet, microalgae were either spray-dried or bead-milled then freeze-dried to evaluate the effect of microalgal processing on their ability to attenuate digestive health problems after weaning. The experiment was conducted using 75 pigs weaned at 28 days of age (initial BW =  $9.5 \pm 0.9$  kg) and housed in individual cages for a



two-week feeding trial. Animals were allocated according to BW, gender, and litter of origin, to one of five diets: a standard negative control diet without supplementation (NC), the standard diet supplemented with either 1% spray-dried *Spirulina* (S-SD) or with bead-milled and freeze-dried *Spirulina* (S-B), the standard diet supplemented with either 1% spray-dried *Chlorella* (C-SD) or with bead-milled and freeze-dried *Chlorella* (C-B). Piglets were reared under poor sanitary conditions to promote chronic inflammation and potentially provoke digestive disorders. Dietary supplementation with both *Spirulina* and *Chlorella* decreased ADG ( $P<0.05$ ) and G:F ratio ( $P<0.10$ ) of pigs after weaning. Diarrhoea incidence did not differ between NC and supplemented groups ( $P>0.10$ ). Intestinal morphology did not differ between NC and *Spirulina* supplemented pigs but villus height tended to be lower in *Chlorella* supplemented pigs than in other pigs ( $P<0.10$ ). Villus height and crypt depth at the jejunum increased when microalgae were bead-milled and freeze-dried ( $P<0.05$ ). Processing of microalgae may result in a higher bioavailability of intracellular compounds with a beneficial effect on gut structure.

**Key words:** microalgae, bead-milling, spray drying, nutrition, pig, weaning

## Introduction

Weaning is a critical event in pig farms because of the stress it creates for the piglets due to social separation from the sow, mixing of litters, and the dietary transition from milk to solid feed. Weaning is often associated with occurrence of diarrhoea and a transient decrease in growth (Lallès *et al.*, 2004), which has led to a high utilization of antibiotics. The reduction of antibiotic use is of major concern since it is responsible of bacterial resistance that generates difficulties to manage bacterial infections (Levy, 1997). The two microalgae *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* have been widely studied for their properties with beneficial effects on human health (Yaakob *et al.*, 2014). We previously reported that dietary



supplementation with 1% *Spirulina* and *Chlorella* had beneficial effects on intestinal morphology and function, and that supplementation with 1% *Chlorella* reduced diarrhoea incidence in weaned pigs (Furbeyre *et al.*, 2017). However, the beneficial effects from microalgae were demonstrated in piglets having high growth performance and essentially mild diarrhoea. The quality and bioavailability of intracellular molecules from microalgae with nutritional and health benefits could be affected by technological treatment of the microalgae (Sarada *et al.*, 1999 ; Janczyk *et al.*, 2007a). The purpose of this study is first to determine the effects of a dietary supplementation with 1% *Spirulina* and *Chlorella* on growth performance and digestive health in weaned piglets raised under poor sanitary conditions, which are recognized to negatively affect growth performance and to stimulate the occurrence of severe diarrhoea. Secondly, our study aims at evaluating the effects of a technological treatment of the microalgae on the response of the piglets.

## **Materials and methods**

The experiment was conducted at the experimental facilities of INRA and was approved by the French Ministry of Research and Higher Education (authorization n° 2015031813159669) under the ethical guidelines for use of animals for scientific purposes.

### ***Microalgae and processing***

*Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* were provided and processed by Algosource Technologies, Saint-Nazaire, France. Two different processes were applied to fresh biomass. Fresh *Spirulina* and *Chlorella* were either spray-dried or bead-milled at 20°C using Zirmil® beads (Ø 0.6 mm) and then freeze-dried.

Table 1. Composition of experimental diets

	Standard diet NC	S-SD	S-B	C-SD	C-B
<b>Ingredients (%)</b>					
Barley	45.78	45.33	45.33	45.33	45.33
Soybean meal	17.50	17.33	17.33	17.33	17.33
Soy protein concentrate	2.50	2.47	2.47	2.47	2.47
Whey powder	20.00	19.80	19.80	19.80	19.80
Skim milk powder	4.80	4.75	4.75	4.75	4.75
Vegetal fat	5.50	5.44	5.44	5.44	5.44
Wheat	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Wheat middlings	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
Calcium carbonate	1.60	1.58	1.58	1.58	1.58
Monocalcium phosphate	0.66	0.65	0.65	0.65	0.65
Vitamin and mineral premix <sup>1</sup>	0.50	0.49	0.49	0.49	0.49
L-lysine HCl	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41
DL-methionine	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26
L-threonine	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
L-tryptophan	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
L-valine	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
Acidifier	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Phytase	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Spray-dried <i>Spirulina platensis</i>	-	1.00	-	-	-
Bead-milled <i>Spirulina platensis</i>	-	-	1.00	-	-
Spray-dried <i>Chlorella vulgaris</i>	-	-	-	1.00	-
Bead-milled <i>Chlorella vulgaris</i>	-	-	-	-	1.00
<b>Chemical composition (% DM)</b>					
<b>Analysed</b>					
CP (N × 6.25)	21.71	22.15	22.15	22.25	22.29
Fat	7.73	7.77	7.84	7.78	7.65
Ash	7.40	7.36	7.53	7.47	7.32
Crude fibre	2.61	2.51	2.46	2.46	2.52
NDF	8.68	8.85	8.71	8.59	8.84
ADF	2.90	2.97	2.97	2.92	2.84
ADL	0.49	0.47	0.39	0.55	0.57
GE (MJ / kg DM)	19.1	19.1	18.9	19.0	18.9
<b>Calculated<sup>2</sup></b>					
DE (MJ/kg DM)	16.4	16.4	16.3	16.4	16.3
ME (MJ/kg DM)	15.7	15.8	15.6	15.7	15.6
NE (MJ/kg DM)	12.0	12.1	11.9	12.0	11.9
<b>Amino acid composition<sup>3</sup> (%)</b>					
Lys	1.21	1.21	1.21	1.21	1.21
Thr	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76
Met	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51
Cys	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Trp	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
Ile	0.68	0.68	0.68	0.68	0.68
Val	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82
Leu	1.15	1.15	1.15	1.15	1.15

<sup>1</sup> Supplied the following per kilogram of diet: vitamin A, 10 000 IU; vitamin D3, 2000 IU; vitamin E, 20 mg; vitamin C, 40 mg; vitamin B1, 2 mg; vitamin B2, 5 mg; calcium panthoneate, 10.85 mg; niacin, 20 mg; vitamin B12, 0.03; vitamin B6, 5 mg; vitamin K3, 2 mg; folic acid, 1 mg; biotin, 0.2 mg; choline chloride, 600 mg; Fe, 103.75 mg; Cu, 20 mg; Zn, 99.3 mg; Mn, 40 mg; I, 0.6 mg; Co, 1 mg; Se, 0.3 mg.

<sup>2</sup> Calculations for DE, ME and NE have been performed using EvaPig® software.

<sup>3</sup> Standardized ileal digestible values

### ***Animals and diets***

The experiment was conducted using 75 piglets ((Large White x Landrace) x Piétrain crossbreeds) weaned at 28 days of age (initial BW of  $9.5 \pm 0.9$  kg) from the experimental herd of INRA, Saint Gilles, France. Piglets were allocated to one of five dietary treatments (Table 1) for two weeks including a standard weaner negative control diet without antibiotics (NC), and four diets in which the NC diet (99%) was supplemented with 1% *Spirulina* or *Chlorella* that were either spray-dried or bead-milled and freeze-dried (i.e., spray-dried *Spirulina* (S-SD), bead-milled and freeze-dried *Spirulina* (S-B), spray-dried *Chlorella* (C-SD), and bead-milled and freeze-dried *Chlorella* (C-B)). Gender and litter origin were distributed equally among the treatments. Piglets were housed in individual cages in five rooms and reared under poor sanitary conditions, adapted from the experimental model of Le Floch *et al.* (2009). Briefly, rooms were not cleaned or disinfected between outgoing pigs and incoming newly weaned pigs and no cleaning was performed during the experiment. Pigs did not receive any antibiotics during the experiment. A drop in ambient temperature from 28°C to 22°C for four hours was realized at 32 days of age to promote intestinal disturbances, as reported by Le Dividich (1981). At 42 and 43 days of age, 40 piglets (eight piglets per treatment) selected on BW, sex and litter of origin were stunned electrically, and killed by exsanguination for blood and tissue sampling.

### ***Measurements and sampling***

Pigs were weighed individually without fasting at 28 and 35 d of age, and at the end of the experiment. Offered feed from 28 d of age to the end of the experiment was weighed daily for each pig and a sample of the daily distribution of the experimental diets was stored at 4°C. A first set of aliquots for each daily sample was used to determine the DM of daily offered feed after drying at 103°C during 24 hours. A second set of aliquots was pooled for the





experimental diets for the total experiment. Pools were then ground in a hammer mill equipped with a 1 mm grid for further laboratory analyses. Feed refusals were collected daily for each pig and dried at 103°C during 24 hours before weighing. A diarrhoea score was attributed daily to each pig by visual assessment of faeces consistency, adapted from the description of Song *et al.* (2012): 0=hard and formed corresponding to normal faeces, 1=soft and formed corresponding to moist faeces, 2=loose and unformed corresponding to mild diarrhoea, 3=liquid or severe diarrhoea and 4=uncoloured watery diarrhoea. Because the barns were not cleaned at the beginning and during the experiment, clean white plates were fixed under the floor of the cages for two hours each day at 8:00 to visually assess faecal consistency. Diarrhoea incidence was calculated as reported by Huang *et al.* (2004): Diarrhoea incidence (%) = (number of days with recorded diarrhoea)/(number of pigs by treatment × total experimental days) × 100, where “number of days with recorded diarrhoea” was the sum of the number of pigs with diarrhoea observed each day for the total experimental period.

Blood samples were collected in heparinized tubes when pigs were exsanguinated and stored on ice. Blood samples were then centrifuged during 15 minutes at 3000g at 4°C for plasma collection. Plasma samples were stored at -20°C for further analysis of haptoglobin concentration. Three-cm segments of the jejunum (middle of the small intestine) and ileum (10 cm from the ileo-caecal junction) were collected, flushed in a 0.9% NaCl solution, fixed with a 4% formaldehyde-phosphate buffer and stored at 4°C for histological measurements. One-cm segments of the jejunum and ileum were cut in small pieces and snap-frozen in liquid nitrogen, then stored at -80°C for further analysis of cytokine and tight junction expression. Five-cm segments of the jejunum were collected and kept in Ringer's bicarbonate solution (in mmol/L: 145 Na<sup>+</sup>, 128 Cl<sup>-</sup>, 0.32 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, 2 Ca<sup>2+</sup>, 1 Mg<sup>2+</sup>, 25 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 1 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 6.3 K<sup>+</sup>; pH 7.4) for immediate mounting in Ussing Chambers.



### *Laboratory analyses*

#### *Offered feed*

Ground pools of offered feed for the experimental diets were dried during for 24 hours at 103°C for DM determination. Pools of offered feed were analysed for ash, organic matter, gross energy (GE), nitrogen (N), crude fibre, and NDF, ADF and ADL fractions. Ash was determined after ignition at 550°C for 6 hours as described by the AOAC (1990). Organic matter content (% in DM) was calculated as 100 – ash (% in DM). The GE content was measured using an adiabatic bomb calorimeter (IKA, Staufen, Germany) as described by the International Organization for Standardisation (ISO 9831:1998; ISO methods, <http://www.iso.org>). The N content was determined using a RapidN elemental analyser (Elementar, France) according to the Dumas method (AOAC, 1990). The crude fibre content was determined after digestion with 1.25% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 1.25% NaOH solutions according to AOAC (1990). The NDF, ADF, and ADL fractions were determined according to the method of Van Soest *et al.* (1991).

#### *Acute phase protein*

Haptoglobin concentration in plasma was analysed using a colorimetric method (Phase Haptoglobin Assay T801; Tridelta Ltd, Maynooth, Ireland) with an automatic analyser (Konelab 20i; Thermo Scientific, France).

#### *Intestine morphology*

Jejunum and ileum segments were removed from the formaldehyde-phosphate buffer after 72 hours and washed in three consecutive solutions of ethanol:water (75:25, v:v). The fixed intestinal tissues were embedded in paraffin, sectioned at a 7 µm thickness, mounted on SuperFrost Plus slides (Labo-Moderne, Paris, France), and stained with hematoxylin and



eosin. Slides were scanned using NanoZoomer Digital Pathology technology (Hamamatsu, Kitsa, Sweden). Villus height and crypt depth were measured using the associated NDP view software (NDP View Version 1.2.2.5). Fifteen straight and complete villi and ten crypts were selected from each sample for mucosal morphometry for the jejunum and ileum.

#### *Intestine barrier function*

Intestinal segments of jejunum were stripped and opened on the opposite side of the mesenteric border, and then mounted immediately in a Ussing Chamber (World Precision Instrument, Stevenage, UK). The chamber opening exposed  $0.67 \text{ cm}^2$  of tissue surface to 8 mL circulating oxygenated Ringer solution maintained at  $39^\circ\text{C}$ . The buffer added to the serosal side contained  $16 \text{ mmol.L}^{-1}$  glucose and the buffer on the mucosal side contained  $16 \text{ mmol.L}^{-1}$  mannitol. Paracellular and transcellular fluxes through the jejunal mucosa were measured using Fluorescein isothiocyanate dextran, 4 kDa (FD-4, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and horseradish peroxidase (HRP Type II, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), respectively. The probes FD-4 ( $400 \text{ }\mu\text{g/ml}$ ) and HRP ( $200 \text{ }\mu\text{g/ml}$ ) were added to the mucosal side and samples were collected from the serosal side after 45 and 90 min. The concentration of FD-4 was measured by fluorimetry (fluorimeter LB940 Mithras, Berthold Technologies, Thoiry, France). O-dianisidine (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was used as substrate for enzymatic reaction to detect HRP using a spectrophotometer (Multiskan spectrum, Thermo Labsystem, Midland, Canada). Mucosal-to-serosal fluxes were calculated and expressed as  $\text{ng.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ .

#### *Extraction of RNA*

Total RNA from samples of the jejunal mucosa and ileal Peyer's patches were extracted using the TRIzol® Reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and Precellys® homogeniser

Table 2: Oligonucleotide sequences used for real time PCR

Gene identification	GenBank number	Primer sequence
Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF $\alpha$ )	NM_214022.1	F:GGTTATCGGCCCCAGAA R:TGGGCGACGGGCTTATC
Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )	NM_214055.1	F:GCCAGTCTTCATTGTTTCAGGTTT R:TTGTCACCGTAGTTAGCCATCACT
Interleukin-8 (IL8)	NM_213867.1	F:GCTCTCTGTGAGGCTGCAGTTC R:AAGGTGTGGAATGCGTATTTATGC
Interleukin-10 (IL-10)	NM_214041.1	F:CGGCGCTGTCATCAATTTCTG R:CCCCTCTCTTGGAGCTTGCTA
Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)	NM_214015.1	F:AGCGGCAACCAAATCTATGATAA R:CGACGTGTTGAACAGCATATATAAGC
Zonula Occludens-1 (ZO-1)	XM_003480423.3	F:AGGCGATGTTGTATTGAAGATAAATG R:TTTTTGCATCCGTCAATGACA
Occludin (OCLN)	NM_001163647.2	F:CACCCTCCAGATTGGCTGAT R:ATCAGGTGACCCGCTGACA
Ribosomal Protein L-4 (RPL-4)	XM_005659862.2	F:AGGAGGCTGTTCTGCTTCTG R:TCCAGGGATGTTTCTGAAGG
TATA-Box Binding Protein-1 (TBP-1)	XM_013991786.1	F:AACAGTTCAGTAGTTATGAGCCAGA R:AGATGTTCTCAAACGCTTCG

(Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, France). Extracted RNA was suspended in RNase-free water. Concentration and purity (absorbance ratios) was assessed using a spectrophotometer (Denovix Inc., Wilmington, USA) and total quantity of RNA was adjusted to 2 µg. Integrity of extracted RNA was assessed using the lab-on-chip capillary gel-electrophoresis (2100 Bioanalyzer, Agilent, Les Ulis, France) according to the description of the manufacturer. The RNA Integrity Numbers were comprised between 8 and 10.

#### *Quantification of mRNA expression by RT-PCR*

Reverse transcription of total RNA to complementary DNA was performed using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City (CA), USA). Primers for tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-8 (IL-8), interleukin-10 (IL-10), Zonula Occludens-1 (ZO-1), Occludin (OCLN) and the two housekeeping genes Ribosomal Protein L-4 (RPL-4) and TATA-Box Binding Protein-1 (TBP-1) were designed using Primer Express software (Applied Biosystems, USA), based on recorded nucleotide sequences for *Sus scrofa* (Table 2). Samples (5 ng) were disposed in duplicate in a 96-wells plate in presence of primer probes (200 nM each) and PCR buffer (Fast SYBR® Green Master Mix, Applied Biosystems, Waltham, USA). Amplification cycles were performed using StepOnePlus™ Real Time PCR system (Applied Biosystems), with the following thermal cycling conditions: 50°C during 2 minutes, 95°C during 20 seconds, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C during 3 s, and annealing at 60°C during 30 s. Melt curve specificity was validated for all samples. A normalization factor (NF) was calculated as the geometric mean of the two housekeeping genes RPL-4 and TBP-1 levels. Relative expression of each target gene was normalized to NF.



Table 3: Effects of dietary supplementation with *Spirulina* and *Chlorella* on growth performance in weaned pigs<sup>1</sup>

Item	Treatment <sup>2</sup>					SEM	P-value <sup>3</sup>	Contrasts <sup>4</sup>			
	NC	S-SD	S-B	C-SD	C-B			M	S vs. C	SD vs. B	M×T
Number of pigs	13	14	14	14	14						
BW, kg											
28d	9.6	9.5	9.6	9.4	9.4	1.0	0.98	0.98	0.74	0.87	0.65
35 d	10.5	10.1	10.4	10.5	10.1	1.2	0.79	0.67	0.78	0.94	0.24
42/43d	13.6	12.7	13.0	12.6	12.4	1.6	0.49	0.12	0.68	0.72	0.46
ADFI g/d <sup>5</sup>											
28-35 d	217	183	203	212	193	62	0.50	0.29	0.42	0.89	0.22
35-42/43 d	505	441	454	428	438	127	0.55	0.11	0.71	0.64	0.96
Total period	364	314	364	322	317	92	0.58	0.12	0.94	0.66	0.62
ADG, g/d											
28-35 d	125	86	105	151	101	107	0.28	0.51	0.15	0.67	0.12
35-42/43 d	423	358	363	291	313	137	0.09	0.02	0.14	0.48	0.79
Total period	278	224	236	223	209	101	0.26	0.04	0.93	0.63	0.49
G:F ratio, g/g											
28-35 d <sup>6</sup>	0.61 <sup>bc</sup>	0.47 <sup>a</sup>	0.54 <sup>ab</sup>	0.72 <sup>c</sup>	0.59 <sup>abc</sup>	0.29	0.04	0.43	0.02	0.69	0.09
35-42/43 d	0.83	0.82	0.77	0.66	0.71	0.21	0.15	0.15	0.05	0.94	0.33
Total period <sup>6</sup>	0.75	0.70	0.66	0.67	0.64	0.19	0.43	0.07	0.49	0.88	0.91

<sup>a,b,c</sup> Values with different superscript letters differ ( $P < 0.05$ )

<sup>1</sup> Values in tables are means and SEM.

<sup>2</sup> Treatments: NC = standard diet without antibiotics; S-SD = standard diet + 1% spray-dried *Spirulina*; S-B = standard diet + 1% bead-milled and freeze-dried *Spirulina*; C-SD = standard diet + 1% spray-dried *Chlorella*; C-B = standard diet + 1% bead-milled and freeze-dried *Chlorella*.

<sup>3</sup> ANOVA performed using MIXED model (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) including the fixed effect of dietary treatment and the random effects of sow, gender and room.

<sup>4</sup> Orthogonal contrasts were performed to consider the effects of microalgae supplementation (M), the pairwise comparison between *Spirulina* and *Chlorella* supplementation (S vs. C), microalgae treatment (SD vs. B), and the interaction between microalgae and treatment (M×P).

<sup>5</sup> ADFI adjusted to 87% DM

<sup>6</sup> Square transformation was previously performed on data for G:F ratio 28-35 d and G:F ratio for the total period for the analysis.

### *Statistical methods*

During the experiment, six pigs (one for each of the microalgae supplemented groups and two in NC group) had clinical signs of oedema disease that necessitated an antibiotic treatment and the pigs were excluded from the statistical analyses. Results for ADFI, ADG, and the G:F ratio were analysed using the MIXED procedure of SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), including dietary treatment as fixed effect and litter, gender, and room as random effects. Data for plasma concentration of haptoglobin, intestinal morphology, permeability to macromolecules in Ussing chambers, and gene expressions were analysed using the MIXED procedure of SAS (SAS Institute Inc., Cary (NC), USA), including dietary treatment as fixed effects and litter, gender, and room as random effects. For all traits, orthogonal contrasts were used to analyse the main effects of microalgae supplementation by comparison between NC and supplemented groups (i.e., NC *vs.* (S-SD + S-B + C-SD + C-B)/4), microalgal strain ( (S-SD + S-B) *vs.* (C-SD + C-B) ), microalgal processing ( (S-SD + C-SD) *vs.* (S-B + C-B) ) and the interaction between microalgal strain and processing. The Shapiro–Wilk’s normality test was performed on the residuals for each trait. To validate this assumption, data transformations were performed on G:F ratio from 28 to 35 d and for the total period, HRP flux, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-8 expressions in the jejunum. Data for diarrhoea incidence were compared between dietary treatments by  $\chi^2$  contingency test using the FREQ procedure of SAS (SAS Institute Inc., Cary (NC), USA). Probability values lower than 0.05 were considered as significant and probability lower than 0.10 were considered as a trend.

## **Results**

### *Growth performance*

Growth performance in pigs from weaning to the end of the experiment is presented in table 3. During the first week post-weaning (PW), ADFI, and ADG did not differ between pigs fed

Table 4: Effects of dietary supplementation with *Spirulina* and *Chlorella* on diarrhoea incidence in weaned pigs

Item	Treatment <sup>1</sup>					P-value <sup>2</sup>
	NC	S-SD	S-B	C-SD	C-B	
Number of pigs	13	14	14	14	14	
Diarrhoea incidence, % <sup>3</sup>						
Score 2	16.5	14.3	13.8	16.3	17.3	0.84
Score 3	10.4	6.6	9.7	12.2	7.6	0.33
Score 4	2.8	1.0	0.0	0.5	2.5	ND <sup>4</sup>
Severe diarrhoea <sup>5</sup>	13.2	7.6	9.7	12.8	10.2	0.38
Total diarrhoea <sup>6</sup>	29.7	21.9	23.5	29.1	27.5	0.31

<sup>1</sup> Treatments: NC = standard diet without antibiotics; S-SD = standard diet + 1% spray-dried *Spirulina*; S-B = standard diet + 1% bead-milled and freeze-dried *Spirulina*; C-SD = standard diet + 1% spray-dried *Chlorella*; C-B = standard diet + 1% bead-milled and freeze-dried *Chlorella*.

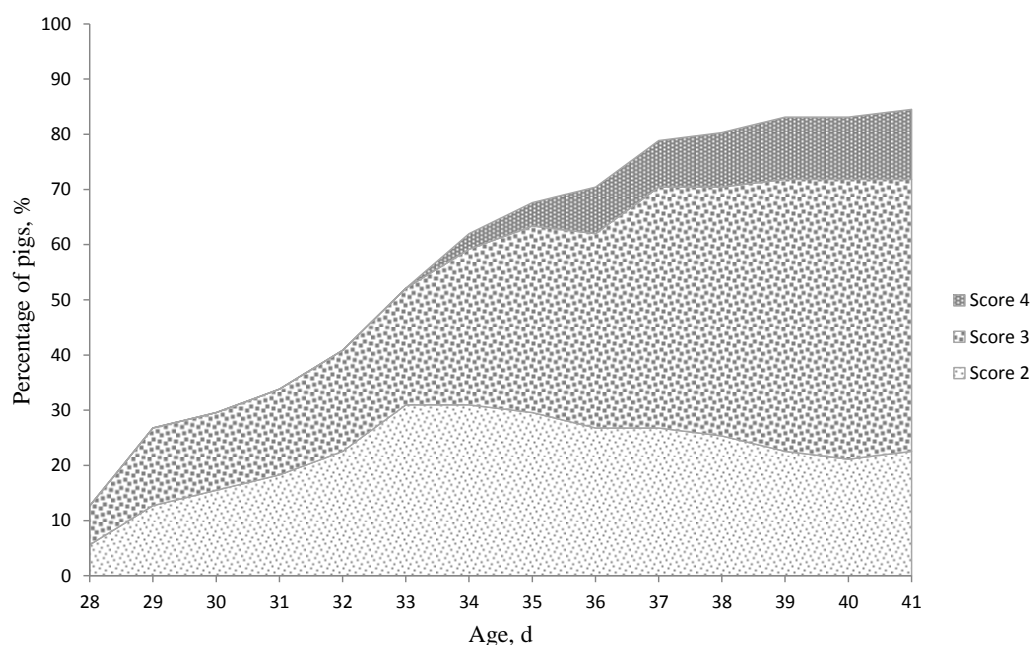
<sup>3</sup> Diarrhoea score = 0, normal faeces; 1, moist faeces; 2, mild diarrhoea; 3, liquid diarrhoea; 4, uncoloured watery diarrhoea. Incidence (%) was calculated by treatment as (number of diarrhoea score recorded)/(number of pigs by treatment × total experimental days) × 100, where the number of diarrhoea recorded was the sum of the number of pigs with diarrhoea observed each day for the experimental period. Statistical analysis was conducted by  $\chi^2$ -test on diarrhoea incidences.

<sup>4</sup> ND = not determined. The  $\chi^2$ -test was not performed on score 4 incidences because of a too low number of observations.

<sup>5</sup> Severe diarrhoea = number of pig days with diarrhoea score equal or higher than 3.

<sup>6</sup> Total diarrhoea = number of pig days with diarrhoea score equal or higher than 2.

Figure 1: Evolution of maximal diarrhoea severity recorded in piglets from weaning to 42 days of age<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Graphic shows the percentage of pigs that exhibited a maximal score of 2, 3 or 4 since weaning. Diarrhoea score was attributed as follows: 0, normal faeces; 1, moist faeces; 2, mild diarrhoea; 3, liquid diarrhoea; 4, uncoloured watery diarrhoea.

diet NC and those fed diets supplemented with microalgae ( $P>0.10$ ). During the second week PW, ADFI did not differ between treatments ( $P>0.10$ ). The C-SD and C-B pigs tended to have a lower ADG during the second week PW compared with NC ( $P=0.09$ ). Pigs receiving diets supplemented with microalgae had a lower ADG than NC pigs during the second week PW ( $P=0.02$ ) and for the total period ( $P=0.04$ ).

The S-SD pigs had a lower G:F ratio than NC pigs ( $P=0.04$ ) during the first week PW. For the same period, the G:F ratio was lower in pigs receiving diets supplemented with *Spirulina* compared with those receiving diet supplemented with *Chlorella* ( $P=0.02$ ). Conversely, the G:F ratio was higher ( $P=0.05$ ) in the *Spirulina* groups compared with the *Chlorella* groups during the second week PW. For the total period, the G:F ratio did not differ between treatments ( $P>0.10$ ) but overall it tended to be lower for microalgae supplemented pigs compared with NC ( $P=0.07$ ).

### ***Post-weaning diarrhoea***

From weaning to 42 d of age, 85% of pigs had diarrhoea (Figure 1; 62% in the first week). Among them, 73% had at least one day of severe diarrhoea and 15% had uncoloured watery diarrhoea (Figure 1). During the two weeks PW, maximal incidences for total and for severe diarrhoea were recorded for NC group (29.7% and 13.2% respectively; Table 4). Diarrhoea incidence did not differ among the microalgae supplemented groups, whatever the microalga or processing ( $P>0.10$ ).

### ***Plasma concentration of haptoglobin, intestinal morphology and barrier function***

Plasma concentration of the acute phase protein haptoglobin averaged 1.58 mg/mL and did not differ between treatments ( $P>0.10$ ; Table 5). The villus height in the jejunum tended to be lower in C-SD pigs than in NC and *Spirulina* supplemented pigs ( $P=0.06$ ). Irrespective of microalgal processing, *Chlorella* supplemented pigs had shorter villi in the jejunum than

Table 5: Effects of dietary supplementation with *Spirulina* and *Chlorella* on intestinal morphology, barrier function in jejunum, and acute phase protein in plasma in pigs at 42 days of age<sup>1</sup>

Item	Treatment <sup>2</sup>					SEM	P-value <sup>3</sup>	Contrasts			
	NC	S-SD	S-B	C-SD	C-B			M	S vs. C	SD vs. B	M×T
Number of pigs	8	8	8	8	8						
Intestine morphology											
Jejunum											
Villus height	336	323	357	279	314	62	0.06	0.38	0.02	0.06	0.98
Crypt depth	284	278	287	268	295	25	0.25	0.86	0.89	0.05	0.27
V:C ratio	1.2	1.2	1.2	1.0	1.1	0.2	0.17	0.48	0.03	0.38	0.68
Ileum											
Villus height	298	260	283	244	270	60	0.40	0.15	0.48	0.24	0.93
Crypt depth	238	237	255	231	238	27	0.52	0.88	0.33	0.17	0.62
V:C ratio	1.2	1.1	1.1	1.1	1.2	0.3	0.82	0.31	0.81	0.71	0.62
Barrier function <sup>5</sup>											
FD4 flux, 10 <sup>3</sup> ng.cm <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup>	1.49	1.39	1.55	1.34	1.46	0.72	0.98	0.85	0.78	0.64	0.93
HRP flux, ng.cm <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup>	313	258	422	305	264	303	0.44	0.46	0.23	0.94	0.24
Acute phase protein in plasma											
Haptoglobin, mg/mL	1.66	1.69	1.41	1.48	1.64	0.36	0.52	0.52	0.80	0.54	0.14

<sup>a,b,c</sup> Values with different superscript letters differ (P<0.05)

<sup>1</sup> Values in tables are means and SEM.

<sup>2</sup> Treatments: NC = standard diet without antibiotics; S-SD = standard diet + 1% spray-dried *Spirulina*; S-B = standard diet + 1% bead-milled and freeze-dried *Spirulina*; C-SD = standard diet + 1% spray-dried *Chlorella*; C-B = standard diet + 1% bead-milled and freeze-dried *Chlorella*.

<sup>3</sup> ANOVA performed using MIXED model (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) including the fixed effect of dietary treatment and the random effects of sow, gender and room.

<sup>4</sup> Orthogonal contrasts were performed to consider the effects of microalgae supplementation (M), the pairwise comparison between *Spirulina* and *Chlorella* supplementation (S vs. C), microalgae treatment (SD vs. B), and the interaction between microalgae and treatment (M×P).

<sup>5</sup> FD-4=Fluorescein isothiocyanate dextran (4 kDa); HRP = horseradish peroxidase. Logarithmic transformation was performed on data for HRP flux for the analysis.

*Spirulina* supplemented pigs ( $P=0.02$ ) without a change in crypt depth ( $P>0.10$ ), resulting in a lower V:C ratio ( $P=0.03$ ). Pigs supplemented with bead-milled microalgae tended to have higher villi ( $P=0.06$ ) and deeper crypts ( $P=0.05$ ) than pigs supplemented with spray-dried microalgae but the V:C ratio was similar ( $P>0.10$ ). At the ileum, villus height, crypt depth, and the V:C ratio did not differ between groups ( $P>0.10$ ). The paracellular and transcellular fluxes measured in Ussing chamber were unaffected by microalgae supplementation ( $P>0.10$ ; Table 5).

### ***Expression of cytokines and tight junction in intestine***

The intestinal expression of pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, anti-inflammatory cytokine IL-10, and tight junctions ZO-1 and Occludin did not differ among treatments, in jejunum and ileum ( $P>0.10$ ; Table 6). The jejunal expression of Occludin was lower in pigs supplemented with spray-dried microalgae than in pigs supplemented with bead-milled and freeze-dried microalgae ( $P=0.05$ ; Table 6).

## **Discussion**

### ***Growth and health status***

This experiment was designed to determine the potential benefits of dietary *Spirulina* and *Chlorella* supplementation on digestive health in pigs after weaning. Contrary to our previous study (Furbeyre *et al.*, 2017), this study was conducted under poor sanitary conditions of housing with an induced drop in ambient temperature from 28 to 22°C during four hours when the pigs were 32 d old. Poor sanitary conditions have been recognized to alter growth performance and favour diarrhoea occurrence in weaned pigs, partly resulting from a chronic inflammation (Le Floc'h *et al.*, 2006 ; Montagne *et al.*, 2012). Ambient temperature is also a

Table 6: Effects of dietary supplementation with *Spirulina* and *Chlorella* on cytokine expression in pigs at 14 days post-weaning<sup>1</sup>

Item	Treatment <sup>2</sup>					SEM	P-value <sup>3</sup>	Contrasts <sup>4</sup>			
	NC	S-SD	S-B	C-SD	C-B			M	S vs. C	SD vs. B	M×P
Number of pigs	8	8	8	8	8						
Jejunum											
TNF- $\alpha$ <sup>5</sup>	1.00	0.86	0.90	1.26	0.86	0.45	0.53	0.54	0.62	0.21	0.31
IL-1 $\beta$ <sup>5</sup>	1.00	1.04	1.25	1.55	0.99	0.87	0.91	0.44	0.82	0.84	0.61
IL-8 <sup>5</sup>	1.00	1.19	1.36	1.52	1.19	0.71	0.60	0.14	0.66	0.59	0.97
IL-10	1.00	0.90	0.72	0.92	0.74	0.33	0.39	0.16	0.89	0.15	0.95
ZO-1	1.00	1.00	1.02	0.99	1.05	0.12	0.82	0.70	0.71	0.33	0.54
Occludin	1.00	0.82	0.93	0.74	0.91	0.26	0.21	0.13	0.77	0.07	0.63
Ileum											
TNF- $\alpha$	1.00	1.07	1.06	1.00	1.05	0.20	0.89	0.56	0.51	0.77	0.67
IL-1 $\beta$	1.00	1.30	1.24	1.32	0.98	0.77	0.83	0.41	0.72	0.45	0.79
IL-8	1.00	1.11	0.94	0.99	0.94	0.31	0.75	0.95	0.65	0.26	0.56
IL-10	1.00	0.89	0.97	0.90	0.91	0.19	0.54	0.31	0.98	0.31	0.38
ZO-1	1.00	1.00	1.07	0.97	0.96	0.12	0.43	0.96	0.11	0.52	0.38
Occludin	1.00	0.91	0.97	0.92	0.92	0.30	0.96	0.57	0.87	0.79	0.71

<sup>1</sup>Data are expressed relative to the values of NC group. Values in tables are means and SEM.

<sup>2</sup>Treatments: NC = standard diet without antibiotics; S-SD = standard diet + 1% spray-dried *Spirulina*; S-B = standard diet + 1% bead-milled and freeze-dried *Spirulina*; C-SD = standard diet + 1% spray-dried *Chlorella*; C-B = standard diet + 1% bead-milled and freeze-dried *Chlorella*.

<sup>3</sup>ANOVA performed using MIXED model (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) including the fixed effect of dietary treatment and the random effects of sow, gender and room.

<sup>4</sup>Orthogonal contrasts were performed to consider the effects of microalgae supplementation (M), the pairwise comparison between *Spirulina* and *Chlorella* supplementation (S vs. C), microalgae treatment (SD vs. B), and the interaction between microalgae and treatment (M×P).

<sup>5</sup>Inverse transformations were performed on data for TNF $\alpha$  and IL-8 in jejunum and logarithmic transformation was performed on data for IL-1 $\beta$  in jejunum for the analysis.

major environmental factor, potentially affecting health around weaning. Combining poor sanitary conditions and a thermal stress during the post-weaning period increases the risk of digestive troubles (Le Dividich, 1981 ; Madec *et al.*, 2003). In our study, growth performance in the NC pigs during the two weeks PW was higher than in the studies of Le Floc'h *et al.* (2006) and Montagne *et al.* (2012) for pigs raised under poor sanitary conditions. Growth, feed intake, and the G:F ratio in NC pigs were also similar to those recorded in our previous experiment that was carried out under good sanitary conditions (Furbeyre *et al.*, 2017). According to Montagne *et al.* (2012), the deleterious effects of weaning stress and poor sanitary conditions on growth performance appear during the first week PW. In our study, weight gain during the first week PW in NC pigs represented only 23% of total weight gain during the experiment. Thus, as described by Montagne *et al.* (2012), the PW period can be divided in two phases: an acute response to weaning and to new environmental conditions during the first week and a recovery phase during the second week. Raising pigs under poor sanitary conditions increased the variation in performance among pigs, which was much higher here than in our previous study with pigs raised in a clean barn (Furbeyre *et al.*, 2017), with standard deviations being increased by 67, 65, and 90% for ADFI, ADG and G:F ratio respectively. Thus, poor sanitary conditions seem to affect heterogeneously pigs' response to weaning that result in highly variable growth performance.

Cumulated stressors in our experiment involved a high occurrence of diarrhoea in pigs after weaning, which was higher than that reported by Montagne *et al.* (2012) in pigs also raised under poor sanitary conditions (62% vs. 42% in the first week). However, diarrhoea occurrence and incidence were lower than in our previous study in pigs raised under favourable sanitary conditions (diarrhoea incidence of 33%; Furbeyre *et al.*, 2017) but clinical cases of diarrhoea were more severe in the present experiment. Indeed, among the pigs that had diarrhoea (85% of total number of pigs), 73% had severe diarrhoea during the first two





weeks PW (vs. 63% in our previous study) and 15% had at least one day of uncoloured watery diarrhoea (none in our previous study). Uncoloured diarrhoea is due to the hypersecretion of ions and water from the intestine and is a characteristic of enterotoxigenic *E. coli* pathogenesis (Hopwood et Hampson, 2003). Furthermore, six pigs with watery diarrhoea were excluded from the experiment because of signs of oedema disease such as congestion and ataxia, which can be due to infection with *E. coli* strains producing shigatoxins (Imberechts *et al.*, 1992). We did not determine the implication of pathogens in the observed diarrhoeas. However, clinical observations suggest that pathogenic *E. coli* strains might be involved in pigs exhibiting uncoloured watery diarrhoea.

Poor sanitary conditions can induce a modest inflammation as indicated by an increase in haptoglobin concentration in plasma (Le Floch *et al.*, 2006). Haptoglobin is an acute-phase protein released in response to activation by IL-6, a pro-inflammatory cytokine, which is a sensitive marker of infection or inflammation (Le Floch *et al.*, 2006). In the present study, plasma levels of haptoglobin were similar to those observed in our previous study with pigs raised under good sanitary conditions (Furbeyre *et al.*, 2017). Quesnel *et al.* (2008) and Montagne *et al.* (2012) also observed that plasma haptoglobin concentrations do not systematically increase under poor sanitary conditions, even in situations with contrasted growth performance. This suggests that plasma haptoglobin may not be a good or consistent indicator to assess immune activation under a sanitary challenge. In contrast to this observation, intestinal mucosa at 42 days of age was severely affected by the experimental conditions since villi height in the jejunum and ileum in NC pigs were 30% lower than healthy pigs receiving a similar diet in our previous experiment (Furbeyre *et al.*, 2017). Weaning is associated with an important reduction in villus height during the first days PW, to gradually recover to its pre-weaning state in about two weeks (Pluske *et al.*, 2007). The results of the present study suggest that the recovery phase may be longer or delayed under



poor sanitary conditions. Modest inflammation is known to induce mucosal alterations in the intestine, such as reduced villus height and crypt depth (Peuhkuri *et al.*, 2010). Consequently, the delay in the recovery of the villus structure may result from a moderate and localized immune activation in the intestine.

### ***Effects of Spirulina and Chlorella on growth and digestive health parameters***

Both *Spirulina* and *Chlorella* supplementation in the diet reduced ADG and the G:F ratio, irrespective of the technological process used. This result contradicts with our previous observation, where dietary supplementation of spray-dried *Spirulina* or *Chlorella* did not affect growth performance in pigs raised under good sanitary conditions (Furbeyre *et al.*, 2017). The reduced ADG and G:F ratio may be explained by a somewhat lower ADFI in microalgae supplemented pigs. Previous studies have shown that *Spirulina* and *Chlorella* supplementation could affect diet palatability (Grinstead *et al.*, 2000 ; Halle *et al.*, 2009). Madec *et al.* (1998) suggested that the reduced feed intake in pigs raised under poor sanitary conditions may partly result from a reduction in diet palatability. Taken together, supplementing the diet with microalgae and poor sanitary conditions may have a negative effect on diet palatability, which may contribute to the alteration of growth. However, the decrease in ADG in *Chlorella* supplemented pigs was much more pronounced than *Spirulina* supplemented pigs. Whereas the decrease in ADFI and ADG are of similar scale in *Spirulina* supplemented pigs, the ADG is much more affected than ADFI in *Chlorella* supplemented pigs, especially from 35 d onwards (ADG decrease is 71% and 64% higher than ADFI decrease in C-SD in C-B, respectively). Thus, it seems unlikely that the alteration of growth, especially in *Chlorella* supplemented pigs results only from the lower feed intake.

Pig supplemented with *Chlorella* also had a lower villus height in the jejunum than *Spirulina* supplemented pigs, especially pigs receiving spray-dried *Chlorella*. This altered intestinal



mucosa in *Chlorella* supplemented pigs is associated to a reduced G:F ratio during the second week PW. Both *Spirulina* and *Chlorella* polysaccharides are recognized for their ability to stimulate immune response through TLR recognition, which contributes to the release of pro-inflammatory cytokines by innate immune cells (Balachandran *et al.*, 2006 ; Hsu *et al.*, 2009). Pro-inflammatory cytokines helps in host defence against pathogens but also promotes mucosal damage, as reported before (Peuhkuri *et al.*, 2010). Inflammation also has a negative impact on growth through anorexia and protein catabolism (Johnson, 1997 ; Le Floc'h *et al.*, 2006). Taken together, the reduced ADG, G:F ratio and jejunal villus height in *Chlorella* supplemented pigs suggest that under environmental conditions that contribute to a compromised digestive health, *Chlorella* supplementation may promote the damage or the delayed recovery of intestinal morphology through an enhanced inflammatory response to poor sanitary conditions (Heo *et al.*, 2013). In our study, no differences in cytokine expression were observed at the end of the experiment. Thus, this hypothesis cannot be confirmed. However, cytokine expression analysed in our study only gives an indication on the local inflammatory state at the end of the recovery phase to weaning stress. Thus, further investigation would be necessary to determine the inflammatory response during the acute phase of response to weaning.

Dietary supplementation with *Spirulina* and *Chlorella* did not affect the incidence of diarrhoea. In our previous study (Furbeyre *et al.*, 2017), *Chlorella* supplementation reduced diarrhoea incidence in pigs raised under good sanitary conditions. Since poor sanitary conditions promoted the individual variability in response to weaning and increased diarrhoea severity, evaluating dietary treatments on a limited number of pigs may be more difficult in the present study than in our previous one. However, combined with the previous results, it seems that both *Spirulina* and *Chlorella* supplementation does not reduce digestive disorders under unfavourable conditions for gut health.



The use of bead-milling and freeze-drying positively affected villus height and crypt depth in the jejunum of weaned pigs supplemented with *Spirulina* or *Chlorella*. Bead-milling has been used to release intracellular components and promote their bioavailability, especially in *Chlorella*, which is known to possess a rigid cell wall highly resistant to degradation (Safi *et al.*, 2014a). Freeze-drying was used as a drying method to preserve thermosensitive molecules (Molina Grima *et al.*, 2003). Especially, some components in microalgae, such as phycocyanin in *Spirulina* that possess anti-inflammatory properties, are sensitive to thermal processes (Sarada *et al.*, 2011). In the present study, our results show that this microalgal processing may be beneficial to enhance the intestinal architecture in pigs receiving diets supplemented with *Spirulina* and *Chlorella* in comparison with spray-dried microalgae. However, this effect remained slight and was not associated to a modified cytokine expression or subsequent effect on growth performance.

In conclusion, *Spirulina* and *Chlorella* supplementation had a negative impact on growth performance in pigs weaned under poor sanitary conditions. The reduced growth in pigs receiving *Chlorella* was more pronounced than in those receiving *Spirulina* and was associated to a lower villus height in jejunum. *Spirulina* and *Chlorella* did not affect barrier function and cytokine expression. A marginal improvement of intestinal morphology was observed with bead-milled and freeze-dried microalgae compared with spray-dried microalgae. However, considering how microalgae supplementation negatively impacted feed intake and growth irrespective of the microalgal processing, caution must be taken in drawing conclusions on the interest of this processing to improve gut health at weaning. Further investigations under controlled conditions are needed to evaluate the effects of microalgae supplementation on specific health traits implicated in digestive disorders in pigs, especially in response to inflammatory or infection states.





## LITERATURE CITED

- AOAC. 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.
- Balachandran P, Pugh ND, Ma G et Pasco DS 2006. Toll-like receptor 2-dependent activation of monocytes by *Spirulina* polysaccharide and its immune enhancing action in mice. *International immunopharmacology* 6, 1808-1814.
- Furbeyre H, van Milgen J, Mener T, Gloaguen M et Labussière E 2017. Effects of dietary supplementation with freshwater microalgae on growth performance, nutrient digestibility and gut health in weaned piglets. *Animal* 11, 183-192.
- Grinstead GS, Tokach MD, Dritz SS, Goodband RD et Nelssen JL 2000. Effects of *Spirulina platensis* on growth performance of weanling pigs. *Animal Feed Science and Technology* 83, 237-247.
- Halle I, Janczyk P, Freyer G et Souffrant W 2009. Effect of microalgae *Chlorella vulgaris* on laying hen performance. *Archiva Zootechnica* 12, 5-13.
- Heo J, Opapeju F, Pluske J, Kim J, Hampson D et Nyachoti C 2013. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 97, 207-237.
- Hopwood D et Hampson D 2003. Interactions between the intestinal microflora, diet and diarrhoea, and their influences on piglet health in the immediate post-weaning period. *Weaning the pig: concepts and consequences*, 199-217.
- Hsu H-Y, Jeyashoke N, Yeh C-H, Song Y-J, Hua K-F et Chao LK 2009. Immunostimulatory bioactivity of algal polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa* activates macrophages via Toll-like receptor 4. *Journal of agricultural and food chemistry* 58, 927-936.
- Huang C, Qiao S, Li D, Piao X et Ren J 2004. Effects of lactobacilli on the performance, diarrhea incidence, VFA concentration and gastrointestinal microbial flora of weaning pigs. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences* 17, 401-409.
- Imberechts H, De Greve H et Lintermans P 1992. The pathogenesis of edema disease in pigs. A review. *Veterinary Microbiology* 31, 221-233.
- Janczyk P, Franke H et Souffrant W 2007. Nutritional value of *Chlorella vulgaris*: effects of ultrasonication and electroporation on digestibility in rats. *Animal Feed Science and Technology* 132, 163-169.



Johnson RW 1997. Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: An integrated view. *Journal of animal science* 75.

Lallès J, Boudry G, Favier C, LeFloc'h N, Luron I, Montagne L, Oswald IP, Pié S, Piel C et B. S 2004. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Animal Research* 53.

Le Dividich J 1981. Effects of environmental temperature on the growth rates of early-weaned piglets. *Livestock Production Science* 8, 75-86.

Le Floc'h N, Jondreville C, Matte JJ et Seve B 2006. Importance of sanitary environment for growth performance and plasma nutrient homeostasis during the post-weaning period in piglets. *Archives of animal nutrition* 60, 23-34.

Le Floc'h N, Le Bellego L, Matte J, Melchior D et Sève B 2009. The effect of sanitary status degradation and dietary tryptophan content on growth rate and tryptophan metabolism in weaning pigs. *Journal of animal science* 87, 1686-1694.

Levy SB 1997. Antibiotic resistance: an ecological imbalance. *Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread* 207, 1-14.

Madec F, Bridoux N, Bounaix S et Jestin A 1998. Measurement of digestive disorders in the piglet at weaning and related risk factors. *Preventive veterinary medicine* 35, 53-72.

Madec F, Le Dividich J, Pluske J et Verstegen M 2003. 13 Environmental requirements and housing of the weaned pig. *Weaning the pig: concepts and consequences*, 337.

Molina Grima E, Belarbi EH, Acién Fernández FG, Robles Medina A et Chisti Y 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances* 20, 491-515.

Montagne L, Le Floc'h N, Arturo-Schaan M, Foret R, Urdaci MC et Le Gall M 2012. Comparative effects of level of dietary fiber and sanitary conditions on the growth and health of weanling pigs. *Journal of animal science* 90, 2556-2569.

Peuhkuri K, Vapaatalo H et Korpela R 2010. Even low-grade inflammation impacts on small intestinal function. *World journal of gastroenterology* 16, 1057-1062.

Pluske J, Hansen CF, Payne H, Mullan B, Kim J et Hampson D 2007. Gut health in the pig.

Quesnel H, Renaudin A, Le Floc'h N, Jondreville C, Pere M-C, Taylor-Pickard J et Le Dividich J 2008. Effect of organic and inorganic selenium sources in sow diets on colostrum production and piglet response to a poor sanitary environment after weaning.



Safi C, Zebib B, Merah O, Pontalier P-Y et Vaca-Garcia C 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 35, 265-278.

Sarada DL, Sreenath Kumar C et Rengasamy R 2011. Purified C-phycoyanin from *Spirulina platensis* (Nordstedt) Geitler: a novel and potent agent against drug resistant bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27, 779-783.

Sarada R, Pillai MG et Ravishankar GA 1999. Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochemistry* 34, 795-801.

Song M, Liu Y, Soares J, Che T, Osuna O, Maddox C et Pettigrew J 2012. Dietary clays alleviate diarrhea of weaned pigs. *Journal of animal science* 90, 345-360.

Yaakob Z, Ali E, Zainal A, Mohamad M et Takriff MS 2014. An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *Journal of biological research* 21, 6.

Tableau 7 : Effets de la supplémentation en Spiruline et en Chlorelle sur les coefficients d'utilisation digestive de la MS et de l'azote à 32, 34, 36, 39 et 41 jours d'âge chez le porcelet sevré<sup>1</sup>

Item	Traitements expérimentaux <sup>2</sup>					ETR <sup>3</sup>	P-value <sup>4</sup>	Effets principaux <sup>5</sup>			
	NC	S-SD	S-B	C-SD	C-B			M	T	SP vs. CV	M*T
Coefficients d'utilisation digestive, %											
MS											
32 jours	69.9	80.9	64.6	74.7	72.0	12.3	0.63	0.72	0.26	0.94	0.41
34 jours	67.9	79.8	79.1	80.5	74.5	11.5	0.52	0.12	0.55	0.73	0.64
36 jours	75.2	78.1	75.9	82.3	75.5	6.2	0.48	0.43	0.15	0.52	0.43
39 jours	81.3	82.3	84.2	75.2	77.8	3.9	0.03	0.54	0.24	<0.01	0.84
41 jours	82.9	81.8	83.6	82.3	79.7	2.2	0.10	0.43	0.67	0.13	0.04
Azote											
32 jours	56.0	79.5	50.0	63.7	63.7	18.0	0.48	0.53	0.24	0.93	0.25
34 jours	56.0	76.0	69.3	72.3	66.4	16.0	0.41	0.08	0.40	0.65	0.96
36 jours	64.0	70.4	62.6	76.6	60.0	14.8	0.49	0.69	0.10	0.81	0.53
39 jours	76.7	76.1	80.8	66.8	71.8	7.8	0.14	0.53	0.21	0.03	0.97
41 jours	81.7	76.9	78.0	80.1	76.2	3.6	0.24	0.11	0.45	0.73	0.18

<sup>1</sup> Les valeurs sont présentées comme les moyennes des moindres carrés.

<sup>2</sup>NC = porcelets témoin négatif recevant un aliment standard sans supplémentation ; S-SD = porcelets recevant un aliment standard + 1% Spiruline spray-dried ; S-B = porcelets recevant un aliment standard + 1% Spiruline broyée et lyophilisée ; C-SD = porcelets recevant un aliment standard + 1% Chlorelle spray-dried; C-B = porcelets recevant un aliment standard + 1% Chlorelle broyée. Nombre de porcelets à 32 jours d'âge NC=3, S-SD=4, S-B=4, C-SD=3, C-B=4 ; Nombre de porcelets à 34 jours d'âge NC=4, S-SD=5, S-B=6, C-SD=5, C-B=5; Nombre de porcelets à 36 jours d'âge NC=4, S-SD=5, S-B=6, C-SD=5, C-B=5 ; Nombre de porcelets à 39 jours d'âge NC=4, S-SD=4, S-B=5, C-SD=5, C-B=5 ; Nombre de porcelets à 39 jours d'âge NC=4, S-SD=4, S-B=5, C-SD=5, C-B=6.

<sup>3</sup> ETR = Ecart Type Résiduel

<sup>4</sup> Les données ont été analysées par ANOVA à l'aide d'un modèle MIXED (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), incluant les effets du régime alimentaire et du bloc.

<sup>5</sup> Des contrastes orthogonaux ont été appliqués afin de définir les effets de la supplémentation en microalgues en comparaison au groupe témoin NC (M), du traitement technologique des microalgues (T), la comparaison de la supplémentation en Spiruline et en Chlorelle deux à deux (SP vs. CV) et l'interaction entre les microalgues et le traitement technologique (M\*T).

B. Effets de la supplémentation en Spiruline et en Chlorelle sur les coefficients d'utilisation digestive de la MS et de l'azote chez le porcelet sevré à 32, 34, 36, 39 et 41 jours d'âge

**Résumé :** Nous avons également mesuré dans cet essai la digestibilité fécale des nutriments par prélèvement ponctuel des fèces pendant la période d'expérience (Travail expérimental ; Méthodes ; Méthode de collecte partielle) à 32, 34, 36, 39 et 41 jours d'âge, sur six porcs mâles par traitement expérimental. L'utilisation des poches de prélèvement était peu adaptée à l'utilisation d'un modèle hygiène dégradée et aux fortes proportions de diarrhée. En conséquence, nous n'avons pas pu collecter la totalité des animaux prévus pour l'étude. Les effectifs indiqués en bas de tableau montrent que les effectifs étaient certainement trop faibles et la variabilité individuelle trop forte (en conséquence du statut sanitaire) pour mettre en évidence un effet du régime sur la fonction de digestion. On observe néanmoins des coefficients d'utilisation digestive de la MS et de l'azote significativement réduits en fin d'expérience à 39 jours d'âge chez les animaux supplémentés en Chlorelle ( $P < 0.05$ ). Ces résultats confortent l'idée d'une altération de la structure et de la fonction intestinale plus forte chez les animaux supplémentés en Chlorelle.





### **Chapitre 3**

Effet d'une administration orale en Spiruline et en Chlorelle  
en amont et en aval du sevrage sur la croissance et la santé  
digestive du porcelet



- A. **Publication 3** : Effects of oral supplementation with Spirulina and Chlorella on growth and digestive health in piglets around weaning



**Effects of oral supplementation with *Spirulina* and *Chlorella* on growth and digestive health in piglets around weaning**

**H. Furbeyre\*†, J. van Milgen\*, T. Mener†, M. Gloaguen†, E. Labussière\***

\* PEGASE, Agrocampus Ouest, INRA, 35590, Saint Gilles, France

† Cooperl Arc Atlantique, 1, rue de la Gare, 22640, Plestan, France

<sub>1</sub>This work was financially supported by Cooperl Arc Atlantique (Lamballe, France). The authors thank M. Alix, D. Boutin, F. Guérin, G. Guillemois, Y. Jaguelin-Peyraud, J. Liger, A. Marchais, H. Renoult, J.F. Rouaud, Y. Surel and P. Touanel for skillful technical assistance in animal care and laboratory analyses.

<sub>2</sub>Corresponding author: [etienne.labussiere@inra.fr](mailto:etienne.labussiere@inra.fr)

**Abstract**

Weaning of piglets is associated with important changes in gut structure and function resulting from stressful events such as separation from the sow, moving to a new facility, and the dietary transition from a liquid to a solid feed. This may result in post-weaning diarrhea, a decrease in growth rate, and high antibiotic use. The cyanobacteria *Spirulina platensis* and freshwater microalga *Chlorella vulgaris* have been recognized for their beneficial effects on human health. The objective of this study was to determine the effects of supplementing pigs orally with *Spirulina* and *Chlorella* on changes in the mucosal architecture and cytokine expression in the intestine in response to weaning, and on the consequences on growth performance and diarrhea incidence. The experiment was conducted on 108 suckling piglets of 14 d of age (initial BW = 4.85 ± 0.73 kg) and weaned at 28 d of age (d0). Animals received daily an oral dose of 385 mg/kg BW of *Spirulina platensis* (SP), *Chlorella vulgaris* (CV), or



water (NC) during 4 wk from d-14 to d14. The SP pigs had a higher ADG during the suckling period and a higher weaning BW compared to NC and CV pigs ( $P < 0.05$ ). No difference between treatments was observed for ADG, ADFI, and G:F ratio during the post-weaning period ( $P > 0.10$ ), but the extent of growth retardation after weaning was lower in pigs supplemented with *Chlorella* ( $P < 0.01$ ). Supplementation with *Spirulina* reduced diarrhea incidence by 50% during the first 2 wk post-weaning ( $P < 0.05$ ). Weaning altered mucosal architecture and increased cytokine expression in the jejunum on d2. *Spirulina* and *Chlorella* supplementation did not affect villus height in the jejunum before and after weaning ( $P > 0.10$ ). Before and after weaning, ileal villus height was lower in SP and CV pigs compared with NC pigs ( $P < 0.05$ ). Cytokine expression did not differ between treatments in response to weaning. At d14, IL-8 expression in the ileum was higher in SP pigs, while IL-1 $\beta$  expression in the jejunum was higher in CV pigs ( $P < 0.05$ ). In conclusion, *Spirulina* supplementation enhances growth before weaning and reduced diarrhea incidence in weaned pigs. However, these effects do not result from a modulation of the intestinal inflammatory response to weaning stress. Further investigation is needed to identify the mechanisms explaining these benefits.

**Key words:** microalgae health diarrhea nutrition inflammation

## Introduction

Weaning is a critical step in pig farms in which piglets are separated from the sow, mixed with other piglets from different litters, and exposed to an abrupt dietary transition from maternal milk to solid feed. Weaning stress leads to transient and acute changes in the pig's intestine through alterations in the structure and function of the intestine (McCracken *et al.*, 1999; Boudry *et al.*, 2004), the activation of local immune and inflammatory responses (McCracken *et al.*, 1999; Pié *et al.*, 2004), and a change in microbial balance that may





contribute to the development of pathogenic bacteria in the gut (Hopwood et Hampson, 2003 ; Konstantinov *et al.*, 2006). The acute changes in the intestine at weaning are responsible for diarrhea and for a transient decrease in growth performance (Lallès *et al.*, 2004), which have led to utilization of antibiotics to counteract bacterial infections and mortality. The use of antibiotics is of major concern nowadays since it is responsible of bacterial resistance, but bacterial infections after weaning may be difficult to manage without the use of antibiotics (Barton, 2000). *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* are two microalgae that have been widely studied for their beneficial effects on human health, including antioxidant, anti-inflammatory, and immunostimulatory activities (Yaakob *et al.*, 2014). In a previous study (Furbeyre *et al.*, 2017), we observed a reduced diarrhea incidence in pigs during the first two weeks post-weaning for diets supplemented with 1% *Chlorella*. Villus height in the jejunum was also increased in pig that received diets supplemented with 1% *Spirulina* or *Chlorella*. However, the effects remained limited and the associated mechanisms are still unclear. One hypothesis is that *Spirulina* and *Chlorella* could contribute to intestinal integrity and function by modulating the local immune and inflammatory responses to weaning stress. As a consequence, *Spirulina* and *Chlorella* could alleviate post-weaning diarrhea and contribute to maintaining growth performance in weaned pigs. The objective of this study is to evaluate the effects of a supplementation with *Spirulina* and *Chlorella* around weaning on the local inflammatory response to weaning, and on the consequences on intestinal integrity, diarrhea incidence, and growth performance.

## **Materials and methods**

This experiment was conducted in the experimental facilities from the INRA under the ethical guidelines for use of animals for scientific purposes and was approved by the French Ministry of Education and Research (authorization n°2015120718489537).

**Table 1.** Composition of standard weaner diet

	Standard diet
Ingredients (%)	
Barley	45.78
Soybean meal	17.50
Soy protein concentrate	2.50
Whey powder	20.00
Skim milk powder	4.80
Vegetal fat	5.50
Wheat	0.04
Wheat middlings	0.06
Calcium carbonate	1.60
Monocalcium phosphate	0.66
Vitamin and mineral premix <sup>1</sup>	0.50
L-lysine HCl	0.41
DL-methionine	0.26
L-threonine	0.17
L-tryptophan	0.04
L-valine	0.07
Formic acid	0.10
Phytase	0.01
Chemical composition (% DM)	
Analyzed	
CP (N × 6.25)	20.40
Fat	7.39
Ash	6.99
Crude fiber	2.79
NDF	8.12
ADF	3.37
ADL	0.40
GE (MJ / kg DM)	18.66
Calculated <sup>2</sup>	
DE (MJ/kg DM)	16.29
ME (MJ/kg DM)	15.59
NE (MJ/kg DM)	11.93
Amino acid composition <sup>3</sup> (%)	
Lys	1.21
Thr	0.76
Met	0.51
Cys	0.25
Trp	0.23
Ile	0.68
Val	0.82
Leu	1.15

<sup>1</sup> Supplied the following per kilogram of diet: vitamin A, 10 000 IU; vitamin D3, 2000 IU; vitamin E, 20 mg; vitamin C, 40 mg; vitamin B1, 2 mg; vitamin B2, 5 mg; calcium panthothenate, 10.85 mg; niacin, 20 mg; vitamin B12, 0.03; vitamin B6, 5 mg; vitamin K3, 2 mg; folic acid, 1 mg; biotin, 0.2 mg; choline chloride, 600 mg; Fe, 103.75 mg; Cu, 20 mg; Zn, 99.3 mg; Mn, 40 mg; I, 0.6 mg; Co, 1 mg; Se, 0.3 mg.

<sup>2</sup> Calculations for DE, ME and NE have been performed using EvaPig® software (<http://www.evapig.com>).

<sup>3</sup> Standardized ileal digestible values.

### ***Microalgae and processing***

*Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* were processed and provided by Algosource Technologies, Saint-Nazaire, France. Fresh *Spirulina* and *Chlorella* were bead-milled under a process temperature below 20°C using Zirmil® beads (Ø 0.6 mm), and then freeze-dried during 72 h (maximal temperature of 17 °C).

### ***Experimental design***

The experiment was conducted with 108 crossbred suckling piglets ((Large White × Landrace) × Piétrain) of 14 d old with an initial BW of  $4.85 \pm 0.73$  kg, from the experimental herd of INRA, Saint-Gilles, France. Blocks of 3 littermates were created according to BW and sex, resulting in 18 blocks of males and 18 blocks of females. Piglets did not receive any pelleted diet during the suckling period. Piglets were weaned at 28 d of age (d0) in individual cages and received a standard weaner diet without antibiotics *ad libitum* until d14 of experiment (Table 1). Piglets from each block were allocated to 1 of the following groups: I. Negative control (NC); II. *Spirulina platensis* (SP); III. *Chlorella vulgaris* (CV). From d-14 until d14, piglets were administered daily by oral force-feeding a solution of water for the NC group, freeze-dried *Spirulina platensis* dissolved in water (385 mg/kg BW) for the SP group, or freeze-dried *Chlorella vulgaris* dissolved in water (385 mg/kg BW) for the CV group. According to BW, sex and block 6 piglets were selected at the end of the suckling period (d-1), 10 piglets at d2, and 6 piglets at d14 and were stunned electrically and then killed by exsanguination for blood and tissue sampling. All selected pigs did not exhibit diarrhea or BW loss in the last 48 hours before killing.



### ***Measurements and sampling***

Pigs were weighed individually each day without fasting from d-15 to d14. The required quantities of freeze-dried *Spirulina* and *Chlorella* supplementation were calculated according to the mean BW of all piglets of the previous day. Freeze-dried *Spirulina* and *Chlorella* was dissolved in water (microalgae/water ratio ~30%) and conditioned in individual syringes. Syringes for NC pigs were prepared using water only, using the same volume as that of the *Spirulina* and *Chlorella* solutions. Oral doses of *Spirulina*, *Chlorella* and water were administered immediately after preparation (8h00) to each piglet.

Offered feed from d0 to d13 was weighed daily for each pig and a sample of feed was collected daily and stored at 4°C. A first set of aliquots was used to determine the DM content of the daily offered feed after drying at 103°C during 24 h. A second set of aliquots was pooled for the entire experiment, which were then ground in a hammer mill equipped with a 1 mm grid for further laboratory analyses. Feed refusals were collected daily for each piglet and dried at 103°C during 24 h before weighing. Diarrhea score of each pig was assessed visually each day after treatment administration from d0 to d14 with a score ranging from 0 to 3 according to the description of Whelan *et al.* (2004): 0=hard and formed corresponding to normal feces, 1=soft and formed corresponding to moist feces, 2=loose and unformed corresponding to mild diarrhea, and 3=liquid or severe diarrhea.

At slaughter, blood samples were collected in heparinized tubes and stored on ice. Blood samples were then centrifuged during 15 minutes at  $3000 \times g$  at 4°C for plasma collection. Plasma samples were stored at -20°C for further analysis of haptoglobin concentration. Three-cm segments of the jejunum (middle of the small intestine) and ileum (10 cm from the ileocecal junction) were collected, flushed in a 0.9% NaCl solution, fixed with a 4% formaldehyde-phosphate buffer, and stored at 4°C for histological measurements. One-cm segments of mucosa from the jejunum and specific Peyer's Patch tissue from the ileum were



cut in small pieces, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for further analysis of gene expression by real time quantitative PCR.

### ***Laboratory analyses***

#### *Chemical composition of standard weaner diet*

Pooled samples of offered feed were analyzed for DM, ash, organic matter, gross energy (GE), nitrogen (N), crude fiber, and the NDF, ADF and ADL fractions. The DM was measured after drying during 24 h at 103°C. Ash was determined after ignition at 550°C during 6 h according to the method described by AOAC (1990) and organic matter was determined by calculation of the difference between DM and ash. The GE content was measured using an adiabatic bomb calorimeter (IKA, Staufen, Germany) using the method described by the International Organization for Standardization (ISO 9831:1998; ISO methods, <http://www.iso.org>). The N content was determined using a Rapid N analyzer (Elementar, France) according to the Dumas method (AOAC, 1990). The crude fiber content was determined after digestion with 1.25% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 1.25% NaOH solutions according to the AOAC (1990) in an automatic Fibersac apparatus (ANKOM, New-York, USA). The NDF, ADF, and ADL fractions were determined according to the method of Van Soest *et al.* (1991) using an automatic Fibersac apparatus (ANKOM, New-York, USA).

#### *Acute phase protein in plasma*

Haptoglobin concentration in plasma was analyzed using a colorimetric method (Phase Haptoglobin Assay T801; Tridelta Ltd, Maynooth, Ireland) with an automatic analyzer (Konelab 20i; Thermo Scientific, France).





*Intestinal measurements**Small intestine morphology*

The jejunum and ileum segments were removed from the formaldehyde-phosphate buffer after 72 h and washed in 3 consecutive solutions of ethanol:water (75:25, v:v). The fixed intestinal tissues were embedded in paraffin, sectioned at a 7  $\mu\text{m}$  thickness, mounted on SuperFrost Plus slides (Labo-Moderne, Paris, France), and stained with hematoxylin and eosin. Slides were scanned using the NanoZoomer Digital Pathology technology (Hamamatsu, Kista, Sweden). Villus height and crypt depth were measured using the associated NDP view software (NDP View Version 1.2.2.5). Fifteen straight and complete villi and 10 crypts were selected from the mucosal site of each sample in jejunum and ileum for the measurement of villus height and crypt depth.

*Quantification of mRNA expression by RT-PCR*

Total RNA from samples of jejunal mucosa and ileal Peyer's patches was extracted using the TRIzol® Reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and Precellys® homogenizer (Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, France). Extracted RNA was suspended in RNase-free water. Concentration and purity (absorbance ratios) was assessed using a spectrophotometer (Denovix Inc., Wilmington, USA) and the total quantity of RNA was adjusted to 2  $\mu\text{g}$ . The integrity of extracted RNA was assessed using the lab-on-chip capillary gel-electrophoresis (2100 Bioanalyzer, Agilent, Les Ulis, France) according to the description of the manufacturer. The RNA Integrity Numbers were comprised between 7.5 and 10. Reverse transcription of total RNA to complementary DNA was performed using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers for Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-8 (IL-8), Interleukin-10 (IL-10), Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), Zonula Occludens-1 (ZO-1), Occludin, and the 2 housekeeping genes cyclophilin A (PPIA) and Ribosomal Protein Large P0 (RPLP0)

Table 2. Oligonucleotide sequences designed for the quantification of intestinal cytokines and tight junctions

Gene identification	GenBank number	Primer sequence
Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF $\alpha$ )	NM_214022.1	F:GGTTATCGGCCCCAGAA R:TGGGCGACGGGCTTATC
Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )	NM_214055.1	F:GCCAGTCTTCATTGTTTCAGGTTT R:TTGTCACCGTAGTTAGCCATCACT
Interleukin-8 (IL(8))	NM_213867.1	F:GCTCTCTGTGAGGCTGCAGTTC R:AAGGTGTGGAATGCGTATTTATGC
Interleukin-10 (IL-10)	NM_214041.1	F:CGGCGCTGTCATCAATTTCTG R:CCCCTCTCTGGAGCTTGCTA
Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)	NM_214015.1	F:AGCGGCAACCAAATCTATGATAA R:CGACGTGTTGAACAGCATATATAAGC
Zonula Occludens-1 (ZO-1)	XM_003480423.3	F:AGGCGATGTTGTATTGAAGATAAATG R:TTTTTGCATCCGTCAATGACA
Occludin	NM_001163647.2	F:CACCCTCCAGATTGGCTGAT R:ATCAGGTGACCCGCTGACA
Peptidylpropyl isomerase A (PPIA)	NM_214353.1	F:AGCACTGGGGAGAAAGGATT R:AAAACCTGGGAACCGTTTGTG
Ribosomal Protein Large P0 (RPLP0)	NM_001098598.1	F:ACCGAGGAACTCTGCATTCTC R:TGGGTAACCAATCTGCAGACAT

were designed using the Primer Express software (Applied Biosystems, USA), based on recorded nucleotide sequences for *Sus scrofa* (Table 2). Samples (2 ng) were disposed in duplicates in a 96-well plate in presence of primer probes (200 nM each) and PCR buffer (Fast SYBR® Green Master Mix, Applied Biosystems, USA). Samples disposition was designed to avoid cross effects between PCR process and experimental conditions. Amplification cycles were performed using the StepOnePlus™ Real Time PCR system (Applied Biosystems, USA), with the following thermal cycling conditions: 50°C during 2 min, 95°C during 20 s, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C during 3 s, and annealing at 60°C during 30 s. Melt curve specificity was validated for all samples. Results were normalized to PPIA mRNA levels for the mucosa of the jejunum and RPLP0 mRNA levels for Peyer's patch of the ileum.

### *Calculations*

The daily DM intake was calculated as follows:

Dry matter intake = daily offered feed × percentage of DM of daily offered sample - daily dried refusal.

The average daily feed intake (ADFI) was calculated for the post-weaning period (from d0 to d14) by averaging daily feed intake adjusted for 87% DM. The average daily gain (ADG) was calculated by averaging weight gain calculated each day for the total post-weaning period (from d0 to d14). The G:F ratio was calculated as the ratio between ADG and ADFI from d0 to d14.

A potential growth during the post-weaning period was calculated as the theoretical daily BW expected for each pig according to its growth performance (ADG) before weaning (from d-14 to d0). Calculation was as follows:

Theoretical BW at  $d_i$  = BW at d0 + (ADG during the suckling period) ×  $i$



Growth retardation after weaning was calculated as the difference between theoretical BW and the daily measured BW from d0 to d14.

Diarrhea incidence was calculated for each treatment according to the formula of Huang *et al.* (2004): Diarrhea incidence (%) = (number of cases of diarrhea recorded)/(number of pigs by treatment × total experimental days) × 100, where the number of cases of diarrhea recorded was the sum of the number of pigs with diarrhea observed each day for the total experimental period.

### *Statistical Methods*

One pig from SP was excluded from the post-weaning analyses because of severe diarrhea, negative weight gain, and loss of vitality that required an antibiotic treatment. Data for growth performance (i.e., BW, ADG, ADFI, and G:F ratio) were analyzed separately for the suckling period and the post-weaning period using MIXED procedure of SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) and included treatment as fixed effect, block as random effect, and initial BW as a covariate. Growth retardation during the post-weaning period (difference between potential growth and effective growth) was analyzed using MIXED procedure of SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), including treatment, block, age, and the interaction between treatment and age as fixed effects, considering repeated measurements. Data for plasma concentration of haptoglobin and intestinal morphology (villus height, crypt depth, V:C ratio) at d-1, d2 and d14 were analyzed using the GLM procedure of SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) including treatment, day, and the interaction between treatment and day as fixed effects. Intestinal gene expressions were analyzed for d-1 and d2 using GLM procedure of SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) considering treatment, day, and the interaction between treatment and day as fixed effects. Data for gene expressions at d14 were analyzed separately because of significant change in housekeeping gene expression with d-1 and d2.

**Table 3.** Effects of oral administration of *Spirulina* and *Chlorella* on growth performance in piglets around weaning

Item	N	Treatment <sup>1</sup>			rSD <sup>2</sup>	P-value <sup>3</sup>
		NC	SP	CV		
Suckling period (d-14 to d0)						
Initial BW, kg	108	4.86	4.83	4.86	0.36	0.93
Final BW, kg <sup>4</sup>	108	8.70 <sup>a</sup>	8.93 <sup>b</sup>	8.71 <sup>a</sup>	0.41	0.02
ADG, kg <sup>4</sup>	108	298 <sup>a</sup>	317 <sup>b</sup>	298 <sup>a</sup>	32	0.01
Post-weaning period (d0 to d14) <sup>5</sup>						
Initial BW, kg	59	8.94	9.27	8.91	0.51	0.06
Final BW, kg	59	12.70	13.11	13.05	1.10	0.46
ADFI, g/d	59	346	322	353	71	0.38
ADG, g/d	59	271	273	297	75	0.49
G:F g/g	59	0.79	0.84	0.84	0.11	0.27

<sup>a,b</sup> Means within a row with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup> Treatments: NC = Water; SP = freeze-dried *Spirulina platensis* dissolved in water; CV = freeze-dried *Chlorella vulgaris* dissolved in water.

<sup>2</sup> rSD = residual standard deviation.

<sup>3</sup> Analysis of variance performed on BW, ADFI, ADG, and G:F using MIXED model (SAS Inst. Inc., Cary, NC) including treatment as fixed effect and block as random effect. Initial BW was used as a covariate.

<sup>4</sup> Square transformations were performed on final BW and ADG data for the suckling period before the statistical analysis. Values are presented as means and residual standard deviation of the back-transformed estimated data from the MIXED model.

<sup>5</sup>  $n=20$  piglets per treatment for NC and CV and  $n=19$  piglets for SP.

Data for gene expression at d14 were analyzed using the GLM procedure of SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) including treatment as fixed effect. The Shapiro–Wilk’s normality test was performed on the residuals for each trait. To validate this assumption, data transformations were performed on BW at d-1, ADG from d-14 to d-1, villus height and crypt depth at the ileum (d-1, d2 and d14), TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, TGF- $\beta$ 1, ZO-1 and Occludin at the jejunum (d-1 and d2), and IL-1 $\beta$  and IL-8 at the ileum (d-1 and d2), ZO-1 at the jejunum (d14), and TGF- $\beta$ 1 at the ileum (d14). Transformations performed on data are reported in tables.

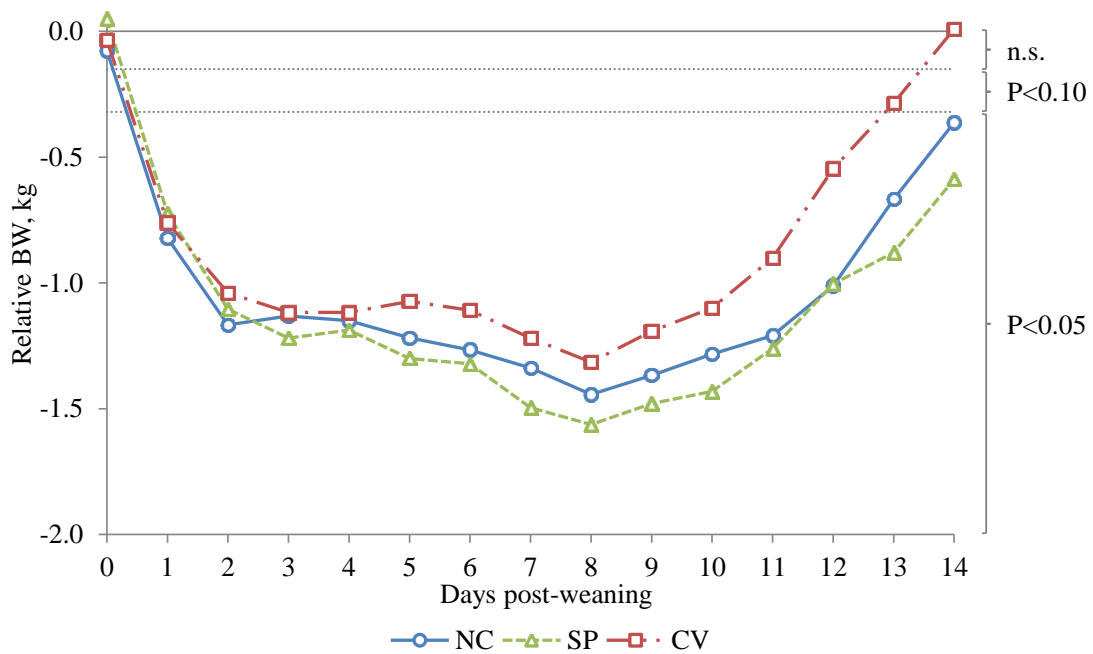
Diarrhea incidence was analyzed by  $\chi^2$  contingency test using the FREQ procedure of SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A survival time to diarrhea outcome was defined individually as the number of days between d0 and the first observation of diarrhea. For pigs that did not exhibit diarrhea within the 14 d post-weaning, survival time was defined as the maximal value (14 d) and was censored (i.e., the survival time is considered higher than 14). The method of Kaplan-Meier was used to assess survival probability to diarrhea outcome during the post-weaning period in the three treatments using the LIFETEST procedure of SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Comparison of survival probabilities between treatments was performed using Wilcoxon test. Probability values lower than 0.05 were considered to be significant and probability values lower than 0.10 were considered as a trend.

## Results

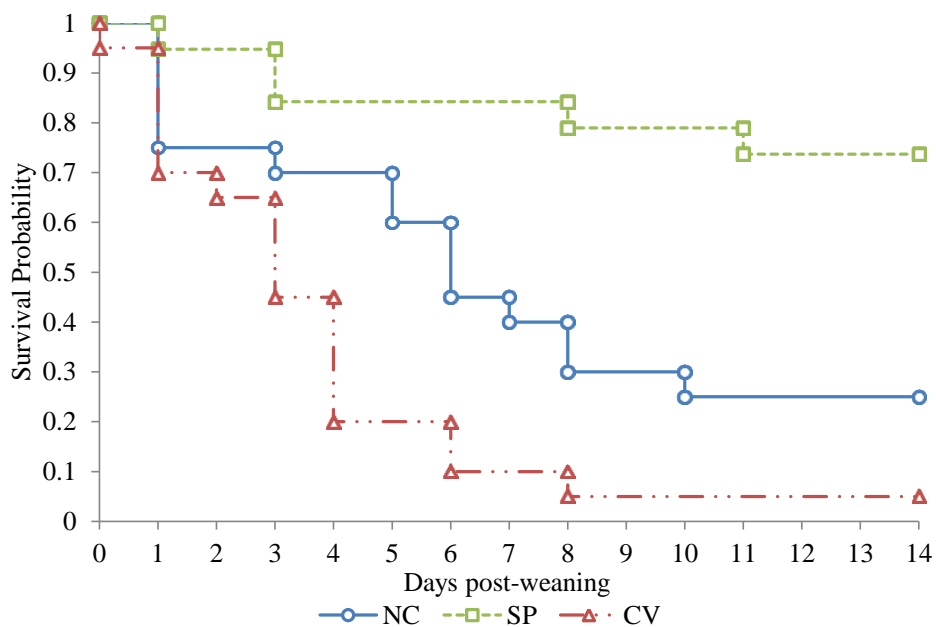
### *Growth performance*

The SP piglets had a higher ADG (+6%) during the suckling period and a higher BW (+3%) at weaning than NC and CV piglets ( $P < 0.05$ ; Table 3). Feed intake during the first 48 h post-weaning averaged  $103 \pm 114$  g and did not differ between treatments ( $P > 0.10$ ; data not shown). The ADFI averaged  $340 \pm 40$  g/d from d0 to d14 and did not differ between





**Figure 1.** Change in BW relative to the potential BW in control pigs (NC) and pigs supplemented with *Spirulina* (SP) or *Chlorella* (CV) during the 14 d after weaning. Potential BW is the theoretical BW for each pig based on its preweaning ADG (ADG from d-14 to d0). Potential BW corresponds to zero value. Statistical analysis was performed using the MIXED procedure of SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC) considering repeated measurements;  $rSD=0.64$ . Measured BW relative to the potential BW was higher ( $P < 0.01$ ) in CV pigs (mean=-0.8 kg) than in NC and SP pigs (mean=-1.0 and -1.1 kg respectively). In CV pigs, measured BW was not different from the potential BW on d14 ( $P > 0.10$ ) whereas it was still different in NC and SP pigs ( $P < 0.01$ ).



**Figure 2.** Survival probability to diarrhea outcome in NC pigs and pigs supplemented with *Spirulina* (SP) or *Chlorella* (CV) during the 14 d after weaning. Survival analysis was performed by the method of Kaplan-Meier. The SP pigs had a higher survival probability to diarrhea in the first 2 wk post-weaning compared to NC and CV pigs ( $P = 0.02$ ). The CV pigs had a lower survival probability to diarrhea than NC pigs from d0 to d14 ( $P = 0.04$ ).

treatments ( $P > 0.10$ ; Table 3). On the first day post-weaning, BW decreased by  $455 \pm 132$  g with no difference between treatments ( $P > 0.10$ ). From d0 to d14, BW increased from  $9.04 \pm 1.37$  to  $12.93 \pm 1.73$  kg, resulting in an ADG of  $280 \pm 42$  g/d and a G:F ratio of  $0.82 \pm 0.04$ , with no effect of treatment ( $P > 0.10$ ; Table 3). Potential growth during the post-weaning period was calculated as the theoretical BW expected for each pig according to its growth performance before weaning (from d-14 to d0). The difference between actual BW and theoretical BW increased until d8, to decrease thereafter until d14 ( $P < 0.01$ ; Figure 1). The measured BW in NC and SP pigs was lower than their potential BW until d14 ( $P < 0.01$ ; Figure 1). The difference between measured BW and potential BW was lower in CV pigs than for the other groups ( $P < 0.05$ ) and the measured BW did not differ from potential BW at d14 ( $P > 0.10$ ; Figure 1).

#### *Clinical signs of diarrhea*

During the post-weaning period, diarrhea was observed in 66% of pigs. Among them, 54% corresponding to 36% of all pigs had at least 1 d of liquid or severe diarrhea (data not shown). Moderate and total diarrhea incidences were lower in SP pigs than in NC and CV pigs ( $P < 0.01$ ; Table 4), but no differences among treatments were observed for severe diarrhea ( $P > 0.10$ ). Survival rate to diarrhea outcome from d0 (weaning) to d14 (Figure 2) was higher ( $P=0.02$ ) in SP pigs (74% survival) than in NC pigs (25% survival) and CV pigs (5% survival). The half survival time was lower in CV pigs than in NC pigs (3 d vs. 6 d respectively) and diarrhea outcome was greater in CV pigs than in NC pigs (95% vs. 80% respectively) ( $P = 0.04$ ).

Table 4. Effects of oral administration of *Spirulina* and *Chlorella* on diarrhea incidence and prevalence during the post-weaning period in piglets

Item	n	Treatment <sup>1</sup>			P-value <sup>2</sup>
		NC	SP	CV	
Diarrhea incidence, % <sup>3</sup>					
Mild diarrhea, % <sup>4</sup>	60	29.3 <sup>a</sup>	16.6 <sup>b</sup>	29.0 <sup>a</sup>	<0.01
Severe diarrhea, % <sup>4</sup>	60	6.2	3.6	6.9	0.20
Total diarrhea, % <sup>4</sup>	60	35.5 <sup>a</sup>	20.2 <sup>b</sup>	35.9 <sup>a</sup>	<0.01

<sup>a,b</sup> Means within a row with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup> Treatments: NC = Water; SP = freeze-dried *Spirulina platensis* dissolved in water; CV = freeze-dried *Chlorella vulgaris* dissolved in water.

<sup>2</sup> Effect of treatment.

<sup>3</sup> Incidence (%) was calculated by treatment as (number of cases of diarrhea recorded)/(number of pigs by treatment  $\times$  total experimental days)  $\times$  100, where the number of cases of diarrhea recorded was the sum of the number of pigs with diarrhea observed each day for the experimental period. Statistical analysis was conducted by  $\chi^2$ -test on diarrhea incidences.

<sup>4</sup> Diarrhea score = 0, normal feces; 1, moist feces; 2, mild diarrhea; 3, severe diarrhea. Mild diarrhea = number of pig days with diarrhea score of 2. Severe diarrhea = number of pig days with diarrhea score of 3. Total diarrhea = number of pig days with diarrhea score equal or higher than 2.

***Acute phase protein in plasma***

Plasmatic concentration of haptoglobin increased after weaning from  $0.17 \pm 0.11$  mg/mL at d-1 to  $1.25 \pm 0.09$  and  $1.52 \pm 0.11$  mg/mL at d2 and d14 ( $P < 0.01$ ; Table 5). Plasma concentration of haptoglobin did not differ between the three groups of piglets ( $P > 0.10$ ).

***Intestinal morphology***

Villus height at the jejunum did not differ between treatments, whatever the age ( $P > 0.10$ ; Table 5). For all treatments, villus height at the jejunum was 40% lower on d2 after weaning than before weaning (d-1) ( $P < 0.01$ ) and returned to a villus height similar to that before weaning at d14 ( $P > 0.10$ ). Crypt depth at the jejunum increased gradually from d-1 to d14 reaching 168% of the preweaning depth at d14 ( $P < 0.01$ ). The jejunal V:C ratio decreased from  $2.7 \pm 0.1$  at d-1 to  $1.4 \pm 0.1$  at d2 ( $P < 0.01$ ) and then remained stable until d14. At the ileum, villus height was lower in SP and CV pigs than in NC pigs whatever the age ( $P < 0.05$ ; Table 5). Villus height did not differ between d-1 and d2 but increased by 32% between d2 and d14 ( $P < 0.01$ ), corresponding to 127% of preweaning value ( $P < 0.01$ ). The ileal V:C ratio decreased from  $1.7 \pm 0.1$  at d-1 to  $1.3 \pm 0.1$  at d14 ( $P < 0.10$ ). The V:C ratio tended to be lower in SP and CV pigs compared with NC pigs ( $P = 0.07$ ).

***Intestinal cytokine and tight junction mRNA expression***

The housekeeping genes did not differ between d-1 and d2, but showed a significant variation with d14. Consequently, relative expression of genes encoding for pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines and tight junctions proteins were analyzed separately for d-1 and d2 on the one hand, and for d14 on the other hand. In jejunal mucosa, relative expressions of cytokines and tight junctions did not differ between the treatments ( $P > 0.10$ ). Independent of treatment, concentrations of IL-8 and IL-10 increased ( $P < 0.01$ ; Table 6) and relative

Table 5. Effects of oral administration of Spirulina and Chlorella on plasma haptoglobin concentration and on intestinal morphology of piglets around weaning<sup>1</sup>

Item	Day	Treatment <sup>2</sup>			rSD <sup>3</sup>	P-value <sup>4</sup> Main effect		
		NC	SP	CV		Treatment	Day	T*D
Haptoglobin in plasma, mg/mL								
	-1	0.24	0.17	0.09	0.46	0.52	<0.01	0.78
	2	1.37	1.36	1.03				
	14	1.52	1.49	1.54				
Intestinal morphology								
Jejunum								
Villus height (µm)								
	-1	504	523	584	87	0.93	<0.01	0.28
	2	338	304	321				
	14	530	518	463				
Crypt depth (µm)								
	-1	224	208	196	36	0.77	<0.01	0.12
	2	211	253	236				
	14	349	347	361				
V:C ratio								
	-1	2.47	2.56	3.04	0.57	0.60	<0.01	0.24
	2	1.65	1.25	1.40				
	14	1.51	1.53	1.29				
Ileum								
Villus height (µm)								
	-1	320	258	256	50	0.03	<0.01	0.39
	2	267	264	267				
	14	392	332	336				
Crypt depth (µm)								
	-1	174	175	157	27	0.58	<0.01	0.57
	2	183	186	183				
	14	263	284	287				
V:C ratio								
	-1	1.86	1.52	1.69	0.34	0.07	<0.01	0.46
	2	1.46	1.44	1.47				
	14	1.51	1.11	1.18				

<sup>a,b</sup> Means within a row with different superscripts differ (P < 0.05).

<sup>1</sup> Day 0 = weaning; n=6 piglets / treatment on d -1; n=10 piglets / treatment on d 2; n=6 piglets / treatment on d 14.

<sup>2</sup> Treatments: NC = Water; SP = freeze-dried *Spirulina platensis* suspended in water; CV = freeze-dried *Chlorella vulgaris* suspended in water.

<sup>3</sup> rSD = residual standard deviation.

<sup>4</sup> Analysis of variance performed on items data using GLM model (SAS Inst. Inc., Cary, NC) including the effects of treatment, day, and interaction between treatment and day (T\*D). Logarithmic and inverse transformations were performed on data for villus height and crypt depth at ileum site respectively before statistical analysis. Values are presented as means and residual standard deviation of the back-transformed estimated data from the GLM model.

expressions of TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  tended to increase ( $P < 0.10$ ) at the jejunum between d-1 and d2. No change in jejunal TGF- $\beta$ 1 and ZO-1 expression was observed between d-1 and d2 ( $P > 0.10$ ; Table 6). Occludin expression decreased between d-1 and d2 ( $P < 0.01$ ; Table 6). No direct effect of weaning or treatment was observed on the expression of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, and IL-10 in ileal Peyer's patches ( $P > 0.10$ ; Table 6), but expression of TGF- $\beta$ 1 was lower at d2 compared with d-1 ( $P < 0.01$ ). Relative expression of tight junction ZO-1 did not differ between treatments or between d-1 and d2 ( $P > 0.10$ ; Table 6). Relative expression of Occludin in Peyer's patches tended to increase between d-1 and d2 ( $P < 0.10$ ; Table 6) and tended to be lower in SP and CV pigs than in NC pigs ( $P < 0.10$ ).

Late effects of weaning (d14) on cytokine and tight junction expressions are presented in Table 7. In jejunal mucosa, relative expressions of TNF $\alpha$ , IL-8, TGF- $\beta$ 1, ZO-1, and Occludin did not differ between treatments ( $P > 0.10$ ). The expression of pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  in the jejunum of CV pigs was 2.3 fold that of NC pigs ( $P < 0.05$ ). In Peyer's Patches, the relative expression of TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  did not differ between treatments ( $P > 0.10$ ). Relative expression of IL-8 in Peyer's patches in SP pigs was 1.5 fold that of NC and CV pigs ( $P < 0.05$ ). Expression of the anti-inflammatory cytokines TGF- $\beta$ 1 and IL-10 and of tight junctions ZO-1 and Occludin did not differ between treatments ( $P > 0.10$ ).

## **Discussion**

### ***Experimental validation***

In agreement with previous studies (Le Dividich and Sève, 2000), our results showed that weaning stress is associated with transient anorexia and negative weight gain during the first 24 h following weaning. Growth returned to positive values from the second day post-weaning onwards and BW recovered to its pre-weaning value after 4 d. Weaning results in growth retardation and resilience to the weaning challenge in NC pigs was incomplete at the

**Table 6.** Effects of oral administration of *Spirulina* and *Chlorella* on intestinal expression of cytokines in piglets around weaning<sup>1</sup>

Item	Day	Treatment <sup>2</sup>			rSD <sup>3</sup>	P-value <sup>4</sup> Main Effect		
		NC	SP	CV		Treatment	Day	T*D
Jejunum (mucosa)								
TNF $\alpha$ <sup>5</sup>	-1	0.76	0.89	1.21	0.60	0.41	0.09	0.26
	2	1.32	1.06	1.20				
IL-1 $\beta$ <sup>5</sup>	-1	1.07	1.18	0.91	0.59	0.79	0.07	0.61
	2	1.26	1.67	1.83				
IL-8 <sup>5</sup>	-1	0.70	0.80	0.63	0.47	0.73	<0.01	0.68
	2	1.14	1.16	1.17				
IL-10	-1	0.82	0.62	0.92	0.42	0.97	<0.01	0.19
	2	1.15	1.28	1.01				
TGF- $\beta$ 1 <sup>5</sup>	-1	0.98	0.91	1.26	0.42	0.40	0.27	0.23
	2	1.09	0.82	0.84				
ZO-1 <sup>5</sup>	-1	0.99	0.99	0.91	0.39	0.41	0.30	0.56
	2	1.04	0.75	0.79				
Occludin <sup>5</sup>	-1	1.24	1.11	0.96	0.27	0.13	<0.01	0.58
	2	0.95	0.56	0.56				
Ileum (Peyer's patch)								
TNF $\alpha$	-1	1.13	1.19	1.14	0.21	0.93	0.23	0.74
	2	1.11	1.07	1.06				
IL-1 $\beta$ <sup>5</sup>	-1	0.21	0.22	0.15	0.11	0.55	0.45	0.36
	2	0.14	0.19	0.18				
IL-8 <sup>5</sup>	-1	0.83	0.84	0.59	0.43	0.50	0.21	0.46
	2	0.82	0.97	0.90				
IL-10	-1	1.07	1.02	0.94	0.24	0.97	0.48	0.26
	2	0.98	1.07	1.13				
TGF- $\beta$ 1	-1	1.04	1.07	1.03	0.24	0.99	0.02	0.80
	2	0.88	0.83	0.90				
ZO-1	-1	0.94	0.91	0.90	0.14	0.95	0.18	0.79
	2	0.97	0.96	1.00				
Occludin	-1	0.96	0.63	0.67	0.28	0.07	0.07	0.49
	2	0.99	0.91	0.83				

<sup>a,b</sup> Means within a row with different superscripts differ ( $P < 0.05$ )

<sup>1</sup> Day 0 = weaning;  $n=6$  piglets / treatment on d-1;  $n=10$  piglets / treatment on d2.

<sup>2</sup> Treatments: NC = Water; SP = freeze-dried *Spirulina platensis* suspended in water; CV = freeze-dried *Chlorella vulgaris* suspended in water.

<sup>3</sup> rSD = residual standard deviation.

<sup>4</sup> Analysis of variance performed on items data using GLM model (SAS Inst. Inc., Cary, NC) including the effects of treatment, day, and interaction between treatment and day (T\*D).

<sup>5</sup> Logarithmic transformations were performed on data for TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, TGF- $\beta$ 1, ZO-1, and Occludin at the jejunum and for IL-1 $\beta$  and IL-8 at the ileum before statistical analysis. Values are presented as means and residual standard deviation of the back-transformed estimated data from the GLM model.

end of the experiment, since pigs did not recover their potential growth after 14 d. During the first 2 wk after weaning, 66% of piglets had at least 1 d of diarrhea, which is much higher than that in the study of Montagne *et al.* (2012; 29% of piglets with diarrhoea) but lower than that in our previous study, where pigs were exposed to a cold stress at 33 d of age (Furbeyre *et al.*, 2017; 90% of piglets with diarrhoea). The implication of pathogens such as enterotoxigenic *E. coli* in the diarrhea cannot be ruled out but most cases of diarrhea were mild and even more severe episodes generally lasted only for 1 d. Feed intake and BW gain during the post-weaning period were higher than observed in other studies with similar weaning weight and age (Le Floc'h *et al.*, 2006 ; Montagne *et al.*, 2012 ; Furbeyre *et al.*, 2017).

As reported by Boudry *et al.* (2004), after weaning acute but transient changes appear in the jejunum and most maturational changes are observed in the ileum. In line with observations of others (Pluske *et al.*, 1997), our results showed a decrease in jejunal villus height during the first 2 d post-weaning and a recovery to preweaning values after 2 wk. Intestinal crypt elongation appeared in both jejunum and ileum during the 14 d post-weaning, which agrees with others (Pluske *et al.*, 1997). Villus atrophy and crypt hyperplasia were responsible for a decreased V:C ratio in both intestinal sites from the day before weaning until the end of the experiment. During the 2 d after weaning, the expression of the tight junction protein Occludin decreased in the jejunum, supporting the idea that the jejunum is subjected to an increase in paracellular permeability (Spreeuwenberg *et al.*, 2001 ; Boudry *et al.*, 2004). Compared to before weaning, pigs in our study showed at 2 d after weaning higher jejunal expressions of the pro-inflammatory cytokines TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-8 and an increase in expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10, suggesting an early immune and inflammatory response to weaning (Pié *et al.*, 2004 ; Hu *et al.*, 2013). This observation was specific for the jejunum, since cytokine expression did not increase in ileal Peyer's patches.



**Table 7.** Effects of oral administration of *Spirulina* and *Chlorella* on intestinal expression of cytokines in piglets 14 d after weaning

Item	Treatment <sup>1</sup>			rSD <sup>2</sup>	P-value <sup>3</sup>
	NC	SP	CV		
Jejunum (mucosa)					
TNF $\alpha$	0.62	0.84	0.84	0.20	0.15
IL-1 $\beta$	0.49 <sup>a</sup>	0.88 <sup>ab</sup>	1.13 <sup>b</sup>	0.38	0.04
IL-8	0.90	1.19	1.01	0.44	0.51
IL-10	0.80	1.04	0.96	0.28	0.35
TGF- $\beta$ 1	0.55	0.67	0.67	0.12	0.17
ZO-1 <sup>4</sup>	0.72	0.73	0.66	0.10	0.44
Occludin	0.48	0.54	0.43	0.12	0.30
Ileum (Peyer's patch)					
TNF $\alpha$	1.03	0.99	1.09	0.15	0.59
IL-1 $\beta$	0.24	0.32	0.22	0.09	0.20
IL-8	1.26 <sup>a</sup>	1.87 <sup>b</sup>	1.05 <sup>a</sup>	0.44	0.02
IL-10	1.17	1.13	1.14	0.34	0.97
TGF- $\beta$ 1 <sup>4</sup>	0.66	0.73	0.75	0.28	0.72
ZO-1	0.97	0.88	1.04	0.17	0.29
Occludin	0.83	0.97	0.97	0.38	0.79

<sup>a,b</sup> Means within a row with different superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup> Treatments: NC = Water; SP = freeze-dried *Spirulina platensis* suspended in water; CV = freeze-dried *Chlorella vulgaris* suspended in water.

<sup>2</sup> rSD = residual standard deviation.

<sup>3</sup> Analysis of variance performed using GLM model (SAS Inst. Inc., Cary, NC) including the treatment as fixed effect.

<sup>4</sup> Inverse transformations were performed on data for ZO-1 at the jejunum and TGF- $\beta$ 1 at the ileum before statistical analysis. Values are presented as means and residual standard deviation of the back-transformed estimated data from the GLM model.

Generally, our results confirm that weaning is responsible for an early local immune response and an alteration in intestinal integrity induced by transient anorexia (McCracken *et al.*, 1999), followed by intestinal adaptation to the new solid diet (King *et al.*, 2003).

***Effects of Spirulina and Chlorella on growth performance and post-weaning diarrhea***

Piglets supplemented with *Spirulina* had a higher BW gain during the suckling period, resulting in increased BW at weaning compared to NC and CV pigs. The level of supplementation with microalgae during the suckling period was low (between 1.7 and 3.5 g per piglet from d-14 to weaning) and, according to calculations from Noblet et Etienne (1989), protein from microalgae supplementation represented less than 5% of the protein intake with milk. Consequently, it is not likely that the beneficial effect of *Spirulina* on growth during the suckling period can be attributed to its nutritional value. Body weight at weaning was greater in piglets receiving *Spirulina*, but the difference between treatments was not maintained from 2 d post-weaning onwards. As for NC pigs, SP pigs regained their theoretical BW (according to the ADG before weaning) at the end of the experiment. Thus, *Spirulina* supplementation resulted in a final BW similar to that observed for the other groups. Despite their higher BW at weaning, SP pigs had a numerically lower feed intake compared with NC and CV pigs, which could explain a lower than expected BW gain after weaning.

The incidence of diarrhea during the first 2 wk post-weaning in SP pigs was almost half of that of CV and NC pigs. To our knowledge, this is the first report of a beneficial effect from *Spirulina* on digestive disorders after weaning in pigs. In our previous study (Furbeyre *et al.*, 2017), spray-dried *Spirulina* (1% in a pelleted diet) did not affect the incidence of diarrhea during the first 2 wk post-weaning, despite an greater jejunal villus height. *Spirulina* is rich in thermosensitive molecules, such as phycocyanin, that have anti-oxidant and anti-



inflammatory properties (Sarada *et al.*, 1999 ; Molina Grima *et al.*, 2003). Because of this, attention was paid in the present study to preserve thermosensitive molecules in *Spirulina* by avoiding thermal treatments (e.g., spray-drying and pelleting). However, *Spirulina* administration did not affect cytokine expression and jejunum morphology in the response to weaning, suggesting that the reduced diarrhea occurrence did not result from a modulation of local inflammation at weaning. In the present study, *Spirulina* supplementation started during lactation, when the intestine is still developing through maternal factors and microbial colonization of the digestive tract (Stokes *et al.*, 2004). Despite that no changes occurred in villus architecture at the jejunum, pigs receiving *Spirulina* had shorter villi in the ileal mucosa and a lower expression of the tight junction protein Occludin in Peyer's patches at the end of the suckling period. Furthermore, villi at the ileum were shorter than in NC pigs at 2 wk post-weaning. The ileal mucosa interacts with commensal bacteria (Hopwood et Hampson, 2003) that shape the development of the mucosa (Syed *et al.*, 1970 ; Sommer et Bäckhed, 2013). A complex microbiota is necessary for the development of villus height and crypt depth (Syed *et al.*, 1970). The effect of *Spirulina* on commensal microbiota is not widely described. However, complex oligo or polysaccharides from algae could be a substrate for growth of specific bacterial colonies in the distal intestine (Michel et Macfarlane, 1996 ; Rasmussen *et al.*, 2009). Weaning disrupts the microbial equilibrium that may contribute to digestive disorders and the occurrence of diarrhea (van Beers-Schreurs *et al.*, 1992 ; Hopwood et Hampson, 2003). Taken together, the modified mucosal architecture in ileum and reduced diarrhea occurrence in pigs receiving *Spirulina* could result from selective growth of commensal microbial colonies with a positive effect on intestinal homeostasis. However, as the effect of *Spirulina* supplementation on commensal microbiota was not measured in our study, this hypothesis remains to be tested.



In pigs supplemented with *Chlorella*, growth performance was unaffected before weaning. After weaning, CV pigs tended to have diarrhea earlier and for a higher proportion of pigs than in NC pigs. However, this trend did not have a negative effect on growth performance after weaning since pigs supplemented with *Chlorella* recovered faster after weaning and attained their potential BW more rapidly than NC and SP pigs. The earlier and increased occurrence of diarrhea in pigs receiving *Chlorella* contradicts with results from our previous study (Furbeyre *et al.*, 2017). As observed in SP pigs, CV pigs had shorter villi than NC pigs at the ileum before weaning, and remained short at 14 d post-weaning. Several authors have described a positive effect of *Chlorella* supplementation on the microbiota and diversity of commensal *Lactobacilli* colonies, which are known to have a positive effect on villus height (Janczyk *et al.*, 2009 ; Kang *et al.*, 2013). The trend of a higher occurrence of diarrhea and reduced ileal villus height are therefore unexpected and difficult to explain. In our study, bead-milling was used to obtain the microalgal biomass to disrupt cells walls and to ensure the release of intracellular molecules from microalgae (Safi *et al.*, 2014b). This process is of particular interest for *Chlorella*, which possesses a rigid cell wall, which is highly resistant to degradation (Safi *et al.*, 2014a). However, the release of intracellular components also results in an increased viscosity (Lee *et al.*, 2012 ; Postma *et al.*, 2015). Viscosity can contribute to loose feces and *E. coli* proliferation in the intestinal tract (McDonald *et al.*, 2001), but viscosity was not measured in the present experiment. We hypothesize that processing may have impacted the physical properties of *Chlorella* with subsequent negative effects on intestinal health that remain to be determined.



***Long term effects of Spirulina and Chlorella on local inflammation and gut integrity in weaned piglets***

Although *Spirulina* and *Chlorella* supplementation did not affect cytokine expression in the early phase after weaning, our results showed a late and differential expression of pro-inflammatory cytokines in pigs receiving microalgae after 2 wk post-weaning. Piglets supplemented with *Spirulina* showed an increase in IL-8 expression in ileal Peyer's patches, without a change in other pro- and anti-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, and TGF- $\beta$ 1. Piglets receiving *Chlorella* had an increased expression of IL-1 $\beta$  at the jejunum, with no effect on other pro- and anti-inflammatory cytokines. However, the mechanisms of these very specific changes are unclear. The synthesis of IL-8, TNF $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  is increased in immune and epithelial cells in response to PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns), including LPS (Agarwal *et al.*, 1995 ; Bosi *et al.*, 2004 ; Abreu *et al.*, 2005). Injury, inflammation, and infection result in a reduction in feed intake and weight loss (Baumann et Gauldie, 1994 ; Dritz *et al.*, 1996 ; Exton, 1997). In our present study, pigs supplemented with *Spirulina* or *Chlorella* did not suffer from diarrhea, low ADG or low ADFI during the last 48 hours before tissue sampling (data not shown). The increase in intestinal expression of IL-8 or IL-1 $\beta$  in pigs supplemented with *Spirulina* or *Chlorella*, respectively, cannot be attributed to an inflammation state or to pathogen infection. *Spirulina* and *Chlorella* contain complex polysaccharides that have the ability to mimic the effects of some bacterial products on the activation of immune and inflammatory responses from intestinal epithelial cells and innate immune cells, without a toxic effect on the host (Pugh *et al.*, 2001 ; Balachandran *et al.*, 2006 ; Hsu *et al.*, 2009 ; Kawanishi *et al.*, 2013). In mice, oral administration of polysaccharides from *Spirulina* induced an increased synthesis of IL-6 and IgA in Peyer's Patches (Balachandran *et al.*, 2006). Thus, the higher expressions of IL-8 and IL-1 $\beta$  in the intestine of pigs supplemented with *Spirulina* and *Chlorella* may result from the stimulation of specific immune responses initiated by specific constituents from the microalgae, such as





polysaccharides. Carbohydrates account for less than 20% of DM (Spolaore *et al.*, 2006 ; Gershwin et Belay, 2007). In our study, pigs received crude microalgae, and it is not possible to identify the constituent(s) implied in the stimulation of the immune system. Some molecules, such as biliproteins in *Spirulina*, also have anti-inflammatory activities (Cherng *et al.*, 2007) that may attenuate the immunostimulatory effects of polysaccharides.

In conclusion, *Spirulina* supplementation during the suckling period increased weaning weight and reduced the occurrence of diarrhea in pigs during the first 2 wk post-weaning. *Spirulina* and *Chlorella* supplementation did not enhance digestive health in weaned pigs through a modulation of early immune responses to weaning stress. However, results from our study do not exclude that both *Spirulina* and *Chlorella* may stimulate late specific responses of the immune system associated to intestinal mucosa. Further studies are necessary to determine whether the modulation of the microbial community in suckling piglets supplemented with *Spirulina* is involved in maintaining digestive health at weaning. Studies with specific components from *Spirulina* and *Chlorella* and under challenged conditions are necessary to determine their implication in the enhancement of digestive defense to pathogen colonization after weaning.



## LITERATURE CITED

- Abreu, M. T., M. Fukata, and M. Arditi. 2005. TLR signaling in the gut in health and disease. *J. Immunol.* 174:4453-4460. doi: 10.4049/jimmunol.174.8.4453
- Agarwal, S., N. Piesco, L. Johns, and A. Riccelli. 1995. Differential expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides from different microbes. *J. Dent. Res.* 74:1057-1065.
- AOAC. 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.
- Balachandran, P., N. D. Pugh, G. Ma, and D. S. Pasco. 2006. Toll-like receptor 2-dependent activation of monocytes by *Spirulina* polysaccharide and its immune enhancing action in mice. *Int. Immunopharmacol.* 6:1808-1814. doi: 10.1016/j.intimp.2006.08.001
- Barton, M. D. 2000. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutr. Res. Rev.* 13:279-299. doi: 10.1079/095442200108729106
- Baumann, H., and J. Gauldie. 1994. The acute phase response. *Immunol. today* 15(2):74-80.
- Bosi, P., L. Casini, A. Finamore, C. Cremokolini, G. Meriardi, P. Trevisi, F. Nobili, and E. Mengheri. 2004. Spray-dried plasma improves growth performance and reduces inflammatory status of weaned pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K881. *J. Anim. Sci.* 82:1764-1772. doi: 10.2527/2004.8261764x
- Boudry, G., V. Peron, I. Le Huerou-Luron, J. P. Lalles, and B. Sève. 2004. Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. *J. Nutr.* 134
- Cherng, S.-C., S.-N. Cheng, A. Tarn, and T.-C. Chou. 2007. Anti-inflammatory activity of c-phycocyanin in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Life Sci.* 81:1431-1435. doi: 10.1016/j.lfs.2007.09.009
- Dritz, S. S., K. Q. Owen, R. D. Goodband, J. L. Nelssen, M. D. Tokach, M. M. Chengappa, and F. Blecha. 1996. Influence of lipopolysaccharide-induced immune challenge and diet complexity on growth performance and acute-phase protein production in segregated early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 74:1620-1628. doi: 10.2527/1996.7471620x
- Exton, M. S. 1997. Infection-induced anorexia: active host defence strategy. *Appetite* 29:369-383.
- Furbeyre, H., J. van Milgen, T. Mener, M. Gloaguen, and E. Labussière. 2017. Effects of dietary supplementation with freshwater microalgae on growth performance, nutrient digestibility and gut health in weaned piglets. *Animal* 11:183-192.



- Gershwin, M. E., and A. Belay. 2007. *Spirulina* in human nutrition and health. CRC Press.
- Hopwood, D., and D. Hampson. 2003. Interactions between the intestinal microflora, diet and diarrhoea, and their influences on piglet health in the immediate post-weaning period. In: J.R. Pluske, J. Le Dividich, M.W.A. Verstegen, editors, Weaning the pig: concepts and consequences. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands. p. 199-217.
- Hsu, H.-Y., N. Jeyashoke, C.-H. Yeh, Y.-J. Song, K.-F. Hua, and L. K. Chao. 2009. Immunostimulatory bioactivity of algal polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa* activates macrophages via Toll-like receptor 4. J. Agric. Food Chem. 58:927-936. doi: 10.1021/jf902952z
- Hu, C., K. Xiao, Z. Luan, and J. Song. 2013. Early weaning increases intestinal permeability, alters expression of cytokine and tight junction proteins, and activates mitogen-activated protein kinases in pigs. J. Anim. Sci. 91:1094-1101. doi: 10.2527/jas.2012-5796
- Huang, C., S. Qiao, D. Li, X. Piao, and J. Ren. 2004. Effects of lactobacilli on the performance, diarrhea incidence, VFA concentration and gastrointestinal microbial flora of weaning pigs. Asian Austral. J. Anim. 17:401-409. doi: 10.5713/ajas.2004.401
- Janczyk, P., B. Halle, and W. B. Souffrant. 2009. Microbial community composition of the crop and ceca contents of laying hens fed diets supplemented with *Chlorella vulgaris*. Poult. Sci. 88:2324-2332. doi: 10.3382/ps.2009-00250
- Kang, H., H. Salim, N. Akter, D. Kim, J. Kim, H. Bang, M. Kim, J. Na, J. Hwangbo, and H. Choi. 2013. Effect of various forms of dietary *Chlorella* supplementation on growth performance, immune characteristics, and intestinal microflora population of broiler chickens. J. Appl. Poultry Res. 22:100-108. doi: 10.3382/japr.2012-00622
- Kawanishi, Y., A. Tominaga, H. Okuyama, S. Fukuoka, T. Taguchi, Y. Kusumoto, T. Yawata, Y. Fujimoto, S. Ono, and K. Shimizu. 2013. Regulatory effects of *Spirulina* complex polysaccharides on growth of murine RSV-M glioma cells through Toll-like receptor 4. Microbiol. Immunol. 57:63-73. doi: 10.1111/1348-0421.12001
- King, M., D. Kelly, P. Morel, and J. Pluske. 2003. Aspects of intestinal immunity in the pig around weaning. In: J.R. Pluske, J. Le Dividich, M.W.A. Verstegen, editors, Weaning the pig: concepts and consequences. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands. p. 219-257.
- Konstantinov, S. R., A. A. Awati, B. A. Williams, B. G. Miller, P. Jones, C. R. Stokes, A. D. Akkermans, H. Smidt, and W. M. De Vos. 2006. Post-natal development of the



- porcine microbiota composition and activities. *Environ. Microbiol.* 8:1191-1199. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01009.x
- Lallès, J., G. Boudry, C. Favier, N. LeFloc'h, I. Luron, L. Montagne, I. P. Oswald, S. Pié, C. Piel, and S. B. 2004. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Anim. Res.* 53:301-316. doi: 10.1051/animres:2004018
- Le Dividich, J., and B. Sève. 2000. Effects of underfeeding during the weaning period on growth metabolism, and hormonal adjustments in the piglet. *Dom. Anim. Endocrinol.* 19:63-74. doi: 10.1016/s0739-7240(00)00067-9
- Le Floc'h, N., C. Jondreville, J. J. Matte, and B. Seve. 2006. Importance of sanitary environment for growth performance and plasma nutrient homeostasis during the post-weaning period in piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 60:23-34. doi: 10.1080/17450390500467810
- Lee, A. K., D. M. Lewis, and P. J. Ashman. 2012. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: processes and specific energy requirements. *Biomass Bioenerg.* 46:89-101. doi: 10.1016/j.biombioe.2012.06.034
- McCracken, B. A., M. E. Spurlock, M. A. Roos, F. A. Zuchermann, and H. R. Gaskins. 1999. Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *J. Nutr.* 129:613-619.
- McDonald, D., D. Pethick, B. Mullan, and D. Hampson. 2001. Increasing viscosity of the intestinal contents alters small intestinal structure and intestinal growth, and stimulates proliferation of enterotoxigenic *Escherichia coli* in newly-weaned pigs. *Brit. J. Nutr.* 86:487-498. Doi: 10.1079/bjn2001416
- Michel, C., and G. Macfarlane. 1996. Digestive fates of soluble polysaccharides from marine macroalgae: involvement of the colonic microflora and physiological consequences for the host. *J. Appl. Bacteriol.* 80:349-369. doi: 10.1111/j.1365-2672.1996.tb03230.x
- Molina Grima, E., E. H. Belarbi, F. G. Ación Fernández, A. Robles Medina, and Y. Chisti. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol. Adv.* 20:491-515. doi: 10.1016/S0734-9750(02)00050-2
- Montagne, L., N. Le Floc'h, M. Arturo-Schaan, R. Foret, M. C. Urdaci, and M. Le Gall. 2012. Comparative effects of level of dietary fiber and sanitary conditions on the growth and health of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 90:2556-2569. doi: 10.2527/jas.2011-4160
- Noblet, J., and M. Etienne. 1989. Estimation of sow milk nutrient output. *J. Anim. Sci.* 67(12):3352-3359.





- Pié, S., J. P. Lallès, F. Blazy, J. Laffitte, B. Sève, and I. P. Oswald. 2004. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *J. Nutr.* 134:641-647.
- Pluske, J. R., D. J. Hampson, and I. H. Williams. 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pigs: a review. *Livest. Prod. Sci.* 51:215-236. doi: 10.1016/s0301-6226(97)00057-2
- Postma, P. R., T. L. Miron, G. Olivieri, M. J. Barbosa, R. H. Wijffels, and M. H. M. Eppink. 2015. Mild disintegration of the green microalgae *Chlorella vulgaris* using bead milling. *Bioresource Technol.* 184:297-304. doi: 10.1016/j.biortech.2014.09.033
- Pugh, N., S. A. Ross, H. N. ElSohly, M. A. ElSohly, and D. S. Pasco. 2001. Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from *Spirulina platensis*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Planta Med.* 67:737-742. doi: 10.1055/s-2001-18358
- Rasmussen, H., I. Martinez, J. Lee, and J. Walter. 2009. Alteration of the gastrointestinal microbiota of mice by edible blue-green algae. *J. Appl. Microbiol.* 107:1108-1118. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04288.x
- Safi, C., B. Zebib, O. Merah, P.-Y. Pontalier, and C. Vaca-Garcia. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 35:265-278. doi: 10.1016/j.rser.2014.04.007
- Sarada, R., M. G. Pillai, and G. A. Ravishankar. 1999. Phycocyanin from *Spirulina sp*: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochem.* 34(8):795-801. doi: 10.1016/S0032-9592(98)00153-8
- Sommer, F., and F. Bäckhed. 2013. The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* 11:227-238. doi: 10.1038/nrmicro2974
- Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, E. Duran, and A. Isambert. 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101:87-96. doi: 10.1263/jbb.101.87
- Spreeuwenberg, M. A. M., J. M. A. J. Verdonk, H. R. Gaskins, and M. W. A. Verstegen. 2001. Small intestine epithelial barrier function is compromised in pigs with low feed intake at weaning. *J. Nutr.* 131:1520-1527.
- Stokes, C. R., M. Bailey, K. Haverson, C. Harris, P. Jones, C. Inman, S. Pié, I. P. Oswald, B. A. Williams, and A. D. Akkermans. 2004. Postnatal development of intestinal immune system in piglets: implications for the process of weaning. *Anim. Res.* 53:325-334. doi: 10.1051/animres:2004020



- Syed, S. A., G. D. Abrams, and R. Freter. 1970. Efficiency of various intestinal bacteria in assuming normal functions of enteric flora after association with germ-free mice. *Infect. Immun.* 2:376-386.
- van Beers-Schreurs, H., L. Vellenga, T. Wensing, and H. Breukink. 1992. The pathogenesis of the post-weaning syndrome in weaned piglets; a review. *Vet. Quart.* 14:29-34. doi: 10.1080/01652176.1992.9694322
- Van Soest, P. v., J. Robertson, and B. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
- Whelan, K., P. Judd, and M. Taylor. 2004. Assessment of fecal output in patients receiving enteral tube feeding: validation of a novel chart. *Eur J Clin Nutr* 58:1030-1037. doi: 10.1038/sj.ejcn.1601927
- Yaakob, Z., E. Ali, A. Zainal, M. Mohamad, and M. S. Takriff. 2014. An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *J. Biol. Res-Thessalon.* 21:6. doi: 10.1186/2241-5793-21-6

Tableau 8 : Effets de la supplémentation en Spiruline et en Chlorelle sur les coefficients de digestibilité de la MS, de l'azote, de l'énergie et de la MM chez le porcelet à 34, 37 et 41 jours d'âge<sup>1</sup>

Item	Traitements expérimentaux <sup>2</sup>			ETR <sup>3</sup>	P-value <sup>4</sup>
	NC	SP	CV		
Coefficients d'utilisation digestive, %					
MS					
34 jours	80.5	79.3	78.2	2.7	0.49
37 jours	78.0	78.3	77.0	2.6	0.55
41 jours	81.1	81.7	80.6	2.2	0.65
Azote					
34 jours	74.2	68.4	69.1	6.3	0.39
37 jours	64.0	67.1	65.6	6.4	0.63
41 jours	73.7	74.2	72.3	6.3	0.83
Energie					
34 jours	79.5	77.8	77.1	3.7	0.65
37 jours	75.4	75.8	74.1	3.9	0.64
41 jours	80.5	80.9	79.9	3.0	0.82
MM					
34 jours	46.8	47.7	41.7	5.2	0.16
37 jours	42.0	42.5	39.4	8.1	0.69
41 jours	46.5	50.0	45.5	7.7	0.50

<sup>1</sup> Les valeurs sont présentées comme les moyennes des moindres carrés.

<sup>2</sup> NC = porcelets témoin négatif recevant une supplémentation en eau ; SP = porcelets recevant 385 mg/kg PV de Spiruline broyée et lyophilisée ; CV = porcelets recevant 385 mg/kg PV de Chlorelle broyée et lyophilisée ; Nombre de porcelets à 34 jours d'âge NC=5, SP=9, CV=6 ; Nombre de porcelets à 37 jours d'âge NC=8, SP=9, CV=9 ; Nombre de porcelets à 41 jours d'âge NC=8, SP=8, CV=8.

<sup>3</sup> ETR = Ecart Type Résiduel

<sup>4</sup> Les données ont été analysées par ANOVA à l'aide d'un modèle MIXED (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), incluant les effets du traitement expérimental et du bloc.

B. Effets d'une supplémentation en Spiruline et en Chlorelle en amont et en aval du sevrage sur la fonction digestive en post-sevrage

**Résumé :** Dans cet essai, neuf porcelets mâles ont été sélectionnés par traitement afin de mesurer la digestibilité fécale par prélèvement ponctuel de fèces à 34, 37 et 41 jours d'âge (Travail expérimental ; Méthodes ; Méthode de collecte partielle). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 8. Les supplémentations en Spiruline et en Chlorelle n'ont pas affecté la digestibilité du régime ( $P>0.10$ ).



## DISCUSSION GENERALE





Les perturbations digestives au sevrage sont le résultat de facteurs multiples, dont le stress oxydant (Zhu *et al.*, 2012), l'inflammation locale (Pié *et al.*, 2004) et la déstabilisation du microbiote digestif (van Beers-Schreurs *et al.*, 1992). La perturbation du système digestif au sevrage altère les fonctions de digestion, d'absorption et de barrière conduisant à l'apparition de diarrhées et au ralentissement de la croissance (Lallès *et al.*, 2004). La suppression des facteurs immunitaires du lait de la mère et le passage de particules alimentaires non digérées dans les sections distales de l'intestin contribuent au développement de bactéries pathogènes dans le tractus digestif, responsables d'infections entériques et de mortalité en post-sevrage (Lallès *et al.*, 2004). Les troubles digestifs en post-sevrage sont un motif d'utilisation d'antibiotiques majeur en élevage porcin (89% des élevages concernés ; Hémonic *et al.*, 2014). L'émergence de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques implique la nécessité de réduire l'utilisation des antibiotiques et de développer de nouvelles stratégies pour promouvoir la santé des animaux d'élevage (Plan Eco Antibio 2017 ; Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt, 2012). La Spiruline et la Chlorelle possèdent des propriétés antioxydantes, immunomodulatrices, antimicrobiennes et prébiotiques, qui ont fait l'objet de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* chez l'homme et le rongeur (Gershwin et Belay, 2007 ; Safi *et al.*, 2014a). L'objectif de ce travail de thèse a été de déterminer les effets d'une supplémentation en Spiruline ou en Chlorelle sur la santé digestive du porcelet au sevrage. Selon notre hypothèse générale, les propriétés de la Spiruline et de la Chlorelle précédemment décrites pourraient limiter les altérations structurelles et fonctionnelles de l'intestin induites par l'inflammation et l'oxydation, en stimulant les mécanismes de défense physique et immunitaire contre le développement des microorganismes pathogènes dans l'intestin. La supplémentation en Spiruline ou en Chlorelle pourrait donc favoriser la croissance et la santé digestive chez le porcelet en post-sevrage.

Les deux premières semaines suivant le sevrage constituent la période critique chez le porcelet, où le risque de troubles digestifs et d'infections est accru. Nous avons donc souhaité déterminer si une supplémentation en Spiruline ou en Chlorelle au cours de ces deux semaines post-sevrage favorisait la fonction et la santé digestive et par quels mécanismes. Deux essais ont été conduits dans des conditions d'hygiène contrastées, permettant de définir les effets d'une supplémentation en microalgues en post-sevrage sur la croissance, la morbidité, la morphologie de la muqueuse intestinale et le statut inflammatoire systémique et local.

La rupture de la paroi cellulaire des microalgues favoriserait la biodisponibilité des constituants intracellulaires (Safi *et al.*, 2015). Si les constituants intracellulaires possèdent un effet sur la santé digestive, la rupture de la paroi cellulaire augmenterait leur capacité d'action

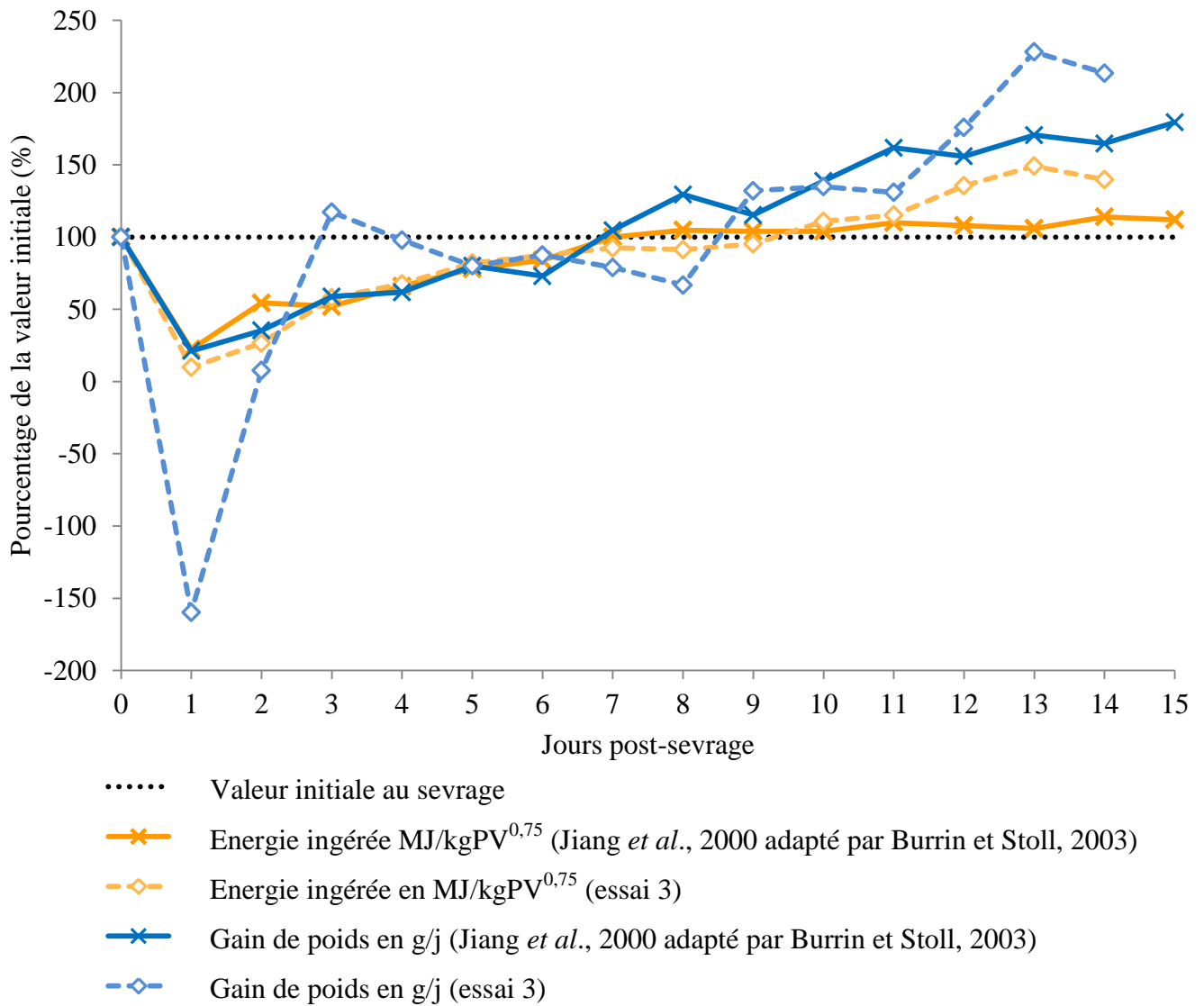


Figure 27 : Evolution de l'énergie ingerée et du gain de poids en post-sevrage, exprimé en pourcentage de la valeur initiale au sevrage. Comparaison des résultats de l'essai 3 chez les animaux « témoin » avec la littérature (Jiang *et al.*, 2000).

sur le système digestif de l'animal. Par ailleurs, il a été montré que les traitements thermiques appliqués lors du séchage de la biomasse algale pouvaient dégrader certains composés thermosensibles d'intérêt pour la santé de l'animal (Sarada *et al.*, 1999). Nous avons donc souhaité déterminer au cours du deuxième essai si le traitement technologique des microalgues modifiait les effets de la supplémentation en microalgues sur la santé digestive du porcelet sevré.

Nous avons également émis l'hypothèse qu'une supplémentation en Spiruline ou en Chlorelle en amont du sevrage permettrait de moduler la réponse inflammatoire et de limiter les altérations majeures de l'architecture intestinale dans la phase précoce suivant le sevrage. Elle réduirait donc le développement de troubles digestifs et le ralentissement de la croissance en post-sevrage. Nous avons donc élaboré un troisième essai afin de vérifier cette hypothèse.

## **I. Modèles expérimentaux**

### **A. Conséquences du sevrage sur la croissance du porcelet, l'architecture de la muqueuse et l'inflammation au niveau intestinal**

Les deux semaines suivant le sevrage ont été divisées en deux phases par Burrin et Stoll (2003). Selon les auteurs, la première semaine post-sevrage correspond à une phase aigüe de réponse, au cours de laquelle l'énergie ingérée et le gain de poids du porcelet sont inférieures aux valeurs observées en fin de lactation. Dans la deuxième semaine, l'animal retrouve une ingestion et une croissance équivalente, puis supérieure aux performances observées avant le sevrage. L'évolution des quantités d'énergie ingérée et du gain de poids des porcelets mesurés dans l'essai 3 était similaire aux niveaux reportés par Burrin et Stoll (2003) et mettent en évidence les phases aigües et adaptatives décrites précédemment (Figure 27). Dans l'essai 3, nous avons mis en relief les conséquences du sevrage sur la fonction et la santé digestive du porcelet durant la phase précoce du sevrage. Nous avons confirmé que le sevrage entraînait une réduction drastique de la hauteur des villosités intestinales dans les deux premiers jours suivant le sevrage (Pluske *et al.*, 1997). En accord avec les observations des précédents auteurs, l'architecture de la muqueuse intestinale était majoritairement altérée au niveau jéjunal (Cera *et al.*, 1988 ; Pluske *et al.*, 1997 ; Boudry *et al.*, 2004 ; Pié *et al.*, 2004). Le raccourcissement des villosités intestinales dans le jéjunum était associé à l'initiation d'une réponse inflammatoire locale, précédemment décrite par Pié *et al.* (2004) et Hu *et al.* (2013) (Figure 28).

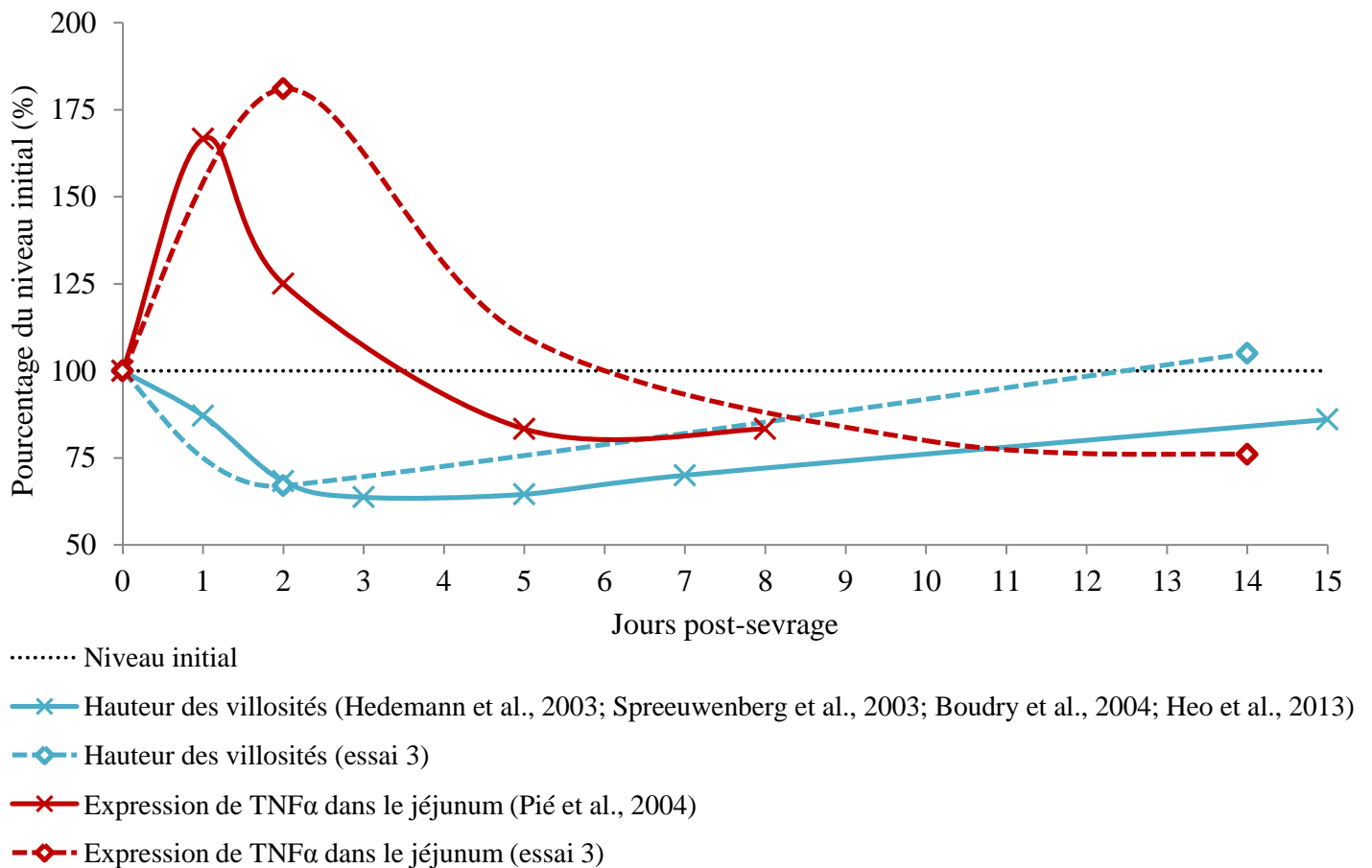


Figure 28 : Evolution de la hauteur des villosités et de l'expression en TNF $\alpha$  dans le jéjunum après le sevrage, exprimé en pourcentage du niveau initial au sevrage. Comparaison entre la littérature et les résultats de l'essai 3 chez les animaux « témoin ».

Il est suggéré que l'anorexie post-sevrage ou l'apport insuffisant de nutriments par l'alimentation contribue à la réduction des villosités dans l'intestin (Pluske *et al.*, 1996 ; McCracken *et al.*, 1999 ; Burrin et Stoll, 2003). Pluske *et al.* (1996) ont montré qu'il existait une corrélation positive entre la quantité d'aliment consommé et la hauteur des villosités intestinales après 5 jours post-sevrage. Dans notre essai, nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre la quantité d'aliment ingérée dans les deux premiers jours post-sevrage et la morphologie intestinale à 30 jours d'âge, bien que les niveaux d'ingestion des animaux aient varié entre les individus de 2 grammes à 199 grammes de MS par jour pendant cette période. Contrairement à Pluske *et al.* (1996), la quantité d'énergie métabolisable ingérée dans les deux jours post-sevrage était inférieure à la quantité d'énergie nécessaire pour l'entretien, pour 35 porcelets sur les 40 étudiés ( $E_m=0,485 \times PV^{0,75}$  MJ ; Pluske *et al.*, 1996). Néanmoins, chez les 5 porcelets dont l'énergie métabolisable ingérée était supérieure à l'énergie nécessaire pour l'entretien pendant les deux premiers jours post-sevrage, la hauteur des villosités mesurée demeurait très variable (243 à 456  $\mu\text{m}$ ). Cette observation est en accord avec les précédentes études de Kelly *et al.* (1991) et Verdonk *et al.* (2007), qui montrent que le raccourcissement des villosités intestinales a lieu dans les trois premiers jours après le sevrage, indépendamment de l'apport nutritionnel. En accord avec la suggestion de Kelly *et al.* (1991), l'altération de la morphologie intestinale dans les deux ou trois premiers jours post-sevrage serait le résultat de mécanismes adaptatifs, indépendants du niveau d'ingestion. L'apoptose des cellules épithéliales intestinales permettrait donc le développement, la différenciation et la migration d'entérocytes adaptés à la digestion de l'aliment solide (Smith, 1985). Cela suggère que l'altération de la muqueuse intestinale lors du sevrage est inévitable, en particulier lorsque les porcelets n'ont pas accès à l'aliment solide sous la mère.

### **B. Effet d'une baisse de la température ambiante sur la croissance et les troubles digestifs en post-sevrage**

Le tableau 22 présente les performances de production et les indicateurs de la santé générale et digestive des porcelets « témoin » sans supplémentation, mesurés au cours des trois essais pendant les deux semaines suivant le sevrage. Les essais ont été conduits à des dates et donc sur des bandes d'animaux distinctes, ce qui induit nécessairement des différences de profils entre les trois essais, indépendamment des conditions expérimentales. Toutefois, nos essais ont tous été réalisés avec des animaux provenant du même croisement ((Large White  $\times$  Landrace)  $\times$  Piétrain), recevant une alimentation similaire (Tableau 15 ; Matériel et

Tableau 22 : Comparaison des performances de croissance et des paramètres de santé entre les animaux affectés au traitement témoin des trois essais

	Essais			
	1	1	2	3
	« croissance »	« digestibilité »		
Période de déroulement de l'essai	Mars 2014	Mars 2014	Juin 2015	Décembre 2015
<b>Animaux exclus de l'expérience</b>				
Administration d'antibiotiques (%)	1	0	2	0
Mortalité (%)	0	0	1	0
<b>Mesures en cours d'expérience</b>				
Nombre de porcelets « témoin »	17	6	13	20
<b>Croissance en post-sevrage (28-42 jours)</b>				
PV initial au sevrage (kg)	9,1 ± 1,3	9,1 ± 1,1	9,6 ± 1,0	8,9 ± 1,7
PV à 42 jours (kg)	12,5 ± 1,8	14,0 ± 1,0	13,6 ± 1,6	12,7 ± 2,5
GMQ (g/j)	240 ± 53	325 ± 60	278 ± 112	271 ± 107
Ingestion (g/j) <sup>1</sup>	360 ± 51	334 ± 46	364 ± 84	346 ± 94
Efficacité alimentaire (GMQ/Ingestion) (g/g) <sup>1</sup>	0,66 ± 0,07	0,91 ± 0,07	0,75 ± 0,17	0,76 ± 0,17
<b>Diarrhées en post-sevrage (28-42 jours)</b>				
Animaux ayant eu un épisode de diarrhée (%)	94	58	85	75
Incidence des diarrhées (%)	35,7	8,0	29,7	35,5
Diarrhées modérées (%)	25,1	5,7	16,5	29,3
Diarrhées sévères (%)	10,6	2,3	10,4	6,2
Diarrhées aqueuses/incolores (%)	0	0	2,8	0
<b>Diarrhées observées en pourcentage des diarrhées totales (%)</b>				
Diarrhées modérées (%)	70	71	55	83
Diarrhées sévères (%)	30	29	35	17
Diarrhées aqueuses/incolores (%)	0	0	9	0
<b>Mesures à l'abattage</b>				
Nombre de porcelets « témoin »		6	8	6
<b>Statut inflammatoire</b>				
Haptoglobine plasmatique (mg/mL)		1,99 ± 1,23	1,66 ± 0,36	1,52 ± 0,82
<b>Morphologie intestinale</b>				
<b>Jéjunum</b>				
Hauteur des villosités (µm)		481 ± 161	336 ± 77	530 ± 39
Profondeur des cryptes (µm)		294 ± 50	284 ± 22	349 ± 18
Ratio V:C		1,63 ± 0,56	1,18 ± 0,23	1,53 ± 0,16
<b>Iléon</b>				
Hauteur des villosités (µm)		415 ± 130	298 ± 51	394 ± 47
Profondeur des cryptes (µm)		299 ± 30	238 ± 16	265 ± 26
Ratio V:C		1,42 ± 0,53	1,25 ± 0,23	1,51 ± 0,27

<sup>1</sup>Ingestion calculée pour un aliment à 87% de MS

Méthodes). Les animaux ont été logés dans le même bâtiment expérimental, à l'exception de l'essai 1 « digestibilité ». Pour cet essai, les animaux étaient logés en animalerie expérimentale dans des cages individuelles avec collecte quotidienne et totale des fèces et urines, à une température ambiante régulée à  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant la durée totale de l'expérience. En conséquence, le niveau d'hygiène dans cet essai était extrêmement élevé. Cette particularité a induit une croissance et une efficacité alimentaire plus élevée que dans les autres essais et une incidence des diarrhées particulièrement faible.

La soumission des animaux à une chute de la température ambiante des salles dans l'essai 1 « croissance » à 32 jours d'âge a induit une large proportion de diarrhées, avec 63 % des porcelets atteints de diarrhée, 24 heures après l'évènement (Figure 29). L'augmentation de l'occurrence des diarrhées dans des conditions de température ambiante fluctuante a déjà été rapportée (Herpin *et al.*, 1987). La chute de la température ambiante favoriserait la déstabilisation du système digestif au travers de mécanismes multiples, complexes mais peu connus (Herpin *et al.*, 1987 ; Le Dividich, 1981). L'exposition à une température ambiante suboptimale entraîne cependant des modifications métaboliques et comportementales qui permettent d'envisager quelques hypothèses. Après le sevrage, le faible niveau de consommation alimentaire contribue à l'établissement d'une balance énergétique négative pendant les quatre à six premiers jours post-sevrage, conduisant à un catabolisme lipidique et protéique en réponse à un apport nutritionnel insuffisant pour subvenir aux besoins d'entretien (Herpin *et al.*, 1987 ; McCracken *et al.*, 1999). Chez le porcelet, le catabolisme protéique au niveau intestinal est principalement responsable de la réduction de la masse et de l'altération de l'intégrité de la muqueuse (Wu, 1998). La réduction de la couverture lipidique, essentiellement dorsale, augmente la sensibilité du porcelet aux fluctuations de la température extérieure. Une température ambiante suboptimale confronte donc les animaux à des conditions thermiques en deçà de leur capacité de régulation (Herpin *et al.*, 1987 ; Le Dividich et Herpin, 1994). Chez l'animal adulte, des mécanismes d'adaptation se mettent en place pour augmenter sa production de chaleur au travers d'une augmentation de l'ingéré et d'une mobilisation des substrats énergétiques via la lipolyse (Herpin *et al.*, 1987 ; Le Dividich et Herpin, 1994). Chez le porcelet, les quantités d'aliment ingérées pendant la première semaine suivant le sevrage sont limitées (Le Dividich et Herpin, 1994 ; Pluske *et al.*, 1997). Une chute de la température ambiante serait donc responsable d'un catabolisme lipidique exacerbé, conduisant à l'augmentation du métabolisme oxydatif ayant, entre autres, des conséquences sur le statut inflammatoire. La réduction de la température ambiante à 32 jours d'âge (quatre jours post-sevrage) augmenterait donc la perturbation de l'homéostasie du



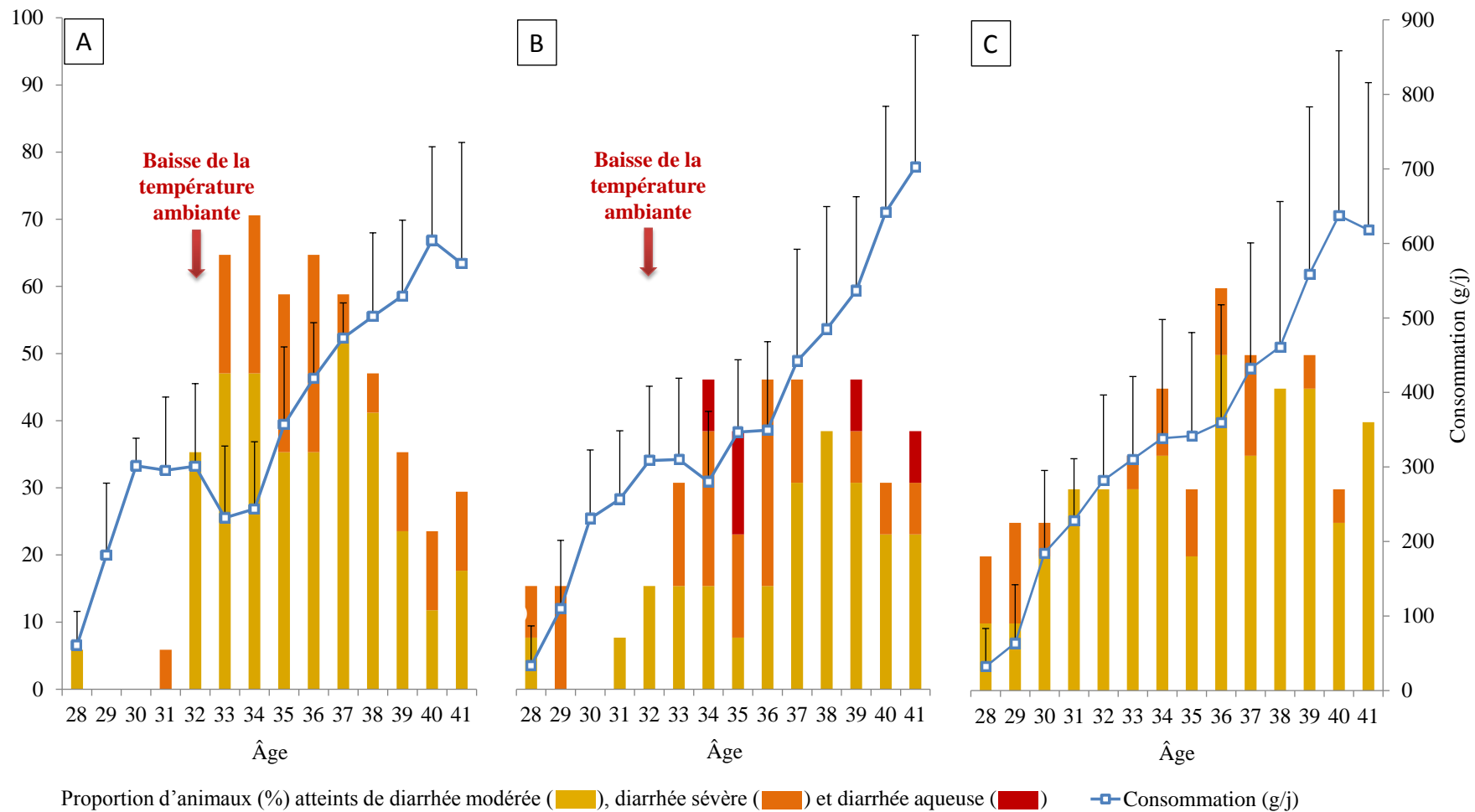


Figure 29 : Evolution de la consommation d'aliment et de la proportion de diarrhées observées après le sevrage chez les animaux du groupe « témoin » au cours de l'essai 1 « croissance » (A ; conditions d'hygiène standard et chute de la température ambiante à 32 jours d'âge), de l'essai 2 (B ; conditions d'hygiène dégradée et chute de la température ambiante à 32 jours d'âge) et 3 (C ; conditions d'hygiène standard et température ambiante maintenue à 28°C).

système digestif causée par le sevrage. En accord avec cette hypothèse, l'ingéré n'était pas augmenté après la chute de la température ambiante dans les essais 1 « croissance » et 2 (Figure 29). Après quatre jours post-sevrage, les porcelets ont donc été incapables de développer un comportement alimentaire adapté à la régulation de leur température corporelle. Dans l'essai 1 « croissance », la chute de la température a entraîné une diminution de l'ingéré 24 heures après la chute de la température ambiante, associée à l'apparition de troubles digestifs (Figure 29). L'application contrôlée d'une baisse de la température ambiante dans l'essai 2 a induit une occurrence des diarrhées plus faible que dans l'essai 1 « croissance » et n'a pas impacté la consommation alimentaire, qui est restée constante au cours des 48 heures suivant le challenge (Figure 29). Les deux essais ont été conduits au cours de saisons différentes (Tableau 22). L'essai 2 a été réalisé en juin, alors que la température extérieure était de 16°C (température minimale de 13°C à 6 heures), ce qui a rendu la réalisation d'une chute contrôlée de la température ambiante difficile (voir figure 20 ; Matériel et Méthodes). Les résultats de l'essai 2 suggèrent que la chute de température était certainement moins intense que dans l'essai 1 « croissance », réalisé dans des conditions climatiques extérieures plus propices à une chute de la température ambiante (température extérieure moyenne de 9°C et température minimale de 1°C à 8 heures). La chute de la température ambiante dans l'essai 1 est survenue consécutivement à une période de stagnation du niveau de consommation alimentaire de 30 à 32 jours d'âge, indépendante de l'apparition de troubles digestifs (Figure 29). Ce comportement de « stase » alimentaire a précédemment été observé par Bruininx *et al.* (2002) chez des porcelets sevrés recevant une alimentation *ad libitum*. Ce comportement apparaît à l'issue de la phase dégénérative en réponse au sevrage (Figures 28 et 29) et pourrait indiquer une maladaptation du système digestif à un apport en nutriments trop élevé. Dans l'essai 2, aucune « stase » de la consommation n'a été observée. Un état de maladaptation aurait pu contribuer à une perturbation accrue des animaux lors de la chute de température dans l'essai 1 « croissance », conduisant à la diminution de l'ingéré et à l'apparition de troubles digestifs chez une majorité d'individus. Néanmoins, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre l'évolution du niveau d'ingéré avant la chute de la température ambiante et l'ingéré et la consistance des fèces suivant le stress thermique.

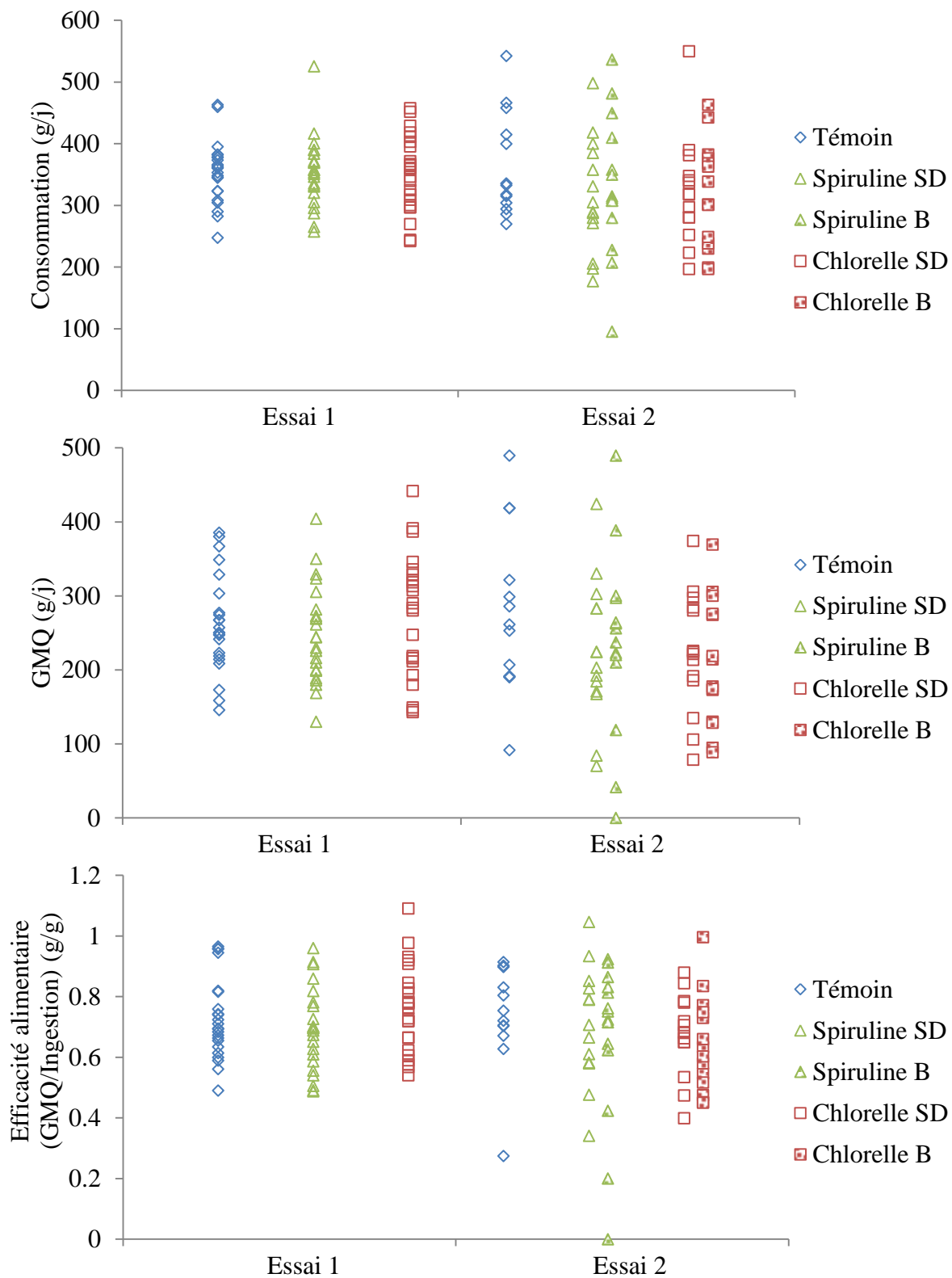


Figure 30 : Consommation, gain moyen quotidien et efficacité alimentaire par individu entre 28 et 42 jours d'âge au cours de l'essai 1 « croissance » et de l'essai 2. Régimes expérimentaux : Témoin = Aliment standard sans supplémentation ; Spiruline SD = Aliment standard + 1% Spiruline spray-dried ; Spiruline B = Aliment standard + 1% Spiruline broyée et lyophilisée ; Chlorelle SD = Aliment standard + 1% Chlorelle spray-dried ; Chlorelle B = Aliment standard + 1% Chlorelle broyée et lyophilisée.

### C. Effet du challenge sanitaire sur la croissance et les troubles digestifs en post-sevrage

Dans l'essai 2, l'application de conditions d'hygiène dégradée en parallèle d'une chute de la température ambiante a induit une occurrence et une incidence globale des troubles digestifs plus faible que dans l'essai 1 « croissance », en conditions d'hygiène standard (Tableau 22). Gaudré *et al.* (2013) ont également reporté des scores fécaux similaires entre des conditions d'hygiène standard et dégradées, suggérant que la dégradation de l'hygiène du logement n'induit pas nécessairement un risque plus élevé de développement de troubles digestifs. Néanmoins, dans l'essai 2, la proportion des troubles digestifs sévères était plus élevée que dans l'essai 1 « croissance ». En outre, 35 % des diarrhées recensées étaient sévères (*vs.* 30 % dans l'essai 1) et 9 % étaient aqueuses et incolores (*vs.* aucune dans l'essai 1). Les performances de croissance étaient cependant similaires à celles mesurées dans l'essai 1 « croissance ». L'utilisation d'un modèle d'hygiène dégradée (essai 2) n'a donc pas induit une réduction de la croissance chez les porcelets sevrés, comme il a été précédemment montré par Le Floc'h *et al.* (2006 ; 2009) et Quesnel *et al.* (2008). En revanche, les performances de croissance présentaient une variabilité individuelle plus élevée dans l'essai 2 que dans l'essai 1 « croissance », pour une variabilité de PV similaire au sevrage (Figure 30). L'application de conditions sanitaires dégradées a donc affecté de manière hétérogène la croissance des porcelets en post-sevrage. Cette variabilité individuelle plus forte en conditions d'hygiène dégradée est cependant peu décrite dans les essais conduits avec ce modèle expérimental (Le Floc'h *et al.*, 2006 ; 2009 ; Montagne *et al.*, 2012). Néanmoins, l'utilisation de conditions sanitaires dégradées chez les auteurs précédemment cités est généralement couplée à une restriction des quantités d'aliment offertes aux porcelets, qui limite l'amplitude des niveaux d'ingestion et donc de la croissance (Figure 31). Par ailleurs, bien que fortement variable, le niveau d'ingestion moyen dans notre essai était également supérieur à celui observé dans des conditions expérimentales similaires, chez des animaux recevant une alimentation *ad libitum* (353 g/j pendant les trois premières semaines post-sevrage ; Le Floc'h *et al.*, 2010). En outre, la consommation alimentaire atteignait jusqu'à plus de 500 grammes par jour chez certains individus au cours des deux semaines après le sevrage. La composition de l'aliment proposé différait fondamentalement de l'aliment utilisé par Le Floc'h *et al.* (2010), dont l'ingrédient principal était du maïs. L'appétence de notre aliment était donc certainement plus élevée, ce qui a également favorisé la disparité des niveaux d'ingestion et donc de la croissance entre les individus « sains » et les individus souffrant d'inflammation aigüe ou de troubles digestifs.

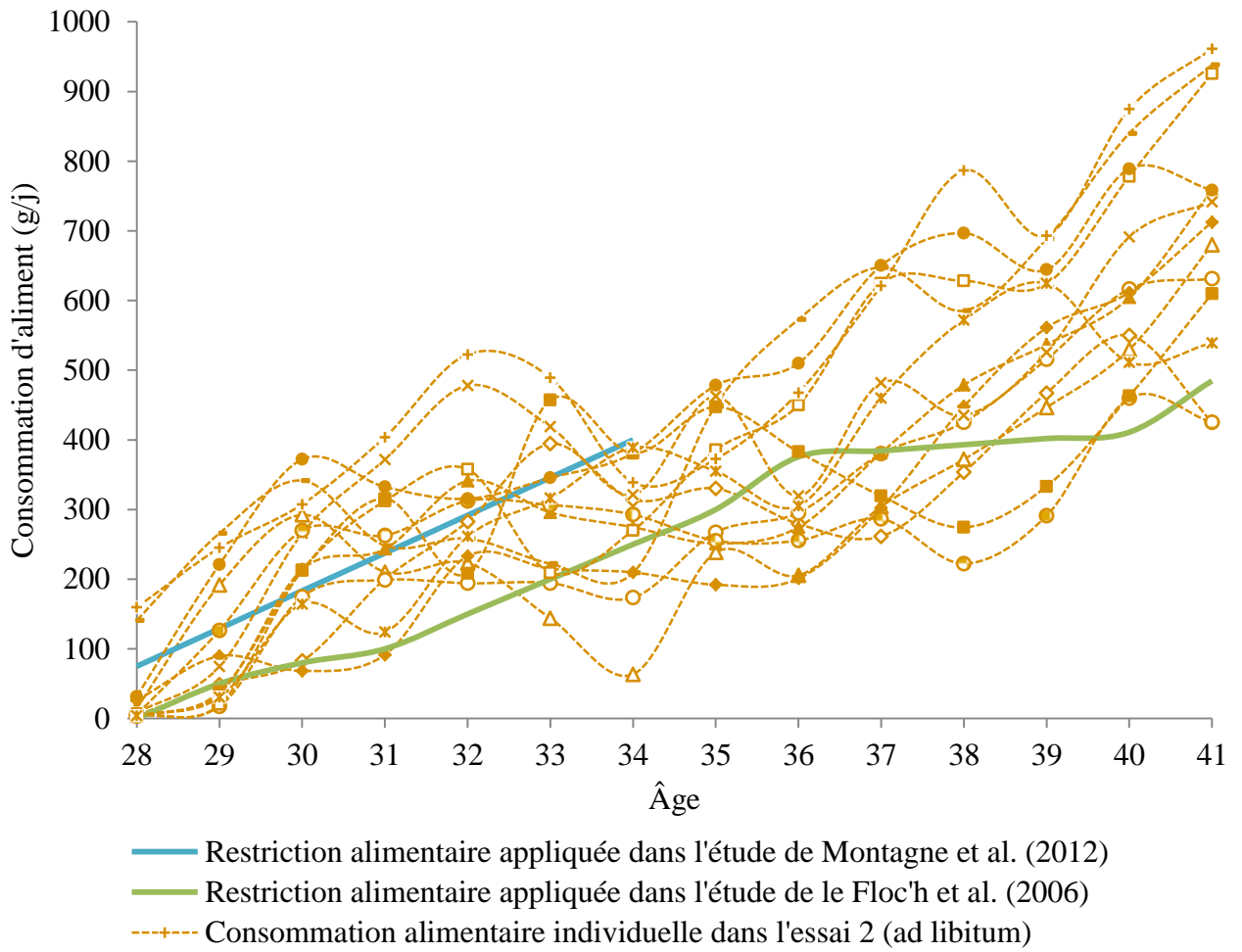


Figure 31 : Consommation alimentaire individuelle des porcelets du groupe « témoin » au cours des deux semaines post-sevrage dans l'essai 2, comparée aux restrictions alimentaires appliquées chez des porcelets conduits dans les mêmes installations en conditions d'hygiène dégradée (Le Floc'h *et al.*, 2006 ; Montagne *et al.*, 2012)

Les résultats obtenus au cours des trois essais montrent que la concentration en haptoglobine chez le porcelet sevré n'était généralement pas impactée par les conditions expérimentales utilisées. L'haptoglobine étant une protéine plasmatique synthétisée en réponse à un stimulus inflammatoire, elle constitue un indicateur pertinent des états infectieux ou de blessure chez l'animal (Le Flo'h *et al.*, 2006). Notre choix s'est porté sur ce paramètre en tant qu'indicateur de l'état inflammatoire général du porcelet sevré. De manière inattendue, la concentration plasmatique en haptoglobine n'était pas plus élevée en conditions sanitaires dégradées en comparaison avec des conditions d'hygiène standard (vide sanitaire avant l'entrée des animaux et raclage quotidien des déjections). Contrairement aux descriptions de Le Flo'h *et al.* (2006) et Pastorelli *et al.* (2012) les niveaux d'haptoglobine mesurés dans l'essai 2 suggèrent que les animaux élevés en conditions d'hygiène dégradée dans notre essai 2 ne souffraient pas d'un état inflammatoire systémique. Cette observation justifie, au moins pour partie, que la croissance et l'efficacité alimentaire dans cet essai n'étaient globalement pas altérées par un coût nutritionnel associé à une plus forte stimulation du système immunitaire. Cependant, les animaux élevés dans des conditions sanitaires défavorables présentaient des villosités réduites en fin d'expérience, ce qui suggère un temps de récupération des fonctions intestinales après le sevrage (digestion, absorption, barrière, immunité) plus long chez ces animaux (Pastorelli *et al.*, 2012). Cette altération de l'architecture intestinale pourrait résulter de la prolifération de microorganismes pathogènes ou de toxines et de la réponse inflammatoire locale associée, endommageant les cellules et l'intégrité de la muqueuse intestinale (Klasing et Johnstone, 1991 ; Sears et Kaper, 1996 ; Pastorelli *et al.*, 2012). Par ailleurs, six animaux ont présenté des signes de la maladie de l'œdème dans l'essai 2 et ont été exclus du dispositif expérimental. La maladie de l'œdème est causée par le passage de toxines produites par certaines souches *E. coli* pathogènes dans la circulation sanguine (Nabuurs *et al.*, 2001). Nabuurs *et al.* (2001) ont mis en évidence que le développement de la maladie de l'œdème était associée à une acidose intestinale, reconnue pour favoriser l'hyperperméabilité de la muqueuse intestinale. Dans notre essai, la perméabilité intestinale a été évaluée en chambre d'Ussing en fin d'expérience, sur des animaux majoritairement indemnes de diarrhée sévère (deux porcelets en diarrhée sévère lors de l'abattage). Néanmoins, les flux paracellulaires et transcellulaires mesurés au niveau jéjunal présentaient des niveaux hétérogènes entre les individus, indépendamment du bloc et du traitement expérimental (Figure 32). La fonction de barrière intestinale semble donc affectée de manière très variable entre les individus après deux semaines post-sevrage. Par ailleurs, aucune corrélation n'a été observée entre la consistance des fèces avant l'abattage et les flux

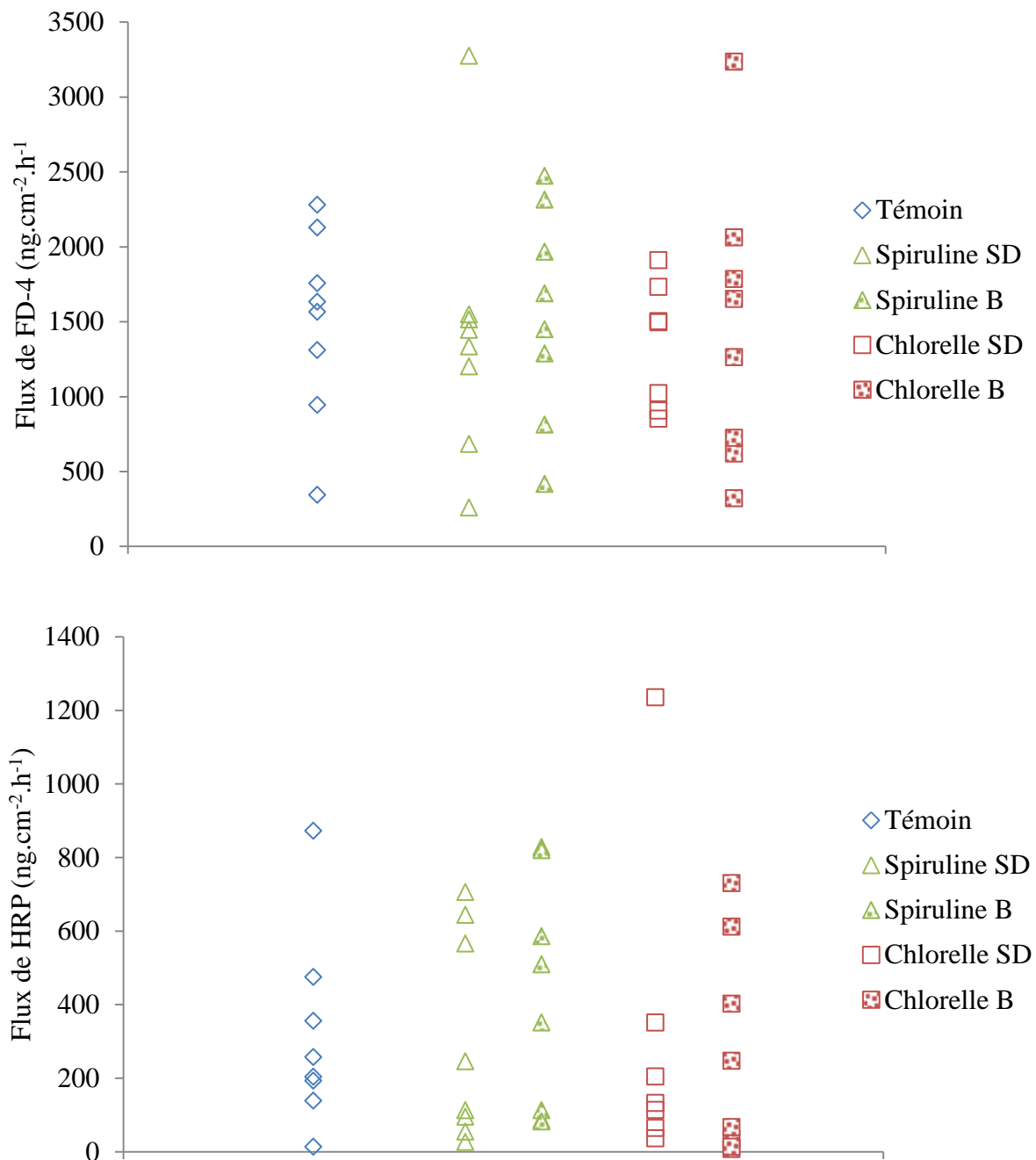


Figure 32 : Flux de FD4 et de HRP mesurés par la méthode des chambres d'Ussing au niveau de la muqueuse jéjunale de porcelets âgés de 42 jours. Régimes expérimentaux : Témoin = Aliment standard sans supplémentation ; Spiruline SD = Aliment standard + 1% Spiruline spray-dried ; Spiruline B = Aliment standard + 1% Spiruline broyée et lyophilisée ; Chlorelle SD = Aliment standard + 1% Chlorelle spray-dried ; Chlorelle B = Aliment standard + 1% Chlorelle broyée et lyophilisée.

paracellulaires et transcellulaires. Finalement, les conditions d'hygiène dégradée dans notre essai 2 ont donc altéré la structure de l'intestin et la fonction de barrière indépendamment de la portée d'origine et du développement de troubles digestifs. Cette dégradation de l'intégrité de la muqueuse intestinale en conditions d'hygiène dégradée pourrait être responsable du développement sporadique d'infections entériques (Wijtten *et al.*, 2011). En tenant compte à la fois des indicateurs de la santé digestive et des performances de croissance, l'application de conditions d'hygiène dégradées dans notre essai a exacerbé l'amplitude des réponses individuelles à une « pression environnementale » plus élevée. Néanmoins, les résultats obtenus dans notre essai ne nous permettent pas de caractériser clairement cette « pression ». La variabilité individuelle rencontrée dans notre essai montre également l'une des limites du modèle d'hygiène dégradée. Dans nos essais, les animaux étaient élevés en cages individuelles munies de parois transparentes pleines, ne permettant pas le contact des animaux entre eux. En conditions de logement individuel, l'absence de nettoyage implique que chaque animal est exposé à un microenvironnement unique et non répétable, dépendant de l'historique de la cage à laquelle il a été affecté (état sanitaire de l'animal précédent et microbisme). En conséquence, il est difficile de définir les profils sanitaires des animaux et les causes associées. L'utilisation de plusieurs groupes « contrôle » avec antibiotiques et/ou logés en conditions d'hygiène élevée constituerait un levier pour décrire avec plus de précision l'implication des pathogènes dans les troubles digestifs observés. Par ailleurs, standardiser le modèle de manière globale est irréalisable, mais il semble nécessaire de mettre en place des moyens de standardisation du modèle d'hygiène dégradée à l'échelle de l'expérience afin de limiter la variabilité incontrôlée induite par le modèle d'hygiène dégradée associée au développement de microenvironnements.

#### **D. Comparaison des performances de croissance entre les essais**

Nos résultats montrent que quel que soit le modèle utilisé, y compris en l'absence de challenge thermique ou sanitaire (essai 3), les occurrences et les incidences des diarrhées étaient élevées en comparaison à celles reportées dans les mêmes installations expérimentales et dans les mêmes conditions sanitaires (Montagne *et al.*, 2012 ; Pastorelli *et al.*, 2012). L'alimentation à volonté au cours des deux premières semaines post-sevrage favorise l'apparition de diarrhée (Ball et Aherne, 1987). Dans nos essais, aucune restriction alimentaire n'a été appliquée pendant les deux semaines suivant le sevrage, contrairement à d'autres essais précédemment cités (Le Floc'h *et al.*, 2009 ; Montagne *et al.*, 2012), ce qui explique les



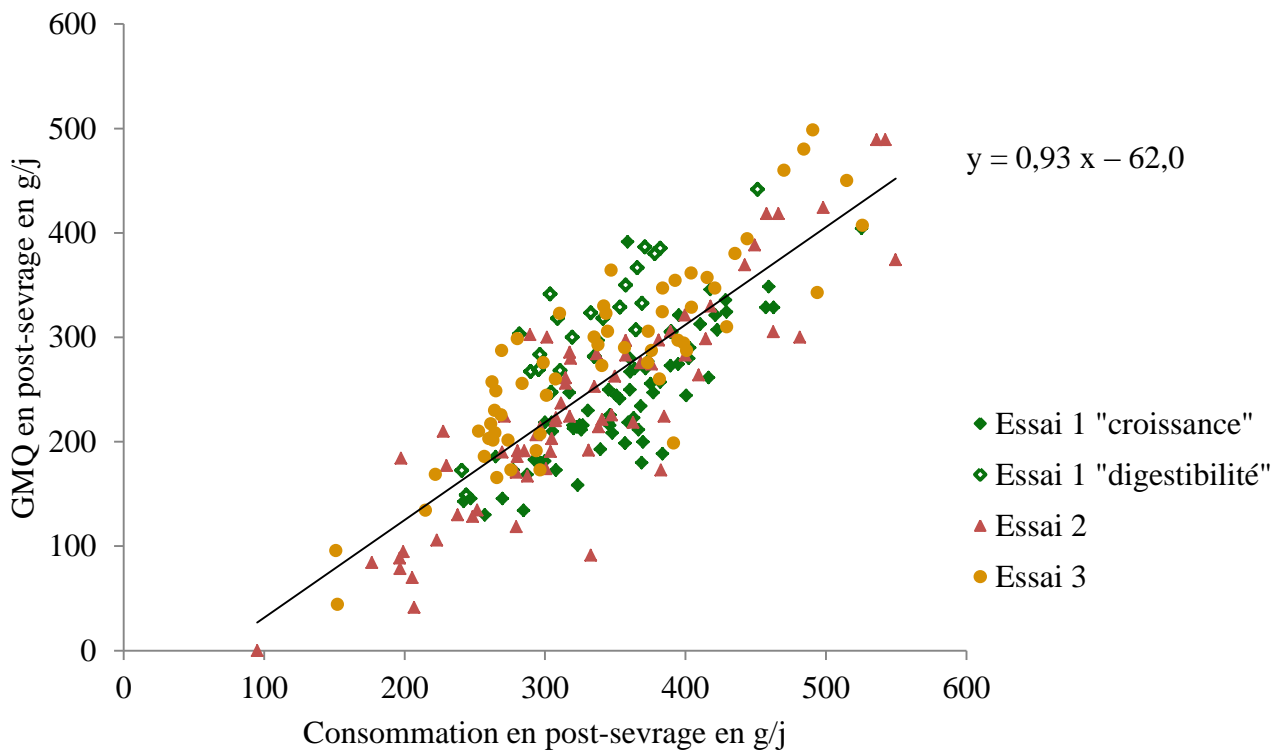


Figure 33 : Relation entre la consommation et le GMQ par individu en post-sevrage (28-42 jours) au cours des essais 1 « croissance », 1 « digestibilité », 2 et 3. La corrélation entre la consommation et le GMQ en post-sevrage a été analysée à l'aide de la procédure GLM de SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Les contributions des essais et des traitements expérimentaux étaient non significatives ( $P > 0,10$ ).

incidences de diarrhée élevées dans nos essais. Ball et Aherne (1987) ont mis en évidence une corrélation négative entre l'incidence des diarrhées et la digestibilité des nutriments. Pour l'ensemble de nos essais, l'incidence des diarrhées à l'échelle de l'individu n'avait pas d'impact sur l'efficacité alimentaire et sur la croissance des animaux. En outre, quel que soit le contexte expérimental et l'incidence des diarrhées, la croissance des animaux recensée durant nos essais était supérieure à celle observée par d'autres auteurs, dans des conditions d'élevage similaires (Bikker *et al.*, 2006 ; Montagne *et al.*, 2012). Cela suggère que les troubles digestifs n'ont pas ou peu impacté la croissance des animaux, y compris lorsque les animaux ont souffert d'un épisode de diarrhée sévère. En particulier, quel que soit l'essai ou le traitement expérimental, la croissance des animaux était fortement corrélée à leur niveau d'ingestion (Figure 33). Cette particularité s'explique par le fait que l'aliment offert aux animaux au cours des deux semaines post-sevrage était de qualité nutritionnelle supérieure à l'aliment proposé dans l'étude de Ball et Aherne (1987). En conséquence, bien que la fonction digestive soit perturbée en réponse au sevrage, ce qui se caractérise par l'apparition de troubles digestifs (Figures 34 et 35), cette perturbation ne s'est pas traduite par une altération des performances de croissance. Par conséquent, la croissance et l'efficacité alimentaire ne donnent qu'une indication partielle de la fonction et de la santé digestive dans notre étude. L'utilisation d'un régime moins digestible permettrait de mettre en évidence la relation existante entre la perte de fonction digestive et le ralentissement de la croissance, généralement observée en post-sevrage commercial (Madec *et al.*, 1998).

## **II. Effets de la supplémentation en Spiruline et en Chlorelle sur la croissance et la santé digestive du porcelet au sevrage**

La Spiruline et la Chlorelle font l'objet d'un intérêt prononcé dans le domaine de la santé humaine pour leurs propriétés fonctionnelles diverses. Comme nous l'avons décrit précédemment dans la revue bibliographique, la Spiruline et la Chlorelle sont composées de polysaccharides complexes capables de stimuler des réponses immunitaires spécifiques au niveau cellulaire (Pugh *et al.*, 2001). Cette stimulation spécifique du système immunitaire a montré des effets positifs chez le rongeur sur sa capacité de défense contre les infections bactériennes (Hasegawa *et al.*, 1989). Elles sont également largement référencées pour leur capacité antioxydante, pouvant limiter l'exposition des cellules aux radicaux libres et l'inflammation associée (Romay *et al.*, 2001 ; Kitada *et al.*, 2009). Elles pourraient donc

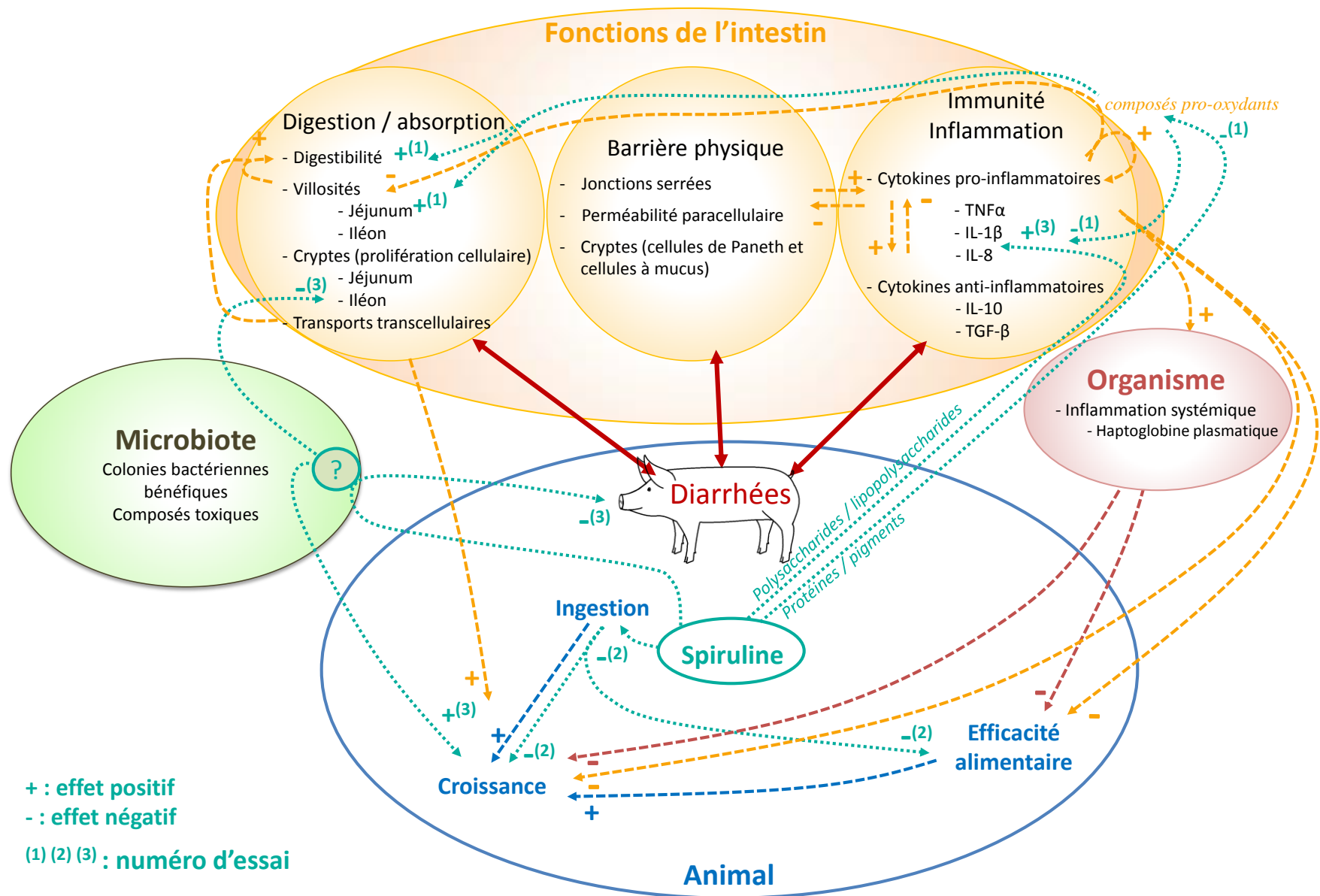


Figure 34 : Effets de la Spiruline sur les paramètres de fonction et de santé digestive mesurés au cours des trois essais et hypothèses associées (flèches en pointillés). Les interactions positives ou négatives des paramètres entre eux sont représentées par les flèches en tirets.

favoriser la protection des cellules et des tissus contre les dommages causés par l'oxydation et l'inflammation. Elles possèdent également des composés indigestibles qui pourraient constituer un substrat pour la croissance de colonies microbiennes spécifiques, dont le bénéfice pour la santé digestive de l'hôte est peu référencé (Rasmussen *et al.*, 2009). L'ensemble de ces activités bénéfiques pour la santé de l'hôte confèrent à la Spiruline et à la Chlorelle un potentiel pour favoriser la santé digestive du porcelet au sevrage.

### **A. Effets d'une supplémentation en Spiruline et en Chlorelle en post-sevrage sur la croissance et la santé digestive du porcelet**

Dans le cadre de notre travail, les essais 1 et 2 ont été construits afin d'évaluer l'effet d'une supplémentation en Spiruline et en Chlorelle sur la croissance, la fonction digestive et les paramètres de santé du porcelet sevré dans des conditions sanitaires contrastées. Nous avons défini un niveau de supplémentation en microalgues de 1 % dans l'aliment premier âge. Ce niveau a été sélectionné afin de limiter l'impact de la supplémentation en microalgues sur la valeur nutritionnelle de l'aliment et sur le risque associé à la biodisponibilité incertaine des constituants intracellulaires des microalgues, qui pourrait affecter leur utilisation digestive par l'animal (Janczyk, 2006). L'objectif de ces deux essais était de définir si **une supplémentation en Spiruline ou en Chlorelle en post-sevrage favoriserait la fonction et la santé digestive du porcelet**. Nous avons émis l'hypothèse que la supplémentation en microalgues pourrait présenter un bénéfice pour la santé digestive du porcelet en limitant l'altération de la structure de l'intestin et par conséquent sa fonction de digestion et d'absorption, en modulant l'inflammation et les mécanismes de défense (physique et immunitaire) en faveur de la tolérance envers les populations microbiennes commensales et de la lutte contre le développement des bactéries pathogènes. Dans nos deux expérimentations « croissance » et « digestibilité » de l'essai 1, nous avons mis en évidence que la supplémentation en microalgues augmentait la hauteur des villosités jéjunales et était associée à une augmentation de la digestibilité fécale des nutriments. Nous avons également observé une réduction de l'incidence des diarrhées chez les animaux supplémentés en Chlorelle. Nous avons suggéré que la supplémentation en microalgues pourrait avoir impacté positivement la structure de l'intestin en limitant l'altération des cellules intestinales par l'oxydation (Zhu *et al.*, 2012) et l'inflammation locale (Pié *et al.*, 2004) consécutives au stress du sevrage (Figures 34 et 35). En accord avec cette hypothèse, les animaux supplémentés en microalgues possédaient une expression relative en IL-8 dans le jéjunum à 42 jours d'âge diminuée, en

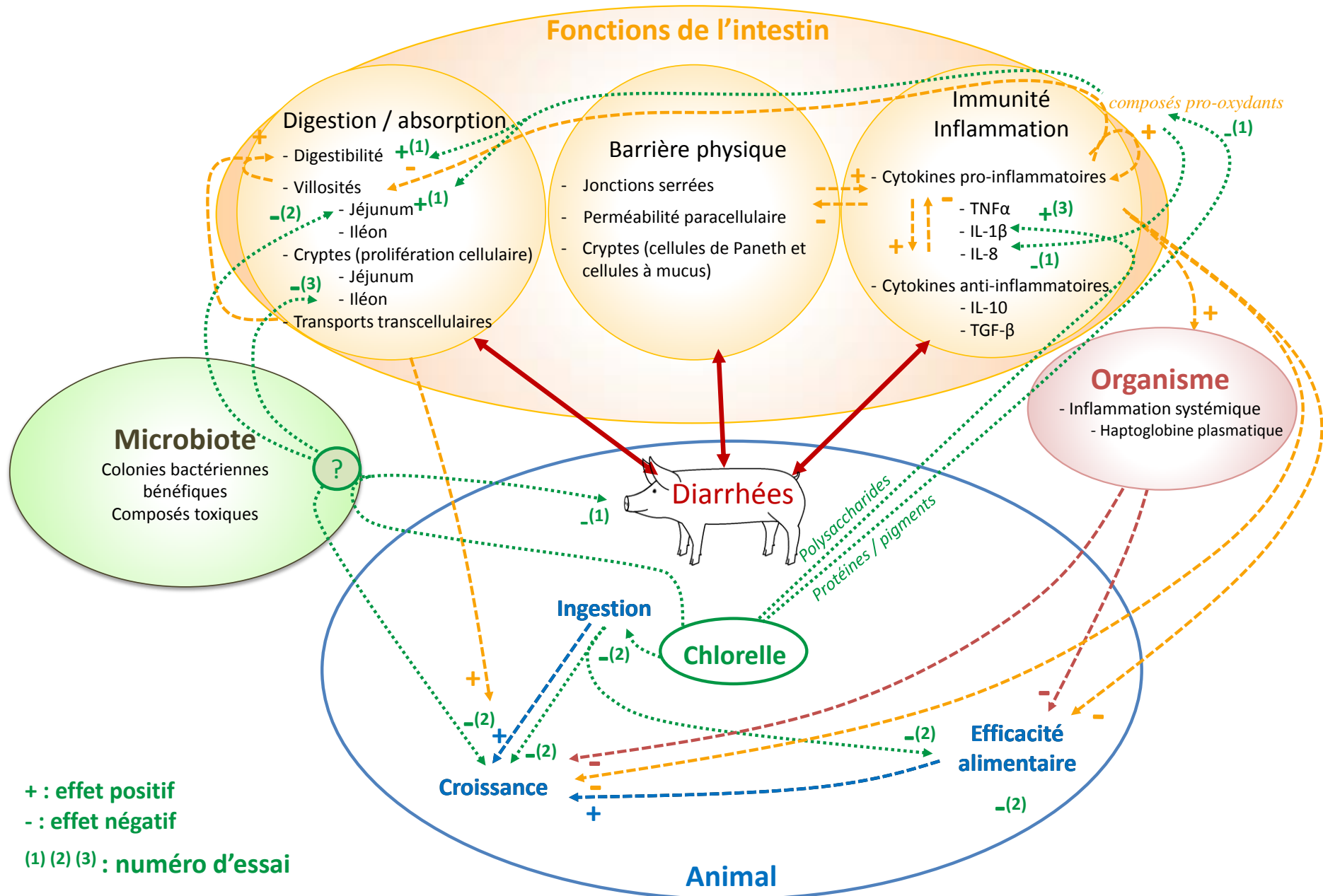


Figure 35 : Effets de la Chlorelle sur les paramètres de fonction et de santé digestive mesurés au cours des trois essais et hypothèses associées (flèches en pointillés). Les interactions positives ou négatives des paramètres entre eux sont représentées par les flèches en tirets.

comparaison avec les animaux des groupes « témoin » supplémentés ou non en antibiotiques. Néanmoins, l'effet de la supplémentation en Spiruline et en Chlorelle sur l'expression en IL-8, sur la morphologie intestinale et sur la digestibilité des nutriments, ont été observés chez des animaux ayant présenté une incidence des troubles digestifs extrêmement faible (essai « digestibilité »). Par conséquent, les différences observées entre les groupes « témoin » et les groupes supplémentés en microalgues étaient superficielles et n'étaient que peu représentatives du bénéfice d'une supplémentation en Spiruline ou en Chlorelle dans un contexte de santé digestive compromise. Dans l'essai 2, nous avons émis l'hypothèse que les effets bénéfiques des microalgues sur la fonction et la santé digestive observés dans l'essai 1 pourraient être plus prononcés chez des animaux exposés à un environnement défavorable à la croissance et à la santé digestive. L'essai 2 nous a permis d'étudier l'effet de la supplémentation en microalgues dans un contexte d'apparition de troubles digestifs sévères et d'altération de l'architecture intestinale, que nous avons décrit précédemment. Contrairement aux résultats obtenus dans l'essai 1, la supplémentation en microalgues en conditions sanitaires dégradées n'a pas affecté positivement la croissance et la santé digestive du porcelet sevré. A l'inverse, la supplémentation en Spiruline et en Chlorelle a entraîné une réduction de l'ingéré et de l'efficacité alimentaire, ce qui a altéré les performances de croissance (Figures 34 et 35). La diminution de la consommation alimentaire chez les animaux supplémentés en microalgues semble indiquer une réduction de l'appétence des régimes expérimentaux contenant des microalgues. Chez les animaux supplémentés en Spiruline, la réduction de la croissance est similaire à la réduction de l'ingéré, ce qui suggère que l'altération des performances de croissance chez ces animaux est expliqué principalement par le niveau d'ingéré. Chez les animaux supplémentés en Chlorelle, cependant, la croissance était altérée en proportion plus large que l'ingestion. En parallèle, la supplémentation en Chlorelle a favorisé l'altération de la muqueuse jéjunale, au travers de mécanismes qui sont peu clairs. Comme nous l'avons montré dans la revue bibliographique, les microalgues possèdent des polysaccharides complexes capables d'initier des réponses immunitaires spécifiques en s'attachant aux TLR à la surface des cellules (Pugh *et al.*, 2001). Une stimulation des réponses immunitaires pourrait donc avoir exacerbé la production de composés toxiques pour les tissus en stimulant l'inflammation et l'oxydation, favorisant l'altération de la structure de l'intestin chez les porcelets supplémentés en Chlorelle. Par ailleurs, l'activation des réponses immunitaires a un coût nutritionnel et peut avoir des conséquences négatives sur la croissance des animaux (Lochmiller et Deerenberg, 2000), en particulier dans une situation de croissance compromise, comme c'est le cas durant les premières semaines suivant le sevrage. En



conséquence, une sur-stimulation des réponses immunitaires chez les animaux supplémentés en Chlorelle pourrait expliquer la faible croissance des animaux en conditions d'hygiène défavorables. Dans cet essai, nous n'avons pas mis en évidence de modification de l'expression en cytokines pro-inflammatoires en fin d'expérience chez les animaux supplémentés en microalgues. Cependant, cela n'exclut pas que la supplémentation en Chlorelle pourrait avoir exacerbé ou prolongé la réponse inflammatoire, précédemment décrite par Pié *et al.* (2004) dans la phase précoce de réponse au sevrage, retardant la restauration de l'architecture intestinale.

Nous avons également mis en évidence dans l'essai 1 « digestibilité » une modification substantielle des produits de la fermentation microbienne dans le caecum, suggérant une augmentation des fermentations protéolytiques. Les composés indigestibles des régimes supplémentés en microalgues pourraient échapper à la digestion ou à l'absorption par l'animal et favoriser le développement de bactéries protéolytiques dans de caecum et le gros intestin (Williams *et al.*, 2001). Les fermentations protéolytiques induisent la formation de métabolites potentiellement toxiques pour l'hôte, conduisant à la perturbation du turnover cellulaire dans l'intestin, à une réduction de la croissance et au développement de diarrhée (Williams *et al.*, 2001 ; Htoo *et al.*, 2007). La dégradation de l'hygiène du logement a été décrite comme favorable au développement de bactéries potentiellement pathogènes (Pastorelli *et al.*, 2012). Une orientation du microbiote vers la production de métabolites toxiques pourrait donc contribuer à exacerber la perturbation du système digestif au sevrage. Cette hypothèse ne peut cependant être confirmée par nos résultats car les populations microbiennes commensales n'ont pas été analysées dans l'essai 2. Afin de mieux comprendre les mécanismes associés à nos observations, il serait donc nécessaire de définir l'impact de la supplémentation en microalgues sur le microbiote digestif dans des conditions d'élevage défavorables à la santé digestive.

La Spiruline, tout comme la Chlorelle, possède des propriétés immunostimulantes et a également montré un effet positif sur les fermentations protéolytiques dans le caecum. Le fait que les animaux supplémentés en Spiruline n'aient pas montré d'altération de la morphologie intestinale et de la croissance au même titre que les animaux supplémentés en Chlorelle suggèrent que la Spiruline et la Chlorelle présentent des effets très différents sur le système digestif du porcelet. Une hypothèse est que les mécanismes en faveur de la production de molécules pro-oxydantes et/ou la modification du microbiote en faveur de la production de toxines soient compensés par une teneur en molécules anti-oxydantes et anti-inflammatoires plus élevée chez la Spiruline.





Globalement, les résultats obtenus au cours de ces deux essais montrent que la supplémentation en microalgues en post-sevrage présente un bénéfice sur la fonction et la santé digestive, uniquement lorsque les conditions sanitaires d'élevage limitent le développement de pathologies digestives sévères et potentiellement d'origine pathogène. Au regard de ces observations, il convient de souligner que les mécanismes d'action des molécules microalgales sur le système digestif du porcelet sevré varient selon le mode d'élevage et le statut sanitaire. Cela suggère que la promotion de la santé digestive au travers d'une supplémentation en microalgues n'est pas effective dans tous types de contexte. Bien que nous ayons souligné la variabilité associée au modèle hygiène dégradée, celui-ci est considéré comme se rapprochant des conditions d'élevage réelles, dont les élevages expérimentaux sont souvent éloignés (De Lange *et al.*, 2010). Nos résultats justifient donc l'utilisation de ce modèle pour caractériser les effets d'ingrédients fonctionnels sur la santé des animaux d'élevage. Il est cependant nécessaire de multiplier le nombre d'indicateurs de la santé digestive et systémique (marqueurs de l'immunité, microbiote digestif) à la fois en termes de diversité mais également sur le plan temporel. La mesure d'indicateurs de la santé digestive en point final (à 42 jours d'âge) n'est certainement pas suffisante pour caractériser les mécanismes associés à la supplémentation en microalgues et leurs conséquences sur la santé du porcelet sevré.

## **B. Effet du traitement technologique des microalgues sur la santé digestive du porcelet sevré**

Dans ce travail de thèse, nous avons souhaité définir l'impact d'un traitement technologique de la biomasse microalgale sur leur potentiel d'action sur la santé digestive du porcelet sevré. Nous avons en effet montré dans la revue bibliographique que la *Chlorelle* possédait une paroi rigide et difficilement dégradable, pouvant limiter la biodisponibilité des constituants intracellulaires (Janczyk, 2006 ; Safi *et al.*, 2014a). La rupture de la paroi cellulaire des microalgues favoriserait donc la biodisponibilité des constituants intracellulaires et donc leur action sur le système digestif de l'animal (Safi *et al.*, 2015). Par ailleurs, les microalgues contiennent des molécules thermosensibles pouvant être altérées par les méthodes de séchage standard (Sarada *et al.*, 1999 ; Molina Grima *et al.*, 2003). La réduction des traitements thermiques limiteraient donc la dégradation de composés d'intérêt pour la santé de l'animal. Dans l'essai 2, nous avons choisi de comparer deux procédés technologiques : le séchage spray-dry et le broyage à billes de la biomasse microalgale fraîche suivi d'une lyophilisation.



L'application d'un traitement technologique augmentant théoriquement la biodisponibilité des composés d'origine microalgale a révélé un effet positif sur la hauteur des villosités et la profondeur des cryptes jéjunales chez le porcelet en comparaison avec une biomasse standard (spray-dry). Le traitement technologique de broyage et de lyophilisation pourrait avoir augmenté la teneur et la biodisponibilité en molécules anti-oxydantes et anti-inflammatoires thermosensibles, en particulier pour la Spiruline, qui possède une forte teneur en phycocyanine (Sarada *et al.*, 1999 ; Leung *et al.*, 2013). L'augmentation du potentiel anti-oxydant et anti-inflammatoire pourrait favoriser la protection des cellules de la muqueuse intestinale. Néanmoins, l'amélioration de la structure de la muqueuse jéjunale chez les animaux supplémentés en Spiruline ou en Chlorelle préalablement broyées et lyophilisées était sans conséquence sur la croissance, l'efficacité alimentaire et l'incidence des diarrhées en post-sevrage.

Bien que le traitement technologique des microalgues n'ait montré qu'un effet mineur sur la morphologie intestinale du porcelet sevré, il est concevable, au vu des résultats des essais 1 et 3, que le traitement technologique des microalgues modifie les interactions entre les microalgues et le système digestif. En l'occurrence, nous avons pu montrer qu'une supplémentation en Chlorelle spray-dry était responsable d'une réduction de l'incidence des diarrhées en post-sevrage (essai 1), tandis qu'une supplémentation en Chlorelle broyée et lyophilisée augmentait la probabilité de développement de diarrhée en post-sevrage (essai 3). Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par le traitement technologique appliqué aux microalgues. Comme nous l'avons décrit dans la publication 3 (Chapitre 3), la rupture de la paroi de la Chlorelle conduit à la libération des constituants intracellulaires et à l'augmentation de la viscosité du produit (Lee *et al.*, 2012 ; Postma *et al.*, 2015). Par conséquent, cette augmentation de la viscosité pourrait avoir favorisé le développement de diarrhées modérées, comme il a été précédemment décrit par McDonald *et al.* (1999 ; 2001). Selon McDonald *et al.* (2001) et Van Der Klis *et al.* (1993), la viscosité augmenterait l'osmolalité et par conséquent favoriserait la sécrétion d'eau et d'ions par la muqueuse intestinale. Dans nos études, nous n'avons pas analysé la viscosité des contenus digestifs. Cette interprétation demeure donc hypothétique. Par ailleurs, il reste difficile de déterminer si les différences d'expression des diarrhées au cours des essais 1 et 3 résultent du traitement technologique des microalgues en lui-même, ou du mode d'administration des microalgues, ou de la combinaison de ces deux facteurs. En effet, dans l'essai 3, les microalgues ont été administrées ponctuellement par voie orale, indépendamment de l'aliment. En conséquence, lors du premier repas pris par l'animal après l'administration des microalgues, la proportion



de microalgues rapportée à la quantité d'aliment ingéré était plus importante que chez les animaux recevant une supplémentation constante dans l'aliment. Il est donc possible que l'administration de Chlorelle de manière ponctuelle ait impacté le transit et la fonction de digestion, du fait de sa viscosité, comme cela est décrit chez le chien (Meyer et Doty, 1988). Finalement, il est probable qu'un traitement technologique favorisant la qualité et la libération des molécules microalgales ait un impact sur le système digestif du porcelet. Cependant, nous n'avons pu définir les mécanismes associés. Tandis que le bénéfice d'un tel procédé sur la préservation et la libération des constituants d'origine microalgale est reconnue (Sarada *et al.*, 1999 ; Safi *et al.*, 2014b), le bénéfice d'un tel traitement de la biomasse sur la santé digestive du porcelet demeure incertain.

### **C. Effets d'une supplémentation en microalgues pendant la lactation sur les altérations précoces de la fonction et de la santé digestive induites par le sevrage**

Notre dernier objectif dans ce travail de thèse était de déterminer si une supplémentation en microalgues en amont du sevrage modifie la réponse inflammatoire aigüe associée au sevrage et par conséquent, limite l'altération de l'architecture intestinale et la perte des fonctions de barrière et de digestion associées. Afin d'étudier l'effet de la supplémentation en microalgues en amont du sevrage, nous avons supplémenté quotidiennement les porcelets oralement avec de la Spiruline ou de la Chlorelle broyées et lyophilisées pendant quatre semaines, depuis le milieu de la lactation jusqu'à deux semaines post-sevrage. L'administration orale a été choisie car elle nous permettait de contrôler la supplémentation à l'échelle de l'individu sous la mère. De plus, l'ingéré d'aliment solide étant imprévisible durant la période de lactation (Le Dividich et Sève, 2000), l'administration orale permettait de standardiser le niveau de supplémentation en microalgues pour l'ensemble des porcelets avant le sevrage. Afin de se rapprocher d'un niveau de supplémentation équivalent aux essais 1 et 2, les quantités de microalgues à administrer ont été définies sur la base du PV, en calculant la quantité moyenne de microalgues ingérées par kilogramme de PV pendant la période post-sevrage dans les essais précédents. Globalement, l'ingéré étant faible et hétérogène au cours des trois premiers jours suivant le sevrage, le niveau de supplémentation en microalgues dans l'essai 3 était largement supérieur à celui des essais 1 et 2. Néanmoins, à partir du quatrième jour post-

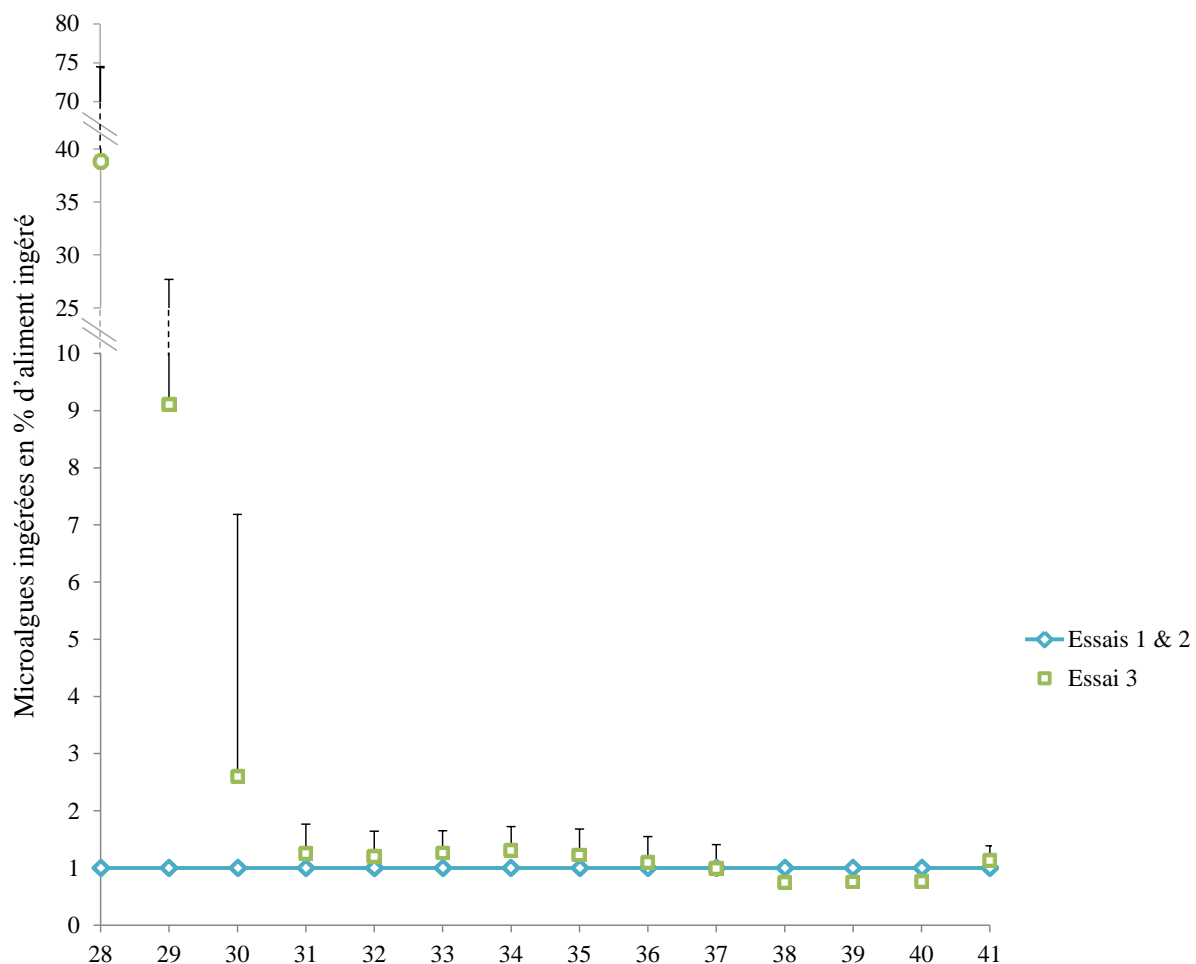


Figure 36 : Quantité de microalgues administrées quotidiennement en PS par rapport à la quantité d'aliment ingéré. Dans les essais 1 et 2, les microalgues étaient incluses à hauteur de 1 % dans l'aliment standard premier âge. Dans l'essai 3, les microalgues étaient administrées oralement à raison de 385 mg/kg de PV.

sevrage, l'ingéré était corrélé au PV ( $r=0,67$ ,  $P<0,01$ ), ce qui a permis d'approcher le niveau de supplémentation en microalgues appliqué dans les essais précédents (Figure 36).

La supplémentation en microalgues en amont du sevrage a montré des résultats très différents des premiers essais (Figures 34 et 35). En particulier, nous avons pu mettre en évidence une augmentation du gain de poids pendant l'allaitement et une réduction de la probabilité d'apparition et de l'incidence globale des diarrhées en post-sevrage chez les porcelets supplémentés en Spiruline en amont et en aval du sevrage. La supplémentation en Spiruline dès l'allaitement semble donc favoriser le maintien de l'homéostasie du système digestif au sevrage. Les mécanismes sous-jacents sont cependant peu clairs. Il semble probable qu'une orientation du microbiote en faveur de la croissance et de l'exclusion des bactéries potentiellement pathogènes dans le tractus digestif explique au moins pour partie ces observations. Néanmoins, cette hypothèse nécessite d'être vérifiée par l'analyse des populations microbiennes commensales chez les animaux supplémentés en Spiruline et en Chlorelle en amont et en aval du sevrage, afin de définir leur implication dans nos observations.

Contrairement à notre hypothèse initiale, la supplémentation en Spiruline n'a pas été responsable d'une modulation de l'expression des cytokines pro- et anti-inflammatoires dans les 48 heures suivant le sevrage. La supplémentation en Spiruline ne semble donc pas moduler l'activation des facteurs régissant l'expression des cytokines au niveau cellulaire, tels que le facteur NF- $\kappa$ B, comme il est décrit dans la littérature, dans la phase précoce de réponse au sevrage. Deux semaines après le sevrage, les porcelets supplémentés en Spiruline et en Chlorelle possédaient cependant des niveaux d'expression en cytokines pro-inflammatoires spécifiquement augmentés. En comparaison à des animaux non supplémentés, les animaux supplémentés en Spiruline possédaient une expression en IL-8 augmentée dans la plaque de Peyer iléale, tandis que les animaux supplémentés en Chlorelle possédaient une expression en IL-1 $\beta$  augmentée dans la muqueuse jéjunale à 42 jours d'âge. Les cytokines pro-inflammatoires IL-8 et IL-1 $\beta$  sont synthétisées lors de la reconnaissance d'un pathogène par les TLR, tel que le LPS (Jung *et al.*, 1995). Cependant, l'activation d'une réponse immunitaire à la présence d'un pathogène ne se limite pas à la synthèse unique de IL-8 ou de IL-1 $\beta$ , mais induit une réponse inflammatoire aiguë médiée par un large panel de cytokines et chémokines, dont TNF $\alpha$ , IL-8 et IL-1 $\beta$  (Jung *et al.*, 1995 ; Stadnyk, 2002 ; Oswald, 2006). La stimulation spécifique de ces cytokines ne résulte donc pas d'un épisode infectieux dans notre essai, ce qui se confirme par le maintien de l'ingestion d'aliment et de la croissance chez les



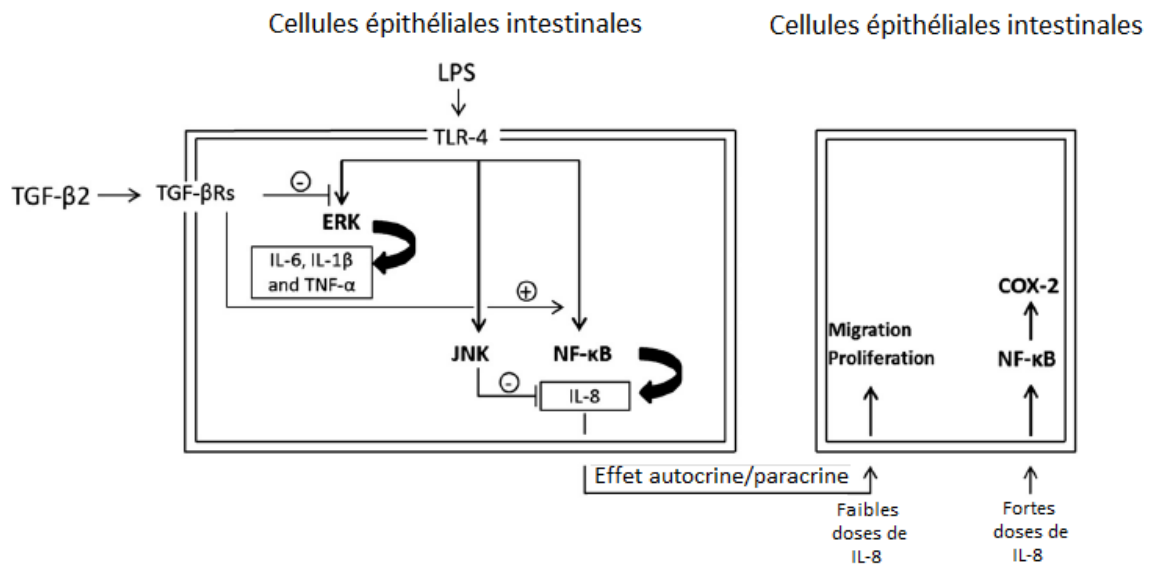


Figure 37 : Action synergique du LPS et du facteur TGF-β2 sur la sécrétion en IL-8 par les cellules épithéliales intestinales. La présence de LPS en faible quantité agit en association avec le facteur TGF-β2 pour promouvoir une synthèse modérée en IL-8, stimulant la prolifération des cellules dans les cryptes intestinales. La présence de LPS en quantité élevée induit la production de fortes doses de IL-8, conduisant à l'inflammation. D'après Nguyen *et al.* (2014).

porcelets supplémentés en microalgues. Des observations similaires ont été rapportées chez le porc et le rongeur supplémentés en polysaccharides extraits des macro- et microalgues (Balachandran *et al.*, 2006 ; Reilly *et al.*, 2008). Ces modulations spécifiques et différentes entre les deux espèces de microalgues pourraient résulter d'une stimulation des réponses immunitaires au niveau intestinal, induites par certains polysaccharides complexes composant les microalgues (Pugh *et al.*, 2001 ; Balachandran *et al.*, 2006 ; Hsu *et al.*, 2009 ; Kawanishi *et al.*, 2013). Le lait maternel contient un large nombre de facteurs de croissance, de cytokines pro- et anti-inflammatoires et des molécules solubles capables d'interagir avec la muqueuse intestinale et les populations microbiennes commensales, qui par conséquent sont capables d'inhiber ou de moduler les réponses inflammatoires chez l'animal allaitant (Newburg et Walker, 2007 ; Nguyen *et al.*, 2007 ; Nguyen *et al.*, 2014). Les facteurs du lait pourraient interférer avec les immunisations orales chez le jeune (Melkebeek *et al.*, 2013), ce qui suggère que les réponses immunitaires associées aux polysaccharides d'origine algale pourraient être inhibées par ces facteurs au cours de l'allaitement. La stimulation spécifique de l'expression des cytokines pro-inflammatoires observée à 42 jours d'âge pourrait donc résulter de la disparition des facteurs provenant du lait de la mère. Par conséquent, une supplémentation en microalgues en amont et en aval du sevrage est certainement inefficace pour moduler les réponses immunitaires dans les premiers jours suivant le sevrage.

L'effet d'une stimulation spécifique en IL-8 ou en IL-1 $\beta$  sur la santé digestive des porcelets supplémentés en Spiruline et en Chlorelle respectivement, est inconnu. La chémokine IL-8 est responsable de la migration des neutrophiles au site d'induction et favorise la production de dérivés réactifs de l'oxygène, donc le stress oxydant (Mackay, 2001). Il a été montré qu'une stimulation modérée de la synthèse de IL-8 par le LPS pourrait bénéficier aux mécanismes de réparation et de protection du tissu intestinal (Figure 37 ; Nguyen *et al.*, 2014). Il est donc possible que le LPS de la Spiruline favorise la synthèse de IL-8, sans conduire à l'inflammation. Par ailleurs, le développement d'une réponse immunitaire spécifique chez les animaux supplémentés en Spiruline ou en Chlorelle pourrait être favorable à la lutte contre les infections entériques en post-sevrage, comme il a été décrit dans certains cas d'infection systémique chez le rongeur (Tanaka *et al.*, 1986 ; Hasegawa *et al.*, 1995). Cependant, nos essais ne permettent pas d'évaluer ce bénéfice potentiel. Afin de définir si une telle stimulation du système immunitaire chez les animaux supplémentés en Spiruline et en Chlorelle serait favorable à la défense de l'hôte, il serait nécessaire d'évaluer l'effet de la supplémentation en Spiruline et en Chlorelle dans un modèle contrôlé d'infection bactérienne.



## CONCLUSION ET PERSPECTIVES



L'objectif général de la thèse était d'évaluer le potentiel d'une supplémentation en Spiruline et en Chlorelle en tant qu'ingrédients capables de favoriser la santé digestive et la croissance du porcelet au sevrage. Dans ce travail, nous avons décrit que les supplémentations en Spiruline et en Chlorelle étaient capables de réduire l'incidence des diarrhées en post-sevrage. Les diarrhées sont l'expression clinique de la perturbation des fonctions digestives (Figures 33 et 34). Par conséquent, ces observations montrent que la Spiruline et la Chlorelle pourraient constituer des ingrédients d'intérêt pour maintenir l'homéostasie du système digestif au sevrage. Cependant, nous avons mis en évidence que les effets d'une supplémentation en Spiruline et en Chlorelle sur la santé digestive du porcelet sevré étaient variables selon les conditions d'élevage, selon le prétraitement de la biomasse microalgale et selon la période de supplémentation. En particulier, les bénéfices d'une supplémentation en Spiruline et en Chlorelle sur la croissance et la morphologie intestinale du porcelet sevré n'ont pu être observés qu'en conditions sanitaires favorables à la santé de l'animal. Nos observations soulèvent donc un constat déjà évoqué par d'autres auteurs (Hiss et Sauerwein, 2003), selon lequel il est impossible d'envisager la promotion de la santé des animaux d'élevage à l'aide d'additifs alimentaires sans la maîtrise préalable des bonnes pratiques d'hygiène en élevage.

Malgré le fait que nous ayons pu mettre en évidence une réduction des diarrhées en post-sevrage chez les animaux supplémentés en Spiruline ou en Chlorelle, les indicateurs de la santé digestive que nous avons sélectionnés ne nous permettent pas de définir les mécanismes sous-jacents. Cela suggère que l'intégrité de la muqueuse intestinale et le statut inflammatoire local et systémique ne suffisent pas à caractériser la promotion de la santé digestive par les microalgues. Nous avons mis en évidence que pour l'ensemble de nos observations, il est fortement probable que la réduction des troubles digestifs et les modifications de la morphologie intestinale résultent d'une modification des populations microbiennes commensales en faveur de l'homéostasie des fonctions de digestion, d'absorption et de barrière. Le microbiote digestif est sujet à un intérêt croissant pour le développement de nouvelles stratégies favorisant la santé chez l'homme et les animaux d'élevage (Jia *et al.*, 2008 ; Le Huërou-Luron et Ferret-Bernard, 2015). Le microbiote joue en effet un rôle crucial dans des mécanismes multiples impliqués dans la santé et la maladie de l'hôte (Round et Mazmanian, 2009). Notre travail montre qu'il est nécessaire de définir son implication pour déterminer les mécanismes d'action associés à la supplémentation en microalgues.



L'étude portant sur les effets d'ingrédients fonctionnels sur la santé digestive au sevrage fait souvent face à un manque de répétabilité entre expériences (de Lange *et al.*, 2010). Cela prouve la complexité des interactions ayant lieu dans le tractus digestif au sevrage, précédemment décrite par Pluske *et al.* (2007). Selon de Lange *et al.* (2010), un grand nombre d'ingrédients pourrait favoriser le développement et la santé du tractus digestif au sevrage, mais il est peu probable qu'un ingrédient unique ait la capacité de remplacer la fonction d'un antibiotique. Il est donc nécessaire de concevoir que de nouvelles solutions alimentaires favorisant la santé digestive au sevrage ne peuvent être développées que par la combinaison d'ingrédients avec des spécificités propres, agissant de façon synergique (de Lange *et al.*, 2010). Par conséquent, les propriétés antioxydantes, immunomodulatrices, prébiotiques et antimicrobiennes des molécules microalgales décrites dans la littérature ont leur place dans le développement d'ingrédients agissant en faveur de la santé digestive au sevrage.

La supplémentation en microalgues entières, telle qu'elle a été réalisée dans notre travail, ne permet pas de déterminer quelles sont les molécules microalgales impliquées dans les effets bénéfiques ou délétères observés. Par ailleurs, la supplémentation en Spiruline ou en Chlorelle entières ne permet pas de s'affranchir des mécanismes compensatoires qui pourraient résulter de la présence concomitante de molécules aux propriétés opposées. Comme nous l'avons montré dans ce travail, la Spiruline et la Chlorelle sont composées de polysaccharides possédant des propriétés immunostimulantes (Balachandran *et al.*, 2006) et de pigments possédant des propriétés anti-inflammatoires (Leung *et al.*, 2013). L'isolation des constituants permettrait donc de valoriser pleinement le potentiel d'action des molécules spécifiques sur la santé de l'animal. Par ailleurs, afin de développer les connaissances scientifiques, l'isolation des constituants des microalgues permettrait de mettre en évidence leurs rôles spécifiques sur la santé digestive du porcelet sevré.

De manière générale, les ingrédients capables de promouvoir la santé digestive en post-sevrage se basent sur des mécanismes modifiant la réponse « normale » d'un individu à un challenge spécifique, tels que l'inhibition des mécanismes d'oxydation ou d'inflammation ou, à l'inverse, la stimulation des réponses immunitaires. La manipulation de ces mécanismes peut impacter des fonctions de lutte « normale » contre les infections. En outre, la réponse inflammatoire permet l'activation de réponses immunitaires spécifiques, la synthèse de molécules antimicrobiennes, d'enzymes antioxydantes et de protéines anti-apoptotiques qui jouent un rôle majeur dans la protection de l'hôte contre les pathogènes (Pasparakis, 2009). En conséquence, tout ingrédient fonctionnel est capable de promouvoir la santé dans un





contexte donné, mais ne peut répondre à l'ensemble des enjeux sanitaires associés à un stade d'élevage tel que le post-sevrage (inflammation, infection, toxicité, déstabilisation des populations microbiennes commensales). Sur le plan temporel, le système digestif fait face à des problématiques différentes selon les étapes de vie du porcelet :

- La phase de développement : développement des fonctions de digestion et d'absorption, éducation du système immunitaire aux antigènes environnementaux et alimentaires, développement d'une communauté microbienne commensale.
- La phase de réponse aigue au sevrage : inflammation, stress oxydant, perte d'intégrité de la muqueuse, déstabilisation de l'équilibre des populations microbiennes commensales.
- La phase de récupération : diminution de l'inflammation, récupération progressive de la fonction digestive et de la fonction de défense physique, mise en place d'une nouvelle communauté microbienne, risque accru d'infections entériques par le développement de bactéries pathogènes.
- La phase de stabilisation : croissance accélérée de l'animal, stabilisation des fonctions de digestion, d'absorption et de défense.

En complément des préconisations de de Lange *et al.* (2010), il peut donc être envisagé que les solutions nutritionnelles en faveur du maintien de la santé digestive sont évolutives et doivent tenir compte des niveaux de risque associés à chaque étape de vie du porcelet. En l'occurrence, la phase de développement est une étape cruciale pour développer des solutions nutritionnelles favorisant le maintien de la santé digestive au sevrage. L'orientation du microbiote digestif et la préparation du système digestif à de nouvelles sources alimentaires représentent des voies d'investigation prometteuses.

Les stratégies nutritionnelles au cours des phases de réponse aigue et de récupération après le sevrage soulèvent cependant un questionnement quant à leur aptitude à favoriser l'homéostasie du système digestif. Une hypothèse peu développée dans la littérature, est que l'altération précoce de la muqueuse intestinale au sevrage résulterait de mécanismes programmés, permettant l'adaptation de la fonction digestive et absorptive à un nouveau substrat alimentaire. Cette hypothèse, déjà évoquée par Kelly *et al.* (1991) et que nous évoquons également dans notre travail, suppose que l'apoptose cellulaire et le raccourcissement des villosités intestinales au sevrage est une étape inévitable pour permettre l'adaptation du système digestif de l'animal à l'aliment solide. Les réponses inflammatoires et la production de composés pro-oxydants au cours de cette période assurent à l'animal une défense contre l'invasion des tissus par les microorganismes pathogènes. Par conséquent, l'utilisation d'additifs alimentaires capables de moduler les réponses immunitaires dans la



première semaine post-sevrage pourrait compromettre les mécanismes de lutte contre les infections et donc induire l'effet inverse aux attentes initiales. Nos résultats, ainsi que les observations souvent contradictoires concernant l'effet d'additifs fonctionnels sur la santé digestive du porcelet en post-sevrage, montrent qu'il est nécessaire de développer les connaissances et la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires ayant lieu au cours de la première semaine post-sevrage. Cette compréhension représente une étape clé pour définir la validité des stratégies nutritionnelles actuellement développées pour promouvoir la santé du porcelet sevré.

Nous avons également observé dans notre travail qu'il existe une variabilité individuelle forte des réponses au sevrage en termes de santé digestive. Cette variabilité contribue à la difficulté à mettre en place et à interpréter les résultats de modèles expérimentaux portant sur la santé digestive du porcelet sevré (Madec *et al.*, 2000). Il existe notamment, chez le porcelet, des formes de résistance génétique à l'infection par certaines souches bactériennes en post-sevrage (Wray et Morris, 1985 ; Bertschinger *et al.*, 1993 ; Madec *et al.*, 2000). Par ailleurs, cette variabilité suppose que les solutions nutritionnelles ne sont pas nécessairement favorables à la santé digestive de l'ensemble des animaux. Les mécanismes explicatifs des phénomènes de résistance ou de susceptibilité aux diarrhées et aux infections en post-sevrage demeurent encore mal connus. La compréhension de ces mécanismes permettrait de sélectionner les animaux d'élevage sur la base de leur résistance ou d'adapter les stratégies d'élevage et d'alimentation en fonction de la susceptibilité individuelle et temporelle des animaux. A l'avenir, le développement d'un phénotypage fin, capable de mesurer les marqueurs de santé des animaux en temps réel et de déterminer les pathologies propres à chaque individu permettra de concevoir la mise en place de solutions nutritionnelles à l'échelle de l'individu.

Sur le plan économique, la grande diversité de molécules présentes dans les microalgues (acides gras polyinsaturés, polysaccharides, caroténoïdes, protéines) leur confèrent une forte attractivité dans des domaines d'application variés, tels que la santé humaine, la cosmétique, les bioénergies, la nutrition animale ou le développement de matériaux bio-sourcés (Person *et al.*, 2011). Par ailleurs, la grande capacité d'adaptation et d'orientation de leur métabolisme selon les conditions environnementales offrent la possibilité de produire préférentiellement des molécules spécifiques à haute valeur ajoutée (Leu et Boussiba, 2014). A l'heure actuelle, peu de microalgues sont exploitées et commercialisées pour leurs composés d'intérêt, les



principales étant la Spiruline et la Chlorelle (Leu et Boussiba, 2014). Il en existe cependant pas moins de 200 000 espèces (Person *et al.*, 2011), ce qui suppose que la valorisation de cette ressource naturelle n'en est qu'à ses balbutiements. Nos résultats montrent qu'il existe une opportunité de développement de solutions favorables au maintien de la santé digestive au sevrage à partir des microalgues, mais qu'il est nécessaire d'aller plus loin dans l'identification et l'isolation de molécules avec des propriétés spécifiques. Les microalgues souffrent cependant d'une faible compétitivité dans les domaines nécessitant de grands volumes de production à des faibles coûts, tels que la nutrition animale. A l'heure actuelle, le coût de production et le prix de marché des microalgues n'est pas propice au développement de solutions pour la santé animale en élevage. Une supplémentation à hauteur de 1% dans l'aliment pendant les deux premières semaines post-sevrage doublerait le coût de l'aliment (+37€ par truies et par an ; Brennan et Owende, 2010 ; GTE Bretagne 2015). Par ailleurs, les voies de valorisation en lien avec le développement d'ingrédients fonctionnels pour la santé animale sont en concurrence directe avec le domaine de la pharmaceutique. La commercialisation de composés bioactifs d'origine microalgale en pharmaceutique et nutraceutique représente l'un des marchés les plus prometteurs de cette ressource (Leu et Boussiba, 2014). A titre d'exemple, les phycobiliprotéines extraites de la Spiruline étaient commercialisées à 11€/mg en 2009 (Brennan et Owende, 2010). Par conséquent, il est difficile d'envisager que le développement de solutions basées sur les microalgues puisse répondre aux enjeux actuels de santé en élevage. Etant donnée la valeur ajoutée qu'offrent les molécules d'origine microalgale pour les domaines de la pharmaceutique et de la cosmétique, il est plus concevable que la nutrition animale se positionne sur la valorisation des co-produits issus de l'extraction des molécules à haute valeur ajoutée. Dans un tel contexte, la valorisation des coproduits de microalgues en nutrition animale ne peut être développée que sur la base d'un marché existant, mais les conditions actuelles en termes de niveaux de production ne permettent pas de développer cette voie dans un avenir proche (Brennan et Owende, 2010).



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES





Abreu MT, Fukata M et Arditi M 2005. TLR signaling in the gut in health and disease. *J. Immunol.* 174, 4453-4460.

Adewole D, Kim I et Nyachoti C 2016. Gut health of pigs: challenge models and response criteria with a critical analysis of the effectiveness of selected feed additives - A review. *Asian Austral. J. Anim.* 29, 909.

Agarwal S, Piesco N, Johns L et Riccelli A 1995. Differential expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides from different microbes. *J. Dent. Res.* 74, 1057-1065.

Azzat O, Yap S, Sopia H, Madiha M, Hazreen M, Shailah A, Junizam WW, Syaidah AN, Srijit D et Musalmah M 2010. Modulation of oxidative stress by *Chlorella vulgaris* in streptozotocin (STZ) induced diabetic Sprague-Dawley rats. *Adv. Med. Sci.* 55, 281-288.

Akbari P, Braber S, Varasteh S, Alizadeh A, Garssen J et Fink-Gremmels J 2016. The intestinal barrier as an emerging target in the toxicological assessment of mycotoxins. *Arch. Toxicol.* 1-23.

Akira S, Takeda K et Kaisho T 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunol.* 2, 675-680.

Al-Batshan HA, Al-Mufarrej SI, Al-Homaidan AA et Qureshi M 2001. Enhancement of chicken macrophage phagocytic function and nitrite production by dietary *Spirulina platensis*. *Immunopharm. Immunot.* 23, 281-289.

Anses 2014 Évaluation des risques d'émergence d'antibiorésistances liées aux modes d'utilisation des antibiotiques dans le domaine de la santé animale., France, avril 2014, rapport, 218p.

Anses 2016. Résapath - Réseau d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales, bilan 2015, Lyon et Ploufragan-Plouzané, France, novembre 2016, rapport, 152p.

Albers R, Antoine J-M, Bourdet-Sicard R, Calder PC, Gleeson M, Lesourd B, Samartín S, Sanderson IR, Van Loo J et Dias FWV 2005. Markers to measure immunomodulation in human nutrition intervention studies. *Brit. J. Nutr.* 94, 452-481.

Anadón A 2006. WS14 The EU ban of antibiotics as feed additives (2006): alternatives and consumer safety. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 29, 41-44.

AOAC 1990. Official methods of analysis. 15<sup>th</sup> edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA..

Apajalahti J et Kettunen A 2006. Rational development of novel microbial modulators. Antimicrobial growth promoters. Where do we go from here. 165-181.



Armstrong WD et Clawson AJ 1980. Nutrition and management of early weaned pigs: effect of increased nutrient concentrations and (or) supplemental liquid feeding. *J. Anim. Sci.* 50, 377-384.

Arrieta M, Bistriz L et Meddings J 2006. Alterations in intestinal permeability. *Gut* 55, 1512-1520.

Balachandran P, Pugh ND, Ma G et Pasco DS 2006. Toll-like receptor 2-dependent activation of monocytes by *Spirulina* polysaccharide and its immune enhancing action in mice. *Int. Immunopharmacol.* 6, 1808-1814.

Balimane PV, Chong S et Morrison RA 2000. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J. Pharmacol. Toxicol.* 44, 301-312.

Ball R et Aherne F 1982. Effect of diet complexity and feed restriction on the incidence and severity of diarrhea in early-weaned pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 62, 907-913.

Ball R et Aherne F 1987. Influence of dietary nutrient density, level of feed intake and weaning age on young pigs. II. Apparent nutrient digestibility and incidence and severity of diarrhea. *Can. J. Anim. Sci.* 67, 1105-1115.

Barton MD 2000. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutr. Res. Rev.* 13, 279-299.

Bauer E, Williams BA, Smidt H, Verstegen MW et Mosenthin R 2006. Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals. *Current issues in intestinal microbiology* 7, 35-52.

Baumann H et Gauldie J 1994. The acute phase response. *Immunol. today* 15, 74-80.

Becker EW 1994. *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press.

Bertschinger H, Stamm M et Vögeli P 1993. Inheritance of resistance to oedema disease in the pig: experiments with an *Escherichia coli* strain expressing fimbriae 107. *Vet. Microbiol.* 35, 79-89.

Bhowmik D, Dubey J et Mehra S 2009. Probiotic efficiency of *Spirulina platensis*-stimulating growth of lactic acid bacteria. *World J. Dairy Food Sci.* 42, 160-163.

Bikker P, Dirkzwager A, Fledderus J, Trevisi P, le Huerou-Luron I, Lalles JP et Awati A 2006. The effect of dietary protein and fermentable carbohydrates levels on growth performance and intestinal characteristics in newly weaned piglets. *J. Anim. Sci.* 84, 3337-3345.

Bjarnason I, Macpherson A et Hollander D 1995. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology* 108, 1566-1581.



Bónai A, Dalle Zotte A, Kametler L, Vántus V, Morsy W, Matics Z, Dal Bosco A, Zs S et Kovács M 2012. Dietary supplementation of Spirulina (*Arthrospira platensis*) and Thyme (*Thymus vulgaris*). Part 2: Effect on gastrointestinal growth, caecal microbiota and fermentation in rabbits. The 10<sup>th</sup> World Rabbit Congress, Sharm El-Sheikh, Egypt. 707-711.

Bosi P, Casini L, Finamore A, Cremokolini C, Merialdi G, Trevisi P, Nobili F et Mengheri E 2004. Spray-dried plasma improves growth performance and reduces inflammatory status of weaned pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K881. J. Anim. Sci. 82, 1764-1772.

Boudry G, Peron V, Le Huerou-Luron I, Lalles JP et Sève B 2004. Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. J. Nutr. 134, 2256-2262.

Brennan L et Owende P 2010. Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renew. Sust. Energ. Rev. 14, 557-577.

Brooks P et Tsourgiannis C 2003. Factors affecting the voluntary feed intake of the weaned pig. Weaning the Pig, Concepts and Consequences. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers. 81-116.

Brooks P, Moran C, Beal J, Demeckova V, Campbell A, Varley M et Wiseman J 2001. Liquid feeding for the young piglet. The weaner pig: nutrition and management. Proceedings of a British Society of Animal Science Occasional Meeting, University of Nottingham, UK, September 2000. 153-178.

Broom LJ, Miller HM, Kerr KG et Knapp JS 2006. Effects of zinc oxide and *Enterococcus faecium* SF68 dietary supplementation on the performance, intestinal microbiota and immune status of weaned piglets. Res. Vet. Sci. 80, 45-54.

Bruininx E, Binnendijk G, Van der Peet-Schwering C, Schrama J, Den Hartog L, Everts H et Beynen A 2002. Effect of creep feed consumption on individual feed intake characteristics and performance of group-housed weanling pigs. J. Anim. Sci. 80, 1413-1418.

Buddington RK 1994. Nutrition and ontogenetic development of the intestine. Can. J. Physiol. Pharm. 72, 251-259.

Burrin D et Stoll B 2003. Enhancing intestinal function to improve growth and efficiency. 9<sup>th</sup> International symposium on digestive physiology of pigs.

Callesen J, Halas D, Thorup F, Knudsen KB, Kim J, Mullan B, Hampson D, Wilson R et Pluske J 2007. The effects of weaning age, diet composition, and categorisation of creep feed intake by piglets on diarrhoea and performance after weaning. Livest. Sci. 108, 120-123.



Campbell JM, Crenshaw JD et Polo J 2013. The biological stress of early weaned piglets. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 4, 19.

Campos PH, Merlot E, Damon M, Noblet J et Le Floc'h N 2014. High ambient temperature alleviates the inflammatory response and growth depression in pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Vet. J.* 200, 404-409.

Carroll J, Gaines A, Spencer J, Allee G, Kattesh H, Roberts M et Zannelli M 2003. Effect of menhaden fish oil supplementation and lipopolysaccharide exposure on nursery pigs: I. Effects on the immune axis when fed diets containing spray-dried plasma. *Domest. Anim. Endocrinol.* 24, 341-351.

Castillo M, Martin-Orue SM, Nofrarias M, Manzanilla EG et Gasa J 2007. Changes in caecal microbiota and mucosal morphology of weaned pigs. *Vet. Microbiol.* 124, 239-247.

Cebra JJ, Periwal SB, Lee G, Lee F et Shroff KE 1998. Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): the roles of enteric bacteria and viruses. *J. Immunol. Res.* 6, 13-18.

Cera K, Mahan D, Cross R, Reinhart G et Whitmoyer R 1988. Effect of age, weaning and postweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine. *J. Anim. Sci.* 66, 574-584.

Cheng H et Leblond C 1974. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine III. Entero-endocrine cells. *Am. J. Anat.* 141, 503-519.

Cherng S-C, Cheng S-N, Tarn A et Chou T-C 2007. Anti-inflammatory activity of c-phycocyanin in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Life sciences* 81, 1431-1435.

Cherng J, Liu C, Shen C, Lin H et Shih M 2010. Beneficial effects of Chlorella-11 peptide on blocking LPS-induced macrophage activation and alleviating thermal injury-induced inflammation in rats. *Int. J. Immunopath. Ph.* 23, 811-820.

Cho J, Chen Y, Min B, Kim H, Kwon O, Shon K, Kim I, Kim S et Asamer A 2006. Effects of essential oils supplementation on growth performance, IgG concentration and fecal noxious gas concentration of weaned pigs. *Asian Austral. J. Anim.* 19, 80.

Choct M 2009. Managing gut health through nutrition. *Brit. Poultry Sci.* 50, 9-15.

Chu W-L, Lim Y-W, Radhakrishnan AK et Lim P-E 2010. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC complementary and alternative medicine* 10, 53.





Chu F-F, Chu P-N, Cai P-J, Li W-W, Lam PK et Zeng RJ 2013. Phosphorus plays an important role in enhancing biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* under nitrogen deficiency. *Biores. Technol.* 134, 341-346.

Ciferri O 1983. Spirulina, the edible microorganism. *Microbiol. Rev.* 47, 551-578.

Commission Européenne 2005. Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect. 1.

Colla LM, Bertolin TE et Costa JAV 2004. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. *Zeitschrift für Naturforschung C* 59, 55-59.

Conner EM et Grisham MB 1996. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 12, 274-277.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M et Lunec J 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal* 17, 1195-1214.

Dalle Zotte A, Sartori A, Bohatir P, Rémignon H et Ricci R 2013. Effect of dietary supplementation of Spirulina (*Arthrospira platensis*) and Thyme (*Thymus vulgaris*) on growth performance, apparent digestibility and health status of companion dwarf rabbits. *Livest. Sci.* 152, 182-191.

Danesi E, Rangel-Yagui C, Carvalho J et Sato S 2004. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass Bioenerg.* 26, 329-335.

Davis M, Maxwell C, Erf G, Brown D et Wistuba T 2004. Dietary supplementation with phosphorylated mannans improves growth response and modulates immune function of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 82, 1882-1891.

de Briyne N, Atkinson J, Borriello SP et Pokludová L 2014. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Vet. Rec.* 175, 325.

de Caire GZ, Parada JL, Zaccaro MC et de Cano MMS 2000. Effect of *Spirulina platensis* biomass on the growth of lactic acid bacteria in milk. *World J. Microb. Biot.* 16, 563-565.

de Lange C, Pluske J, Gong J et Nyachoti C 2010. Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs. *Livest. Sci.* 134, 124-134.

Desmorieux H et Hernandez F 2004. Biochemical and physical criteria of Spirulina after different drying processes. In *Proceedings of the 14<sup>th</sup> International Drying Symposium (IDS)*, B, pp. 900-907.



- Dixon J 1960. The fate of bacteria in the small intestine. *J. Pathol. Bact.* 79, 131-140.
- Domeneghini C, Di Giancamillo A, Arrighi S et Bosi G 2006. Gut-trophic feed additives and their effects upon the gut structure and intestinal metabolism. State of the art in the pig, and perspectives towards humans. *Histol. Histopathol.* 21, 273-283.
- Doucha J et Lívanský K 2008. Influence of processing parameters on disintegration of *Chlorella* cells in various types of homogenizers. *Appl. Microbiol. Biot.* 81, 431.
- Dritz SS, Owen KQ, Goodband RD, Nelssen JL, Tokach MD, Chengappa MM et Blecha F 1996. Influence of lipopolysaccharide-induced immune challenge and diet complexity on growth performance and acute-phase protein production in segregated early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 74, 1620-1628.
- El-Sheekh MM, Daboor SM, Swelim MA et Mohamed S 2014. Production and characterization of antimicrobial active substance from *Spirulina platensis*. *Iran. J. Microbiol.* 6, 112.
- Exton MS 1997. Infection-induced anorexia: active host defence strategy. *Appetite* 29, 369-383.
- Fairbrother JM, Nadeau É et Gyles CL 2005. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim. Health Res. Rev.* 6, 17-39.
- Favier A 2003. Le stress oxydant. *L'actualité chimique* 108.
- Fischer AH, Jacobson KA, Rose J et Zeller R 2008. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold Spring Harbor Protocols*.
- Forchielli ML et Walker WA 2005. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *Brit. J. Nutr.* 93, S41-S48.
- Fukatsu K et Kudsk KA 2011. Nutrition and gut immunity. *Surg. Clin. North Am.* 91, 755-770.
- Furbeyre H, van Milgen J, Mener T, Gloaguen M et Labussière E 2017. Effects of dietary supplementation with freshwater microalgae on growth performance, nutrient digestibility and gut health in weaned piglets. *Animal.* 11, 183-192.
- Fleurence J 1999. The enzymatic degradation of algal cell walls: a useful approach for improving protein accessibility? *J. Appl. Phycol.* 11, 313-314.
- Gaudré D 2013. Consequences of a feeding restriction after weaning on pig performance, fecal score and heterogeneity [Conference poster]. *Journées de la Recherche Porcine.* 45, 193-194.



Geary TM et Brooks PH 1998. The effect of weaning weight and age on the post-weaning growth performance of piglets fed fermented liquid diets. *The Pig Journal* 42, 13.

Gerde JA, Montalbo-Lomboy M, Yao L, Grewell D et Wang T 2012. Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. *Biores. Technol.* 125, 175-181.

Gershwin ME et Belay A 2007. *Spirulina in human nutrition and health*. CRC Press.

Goldstein RM, Hebiguchi T, Luk GD, Taqi F, Guilarte TR, Franklin FA, Niemiec PW et Dudgeon DL 1985. The effects of total parenteral nutrition on gastrointestinal growth and development. *J. Pediatr. Surg.* 20, 785-791.

Grimble RF 1998. Nutritional modulation of cytokine biology. *Nutrition* 14, 634-640.

Grinstead GS, Tokach MD, Dritz SS, Goodband RD et Nelssen JL 2000. Effects of *Spirulina platensis* on growth performance of weanling pigs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 83, 237-247.

Günerken E, D'Hondt E, Eppink MHM, Garcia-Gonzalez L, Elst K et Wijffels RH 2015. Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnol. Adv.* 33, 243-260.

Habib MAB, Parvin M, Huntington TC et Hasan MR 2008. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. Food and agriculture organization of the United Nations.

Halim R, Harun R, Danquah MK et Webley PA 2012. Microalgal cell disruption for biofuel development. *Appl. Energ.* 91, 116-121.

Halle I, Janczyk P, Freyer G et Souffrant W 2009. Effect of microalgae *Chlorella vulgaris* on laying hen performance. *Archiva Zootechnica* 12, 5-13.

Hampson DJ et Smith W 1986. Influence of creep feeding and dietary intake after weaning on malabsorption and occurrence of diarrhoea in the newly weaned pig. *Res. Vet. Sci.* 41, 63-69.

Hampson DJ, Hinton M et Kidder DE 1985. Coliform numbers in the stomach and small intestine of healthy pigs following weaning at three weeks of age. *J. Comp. Pathol.* 95, 353-362.

Hart GK et Dobb GJ 1988. Effect of a fecal bulking agent on diarrhea during enteral feeding in the critically ill. *JPEN. Parenter. Enter.* 12, 465-468.

Hasegawa T, Tanaka K, Ueno K, Ueno S, Okuda M, Yoshikai Y et Nomoto K 1989. Augmentation of the resistance against *Escherichia coli* by oral administration of a hot water extract of *Chlorella vulgaris* in rats. *Int. J. Immunopharmacol.* 11, 971-976.

Hasegawa T, Okuda M, Makino M, Hiromatsu K, Nomoto K et Yoshikai Y 1995. Hot water extracts of *Chlorella vulgaris* reduce opportunistic infection with *Listeria*



*monocytogenes* in C57BL/6 mice infected with LP-BM5 murine leukemia viruses. Int. J. Immunopharmacol. 17, 505-512.

Hedemann MS, Højsgaard S et Jensen BB 2003. Small intestinal morphology and activity of intestinal peptidases in piglets around weaning. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 87, 32-41.

Hémonic A, Chauvin C et Corrége I 2014. Les utilisations d'antibiotiques en élevage de porcs: motifs et stratégies thérapeutiques associées. Journées de la Recherche Porcine, Paris. 4.

Heo J, Opapeju F, Pluske J, Kim J, Hampson D et Nyachoti C 2013. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 97, 207-237.

Herpin P, Bertin R, Dividich JL et Portet R 1987. Some regulatory aspects of thermogenesis in cold-exposed piglets. Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiology 87, 1073-1081.

Herrero M, Martín-Álvarez PJ, Señoráns FJ, Cifuentes A et Ibáñez E 2005. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. Food Chem. 93, 417-423.

Hinton M, Hampson D, Hampson E et Linton A 1985. A comparison of the ecology of *Escherichia coli* in the intestine of healthy unweaned pigs and pigs after weaning. J. Appl. Microbiol. 58, 471-477.

Hill G, Cromwell G, Crenshaw T, Dove C, Ewan R, Knabe D, Lewis A, Libal G, Mahan D et Shurson G 2000. Growth promotion effects and plasma changes from feeding high dietary concentrations of zinc and copper to weanling pigs (regional study). J. Anim. Sci. 78, 1010-1016.

Hiss S et Sauerwein H 2003. Influence of dietary  $\beta$ -glucan on growth performance, lymphocyte proliferation, specific immune response and haptoglobin plasma concentrations in pigs. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 87, 2-11.

Hodge R 1974. Efficiency of food conversion and body composition of the preruminant lamb and the young pig. Brit. J. Nutr. 32, 113-126.

Holman B et Malau-Aduli A 2013. Spirulina as a livestock supplement and animal feed. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 97, 615-623.





Hopwood D et Hampson D 2003. Interactions between the intestinal microflora, diet and diarrhoea, and their influences on piglet health in the immediate post-weaning period. *Weaning the pig: concepts and consequences*, 199-217.

Hsieh C-H et Wu W-T 2009. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Biores. Technol.* 100, 3921-3926.

Hsu H-Y, Jeyashoke N, Yeh C-H, Song Y-J, Hua K-F et Chao LK 2009. Immunostimulatory bioactivity of algal polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa* activates macrophages via Toll-like receptor 4. *J. Agric. Food Chem.* 58, 927-936.

Htoo J, Araiza B, Sauer W, Rademacher M, Zhang Y, Cervantes M et Zijlstra R 2007. Effect of dietary protein content on ileal amino acid digestibility, growth performance, and formation of microbial metabolites in ileal and cecal digesta of early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 85, 3303-3312.

Hu C, Xiao K, Luan Z et Song J 2013. Early weaning increases intestinal permeability, alters expression of cytokine and tight junction proteins, and activates mitogen-activated protein kinases in pigs. *J. Anim. Sci.* 91, 1094-1101.

Hu Q 2004. 5 Environmental Effects on Cell Composition. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, 83.

Huang C, Qiao S, Li D, Piao X et Ren J 2004. Effects of lactobacilli on the performance, diarrhea incidence, VFA concentration and gastrointestinal microbial flora of weaning pigs. *Asian Austral. J. Anim.* 17, 401-409.

Illman A, Scragg A et Shales S 2000. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microb. Technol.* 27, 631-635.

Ilsley S, Miller H et Kamel C 2005. Effects of dietary quillaja saponin and curcumin on the performance and immune status of weaned piglets. *J. Anim. Sci.* 83, 82-88.

Imberechts H, De Greve H et Lintermans P 1992. The pathogenesis of edema disease in pigs. A review. *Vet. Microbiol.* 31, 221-233.

Inoue R, Tsukahara T, Nakanishi N et Ushida K 2005. Development of the intestinal microbiota in the piglet. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 51, 257-265.

Jaime-Ceballos BJ, Hernández-Llamas A, Garcia-Galano T et Villarreal H 2006. Substitution of *Chaetoceros muelleri* by *Spirulina platensis* meal in diets for *Litopenaeus schmitti* larvae. *Aquaculture* 260, 215-220.

Janczyk P 2006. Evaluation of nutritional value and activity of green microalgae *Chlorella vulgaris* in rats and mice. Freie Universität Berlin.



Janczyk P, Franke H et Souffrant W 2007a. Nutritional value of *Chlorella vulgaris*: effects of ultrasonication and electroporation on digestibility in rats. Anim. Feed Sci. Technol. 132, 163-169.

Janczyk P, Franke H et Souffrant WB 2007b. Nutritional value of *Chlorella vulgaris*: Effects of ultrasonication and electroporation on digestibility in rats. Anim. Feed Sci. Technol. 132, 163-169.

Janczyk P, Halle B et Souffrant WB 2009. Microbial community composition of the crop and ceca contents of laying hens fed diets supplemented with *Chlorella vulgaris*. Poult. Sci. 88, 2324-2332.

Janczyk P, Pieper R, Smidt H et Souffrant WB 2007c. Changes in the diversity of pig ileal lactobacilli around weaning determined by means of 16S rRNA gene amplification and denaturing gradient gel electrophoresis. FEMS Microbiol. Ecol. 61, 132-140.

Jeong S-H, Song Y-K et Cho J-H 2009. Risk assessment of ciprofloxacin, flavomycin, olaquinox and colistin sulfate based on microbiological impact on human gut biota. Regul. Toxicol. Pharmacol. 53, 209-216.

Jia W, Li H, Zhao L et Nicholson JK 2008. Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting. Nature rev. Drug discovery 7, 123-129.

Jiang R, Chang X, Stoll B, Fan MZ, Arthington J, Weaver E, Campbell J et Burrin DG 2000. Dietary plasma protein reduces small intestinal growth and lamina propria cell density in early weaned pigs. J. Nutr. 130, 21-26.

Johnson LG 2005. Applications of imaging techniques to studies of epithelial tight junctions. Adv. Drug Deliv. Rev. 57, 111-121.

Johnson RW 1997. Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: An integrated view. J. Anim. Sci. 75.

Johnson IR, Ball RO, Baracos VE et Field CJ 2006. Glutamine supplementation influences immune development in the newly weaned piglet. Dev. Comp. Immunol. 30, 1191-1202.

Jung HC, Eckmann L, Yang S-K, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E et Kagnoff MF 1995. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. J. Clin. Invest. 95, 55.

Kandil HM, Berschneider HM et Argenzio RA 1994. Tumour necrosis factor alpha changes porcine intestinal ion transport through a paracrine mechanism involving prostaglandins. Gut 35, 934-940.



Kang H, Salim H, Akter N, Kim D, Kim J, Bang H, Kim M, Na J, Hwangbo J et Choi H 2013. Effect of various forms of dietary *Chlorella* supplementation on growth performance, immune characteristics, and intestinal microflora population of broiler chickens. *J. Appl. Poultry Res.* 22, 100-108.

Kapoor R et Mehta U 1993. Effect of supplementation of blue green alga (*Spirulina*) on outcome of pregnancy in rats. *Plant Food. Hum. Nutr.* 43, 29-35.

Kawanishi Y, Tominaga A, Okuyama H, Fukuoka S, Taguchi T, Kusumoto Y, Yawata T, Fujimoto Y, Ono S et Shimizu K 2013. Regulatory effects of *Spirulina* complex polysaccharides on growth of murine RSV-M glioma cells through Toll-like receptor 4. *Microbiol. Immunol.* 57, 63-73.

Kaye JJ et Chapman GB 1963. Cytological aspects of antimicrobial antibiotics III. Cytologically distinguishable stages in antibiotic action of colistin sulfate on *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 86, 536-543.

Kelly D, Smyth J et McCracken K 1991. Digestive development of the early-weaned pig. *Brit. J. Nutr.* 65, 181-188.

Kenworthy R et Crabb WE 1963. The intestinal flora of young pigs, with reference to early weaning, *Escherichia coli* and scours. *J. Comp. Pathol. Ther.* 73, 215-228.

Kenworthy R et Allen WD 1966. The significance of *Escherichia coli* to the young pig. *J. Comp. Pathol.* 76, 31-44.

Kimura Y, Shiozaki H, Hirao M, Maeno Y, Doki Y, Inoue M, Monden T, Ando-Akatsuka Y, Furuse M et Tsukita S 1997. Expression of occludin, tight-junction-associated protein, in human digestive tract. *Am. J. Pathol.* 151, 45.

King M, Kelly D, Morel P et Pluske J 2003. Aspects of intestinal immunity in the pig around weaning. *Weaning the pig: concepts and consequences*, 219-247.

Kitada K, Machmudah S, Sasaki M, Goto M, Nakashima Y, Kumamoto S et Hasegawa T 2009. Antioxidant and antibacterial activity of nutraceutical compounds from *Chlorella vulgaris* extracted in hydrothermal condition. *Separ. Sci. Technol.* 44, 1228-1239.

Klasing KC et Johnstone BJ 1991. Monokines in growth and development. *Poultry Sci.* 70, 1781-1789.

Knudsen KEB, Lærke HN, Steinfeldt S, Hedemann MS et Jørgensen H 2006. *In vivo* methods to study the digestion of starch in pigs and poultry. *Anim. Feed Sci. Tech.* 130, 114-135.



Köhler T, Verstegen M, Mosenthin R, Wensing T, Den Hartog L et Huisman J 1992. Effect of ileo-rectal anastomosis and post-valve T-caecum cannulation on growing pigs. *Brit. J. Nutr.* 68, 305-315.

Konstantinov SR, Awati AA, Williams BA, Miller BG, Jones P, Stokes CR, Akkermans AD, Smidt H et De Vos WM 2006. Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environ. Microbiol.* 8, 1191-1199.

Kong X, Wu G, Liao Y, Hou Z, Liu H, Yin F, Li T, Huang R, Zhang Y et Deng D 2007. Dietary supplementation with Chinese herbal ultra-fine powder enhances cellular and humoral immunity in early-weaned piglets. *Livest. Sci.* 108, 94-98.

Ku CS, Pham TX, Park Y, Kim B, Shin MS, Kang I et Lee J 2013. Edible blue-green algae reduce the production of pro-inflammatory cytokines by inhibiting NF- $\kappa$ B pathway in macrophages and splenocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 2981-2988.

Laine TM, Lyytikäinen T, Yliahho M et Anttila M 2008. Risk factors for post-weaning diarrhoea on piglet producing farms in Finland. *Acta Vet. Scand.* 50, 1.

Lallès J, Boudry G, Favier C, LeFloc'h N, Luron I, Montagne L, Oswald IP, Pié S, Piel C et B. S 2004. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Anim. Res.* 53, 301-311.

Lallès JP, Bosi P, Smidt H et Stokes CR 2007. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *P. Nutr. Soc.* 66, 260-268.

Laplace J, Souffrant W, Hennig U, Chabeauti E et Fevrier C 1994. Measurement of precaecal dietary protein and plant cell wall digestion in pigs; comparison of four surgical procedures for ileorectal anastomosis. *Livest. Prod. Sci.* 40, 313-328.

Le Dividich J 1981. Effects of environmental temperature on the growth rates of early-weaned piglets. *Livest. Prod. Sci.* 8, 75-86.

Le Dividich J et Herpin P 1994. Effects of climatic conditions on the performance, metabolism and health status of weaned piglets: a review. *Livest. Prod. Sci.* 38, 79-90.

Le Dividich J et Sève B 2000. Effects of underfeeding during the weaning period on growth metabolism, and hormonal adjustments in the piglet. *Dom. Anim. Endocrinol.* 19, 63-74.

Le Floc'h N, Jondreville C, Matte JJ et Seve B 2006. Importance of sanitary environment for growth performance and plasma nutrient homeostasis during the post-weaning period in piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 60, 23-34.





Le Floch N, LeBellego L, Matte JJ, Melchior D et Sève B 2009. The effect of sanitary status degradation and dietary tryptophan content on growth rate and tryptophan metabolism in weaning pigs. *J. Anim. Sci.* 87, 1686-1694.

Le Floch N, Matte J, Melchior D, Van Milgen J et Sève B 2010. A moderate inflammation caused by the deterioration of housing conditions modifies Trp metabolism but not Trp requirement for growth of post-weaned piglets. *Animal* 4, 1891-1898.

Le Huërou-Luron I et Ferret-Bernard S 2015. Development of gut and gut-associated lymphoid tissues in piglets. Role of maternal environment. In the gestating and lactating sow (ed. C Farmer), Wageningen Academic Publishers, pp. 335-356.

Lee J-Y, Yoo C, Jun S-Y, Ahn C-Y et Oh H-M 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Biores. Technol.* 101, S75-S77.

Lee AK, Lewis DM et Ashman PJ 2012. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: processes and specific energy requirements. *Biomass Bioenerg.* 46, 89-101.

Leu S et Boussiba S 2014. Advances in the production of high-value products by microalgae. *Ind. Biotechnol.* 10, 169-183.

Leonard SG, Sweeney T, Bahar B et O'Doherty JV 2012. Effect of maternal seaweed extract supplementation on suckling piglet growth, humoral immunity, selected microflora, and immune response after an ex vivo lipopolysaccharide challenge. *J. Anim. Sci.* 90, 505-514.

Leonard SG, Sweeney T, Bahar B, Lynch BP et O'Doherty JV 2011. Effect of dietary seaweed extracts and fish oil supplementation in sows on performance, intestinal microflora, intestinal morphology, volatile fatty acid concentrations and immune status of weaned pigs. *Brit. J. Nutr.* 105, 549-560.

Leung PO, Lee HH, Kung YC, Tsai MF et Chou TC 2013. Therapeutic effect of C-phycoerythrin extracted from blue green algae in a rat model of acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013, 916590.

Levy SB 1997. Antibiotic resistance: an ecological imbalance. *Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread* 207, 1-14.

Lewis A et Bayley H 1995. Amino acid bioavailability. *Bioavailability of Nutrients for Animals: Amino Acids, Minerals and Vitamins*, 35-65.

Li Z, Yi G, Yin J, Sun P, Li D et Knight C 2008. Effects of organic acids on growth performance, gastrointestinal pH, intestinal microbial populations and immune responses of weaned pigs. *Asian Austral. J. Anim. Sci.* 21, 252.



Li P, Piao X, Ru Y, Han X, Xue L et Zhang H 2012. Effects of adding essential oil to the diet of weaned pigs on performance, nutrient utilization, immune response and intestinal health. *Asian Austral. J. Anim. Sci.* 25, 1617-1626.

Li C, Yang H, Li Y, Cheng L, Zhang M, Zhang L et Wang W 2013. Novel bioconversions of municipal effluent and CO<sub>2</sub> into protein riched *Chlorella vulgaris* biomass. *Biores. Technol.* 132, 171-177.

Liang B, Wu L et Zhang X 1998. Promoting effect of *Spirulina platensis* on growth of intestinal microbiota *in vitro*. *Chin. J. Mar. Drug.* 18, 7-10.

Lipstein B et Hurwitz S 1980. The nutritional value of algae for poultry. Dried *Chlorella* in broiler diets. *Brit. Poultry Sci.* 21, 9-21.

Lipstein B, Hurwitz S et Bornstein S 1980. The nutritional value of algae for poultry. Dried *Chlorella* in layer diets. *Brit. Poultry Sci.* 21, 23-27.

Lipstein B et Hurwitz S 1983. The nutritional value of sewage-grown samples of *Chlorella* and *Micractinium* in broiler diets. *Poultry Sci.* 62, 1254-1260.

Liu J et Hu Q 2013. *Chlorella*: industrial production of cell mass and chemicals. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, 329-338.

Liu P, Piao X, Thacker P, Zeng Z, Li P, Wang D et Kim S 2010. Chito-oligosaccharide reduces diarrhea incidence and attenuates the immune response of weaned pigs challenged with k88. *J. Anim. Sci.* 88, 3871-3879.

Lochmiller RL et Deerenberg C 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* 88, 87-98.

Lopetuso LR, Scaldaferrri F, Petito V et Gasbarrini A 2013. Commensal *Clostridia*: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut pathog.* 5, 1.

Ma T et Anderson J 2006. Tight junctions and the intestinal barrier. *Physiology of the gastrointestinal tract* 2, 1559-1594.

MacDonald TT et Monteleone G 2005. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 307, 1920-1925.

Mackay CR 2001. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat. Immunol.* 2, 95-101.

Madec F, Bridoux N, Bounaix S et Jestin A 1998. Measurement of digestive disorders in the piglet at weaning and related risk factors. *Prev. Vet. Med.* 35, 53-72.

Madec F, Le Dividich J, Pluske J et Verstegen M 2003. Environmental requirements and housing of the weaned pig. *Weaning the pig: concepts and consequences*, 337-360.



Madec F, Bridoux N, Bounaix S, Cariolet R, Duval-Iflah Y, Hampson DJ et Jestin A 2000. Experimental models of porcine post-weaning colibacillosis and their relationship to post-weaning diarrhoea and digestive disorders as encountered in the field. *Vet. Microbiol.* 72, 295-310.

Manzanilla E, Nofrarias M, Anguita M, Castillo M, Perez J, Martin-Orue S, Kamel C et Gasa J 2006. Effects of butyrate, avilamycin, and a plant extract combination on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 84, 2743-2751.

McCracken BA, Spurlock ME, Roos MA, Zuchermann FA et Gaskins HR 1999. Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *J. Nutr.* 129, 613-619.

McDonald D, Pethick D, Pluske J et Hampson D 1999. Adverse effects of soluble non-starch polysaccharide (guar gum) on piglet growth and experimental colibacillosis immediately after weaning. *Res. Vet. Sci.* 67, 245-250.

McDonald D, Pethick D, Mullan B et Hampson D 2001. Increasing viscosity of the intestinal contents alters small intestinal structure and intestinal growth, and stimulates proliferation of enterotoxigenic *Escherichia coli* in newly-weaned pigs. *Brit. J. Nutr.* 86, 487-498.

Melkebeek V, Goddeeris BM et Cox E 2013. ETEC vaccination in pigs. *Vet. Immunol. Immunop.* 152, 37-42.

Menard S, Cerf-Bensussan N et Heyman M 2010. Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunol.* 3, 247-259.

Mendes-Pinto MM, Raposo MFJ, Bowen J, Young AJ et Morais R 2001. Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability. *J. Appl. Phycol.* 13, 19-24.

Mendiola JA, Jaime L, Santoyo S, Reglero G, Cifuentes A, Ibañez E et Señoráns FJ 2007. Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. *Food Chem.* 102, 1357-1367.

Meyer JH et Doty J 1988. GI transit and absorption of solid food: multiple effects of guar. *Am. J. Clin. Nutr.* 48, 267-273.

Michel C et Macfarlane G 1996. Digestive fates of soluble polysaccharides from marine macroalgae: involvement of the colonic microflora and physiological consequences for the host. *J. Appl. Bacteriol.* 80, 349-369.

Middelberg APJ 1995. Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnol. Adv.* 13, 491-551.



Milledge JJ 2011. Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Rev. Environ. Sci. Bio.* 10, 31-41.

Miller B, James P, Smith M et Bourne F 1986. Effect of weaning on the capacity of pig intestinal villi to digest and absorb nutrients. *J. Agr. Sci.* 107, 579-590.

Miller BG, Newby TJ, Stokes CR et Bourne FJ 1984. Influence of diet on postweaning malabsorption and diarrhoea in the pig. *Res. Vet. Sci.* 36, 187-193.

Miller H et Slade R 2003. Digestive physiology of the weaned pig. *Weaning the pig: concepts and consequences.* Wageningen Academic Publisher, 117-139.

Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt 2012. Plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire. p 32.

Moeser AJ, Vander Klok C, Ryan KA, Wooten JG, Little JG, Cook VL et Blisklager AT 2007. Stress signaling pathways activated by weaning mediate intestinal dysfunction in the pig. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292, 1522-1547.

Molina Grima E, Acién Fernández F et Robles Medina A 2004. 10 Downstream Processing of Cell-mass and Products. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, 215.

Molina Grima E, Belarbi EH, Acién Fernández FG, Robles Medina A et Chisti Y 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol. Adv.* 20, 491-515.

Montagne L, Pluske J et Hampson D 2003. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Anim. Feed Sci. Technol.* 108, 95-117.

Montagne L, Boudry G, Favier C, Le Huerou-Luron I, Lalles JP et Seve B 2007. Main intestinal markers associated with the changes in gut architecture and function in piglets after weaning. *Brit. J. Nutr.* 97, 45-57.

Montagne L, Le Floch N, Arturo-Schaan M, Foret R, Urdaci MC et Le Gall M 2012. Comparative effects of level of dietary fiber and sanitary conditions on the growth and health of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 90, 2556-2569.

Morist A, Montesinos J, Cusido J et Godia F 2001. Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. *Process Biochem.* 37, 535-547.

Mormède P et Hay M 2003. Behavioural changes and adaptations associated with weaning. *Weaning the pig: concepts and consequences.* Wageningen Academic Publisher, 53-60.





Morris HJ, Carrillo O, Almarales A, Bermúdez RC, Lebeque Y, Fontaine R, Llauradó G et Beltrán Y 2007. Immunostimulant activity of an enzymatic protein hydrolysate from green microalga *Chlorella vulgaris* on undernourished mice. *Enzyme Microb. Tech.* 40, 456-460.

Morris HJ, Bermudez RC, Carrillo O et Alonso ME 2008. Are the peptide sequences encrypted in food *Chlorella* protein a possible explanation for the immunostimulatory effects of microalgal supplements? *Med. Hypotheses* 70, 896.

Moughan PJ et Miner-Williams W 2013. Determination of Protein Digestibility in the Growing Pig. *Nutritional and Physiological Functions of Amino Acids in Pigs*, pp. 251-271.

Mowat AM 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 331-341.

Mowat AM et Agace WW 2014. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 667-685.

Mujtaba G, Choi W, Lee C-G et Lee K 2012. Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions. *Biores. Technol.* 123, 279-283.

Nabuurs M, Hoogendoorn A, Van der Molen E et Van Osta A 1993. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances in the Netherlands. *Res. Vet. Sci.* 55, 78-84.

Nabuurs MJA, Hoogendoorn A et Van Zijderveld FG 1994. Effects of weaning and enterotoxigenic *Escherichia coli* on net absorption in the small intestine of pigs. *Res. Vet. Sci.* 56, 379-385.

Nabuurs M, Weijert EJ, Grootendorst A et Niewold T 2001. Oedema disease is associated with metabolic acidosis and small intestinal acidosis. *Res. Vet. Sci.* 70, 247-253.

Newburg DS et Walker WA 2007. Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk. *Pediatr. Res.* 61, 2-8.

Nguyen DN, Sangild PT, Østergaard MV, Bering SB et Chatterton DE 2014. Transforming growth factor- $\beta$ 2 and endotoxin interact to regulate homeostasis via interleukin-8 levels in the immature intestine. *Am. J. Physiol.-Gastr. L.* 307, G689-G699.

Nguyen TV, Yuan L, Azevedo MS, Jeong K-I, Gonzalez A-M et Saif LJ 2007. Transfer of maternal cytokines to suckling piglets: *in vivo* and *in vitro* models with implications for immunomodulation of neonatal immunity. *Vet. Immunol. Immunop.* 117, 236-248.



Niewold T 2015. Chapter 1: General introduction—the gastrointestinal tract, the immune system and the maintenance of health. Intestinal health. Wageningen Academic Publishers, pp. 221-230.

Nir I, Nitsan Z et Vax A 1973. The influence of force feeding and of protein supplementation to the diet on the metabolisable energy of diets, digestibility of nutrients, nitrogen retention and digestive enzymes output in geese. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*, pp. 465-479.

Njaa L 1961. Determination of protein digestibility with titanium dioxide as indicator substance. *Acta Agr. Scand.* 11, 227-241.

Noblet J et Etienne M 1989. Estimation of sow milk nutrient output. *J. Anim. Sci.* 67, 3352-3359.

Nyachoti C, Omogbenigun F, Rademacher M et Blank G 2006. Performance responses and indicators of gastrointestinal health in early-weaned pigs fed low-protein amino acid-supplemented diets. *J. Anim. Sci.* 84, 125-134.

Olguín EJ, Galicia S, Angulo-Guerrero O et Hernández E 2001. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina sp.*(*Arthrospira*) grown on digested pig waste. *Biores. Technol.* 77, 19-24.

Oswald IP 2006. Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine. *Vet. Res.* 37, 359-368.

Ötleş S et Pire R 2001. Fatty acid composition of *Chlorella* and *Spirulina* microalgae species. *Journal of AOAC International* 84, 1708-1714.

Owusu-Asiedu A, Nyachoti C et Marquardt R 2003. Response of early-weaned pigs to an enterotoxigenic (K88) challenge when fed diets containing spray-dried porcine plasma or pea protein isolate plus egg yolk antibody, zinc oxide, fumaric acid, or antibiotic. *J. Anim. Sci.* 81, 1790-1798.

Ozdemir G, Karabay NU, Dalay MC et Pazarbasi B 2004. Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. *Phytother. Res.* 18, 754-757.

Pabst R, Geist M, Rothkötter H et Fritz F 1988. Postnatal development and lymphocyte production of jejunal and ileal Peyer's patches in normal and gnotobiotic pigs. *Immunology* 64, 539.

Pak W, Takayama F, Mine M, Nakamoto K, Kodo Y, Mankura M, Egashira T, Kawasaki H et Mori A 2012. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Spirulina* on rat model of non-alcoholic steatohepatitis. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 51, 227-234.



Parages ML, Rico RM, Abdala-Díaz RT, Chabrilón M, Sotiroidis TG et Jiménez C 2012. Acidic polysaccharides of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* induce the synthesis of TNF- $\alpha$  in RAW macrophages. *J. Appl. Phycol.* 24, 1537-1546.

Pardy RL, Morrison DC, Shnyra A et Royce CL 2003. Isolated algal lipopolysaccharides and use of same to inhibit endotoxin-initiated sepsis. Google Patents.

Pasare C et Medzhitov R 2004. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect.* 6, 1382-1387.

Pasparakis M 2009. Regulation of tissue homeostasis by NF- $\kappa$ B signalling: implications for inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 778-788.

Pastorelli H, Le Floch N, Merlot E, Meunier-Salaun MC, van Milgen J et Montagne L 2012. Feed restriction applied after weaning has different effects on pig performance and health depending on the sanitary conditions. *J. Anim. Sci.* 90, 4866-4875.

Patel A, Mishra S et Ghosh P 2006. Antioxidant potential of C-phycoyanin isolated from cyanobacterial species *Lyngbya*, *Phormidium* and *Spirulina* spp. *Indian J. Biochem. Bio.* 43, 25.

Pedersen KS, Holyoake P, Stege H et Nielsen JP 2011. Observations of variable inter-observer agreement for clinical evaluation of faecal consistency in grow-finishing pigs. *Prev. Vet. Med.* 98, 284-287.

Peiretti PG et Meineri G 2008. Effects of diets with increasing levels of *Spirulina platensis* on the performance and apparent digestibility in growing rabbits. *Livest. Sci.* 118, 173-177.

Peiretti P et Meineri G 2011. Effects of diets with increasing levels of *Spirulina platensis* on the carcass characteristics, meat quality and fatty acid composition of growing rabbits. *Livest. Sci.* 140, 218-224.

Person J, Lando D et Mathieu D 2011. Livre turquoise: algues, filières du futur. Édition Adebitech.

Peuhkuri K, Vapaatalo H et Korpela R 2010. Even low-grade inflammation impacts on small intestinal function. *World J. Gastroentero.* 16, 1057-1062.

Pié S, Lallès JP, Blazy F, Laffitte J, Sève B et Oswald IP 2004. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *J. Nutr.* 134, 641-647.

Piorreck M, Baasch K-H et Pohl P 1984. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochem.* 23, 207-216.



Plaza M, Herrero M, Cifuentes A et Ibáñez E 2009. Innovative natural functional ingredients from microalgae. *J. Agr. Food Chem.* 57, 7159-7170.

Pluske J, Williams I et Aherne F 1996. Maintenance of villous height and crypt depth in piglets by providing continuous nutrition after weaning. *Anim. Sci.* 62, 131-144.

Pluske J, Gaskins H, Morel P, Revell D, King M et James E 1999. The number of villus and crypt CD4+ T cells in the jejunum of piglets increases after weaning. *Manipulating pig production VII.* (Ed. PD Cranwell). Australasian Pig Science Association, Werribee, Australia, 244.

Pluske J, Hansen CF, Payne H, Mullan B, Kim J et Hampson D 2007. Gut health in the pig. *Manipulating Pig Production XI.* Australasian Pig Science Association, Brisbane, Australia pp. 147-158

Pluske JR, Hampson DJ et Williams IH 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pigs: a review. *Livest. Prod. Sci.* 51.

Podojil M, Lívanský K, Prokeš B et Wurst M 1978. Fatty acids in green algae cultivated on a pilot-plant scale. *Folia Microbiol.* 23, 444-447.

Postma PR, Miron TL, Olivieri G, Barbosa MJ, Wijffels RH et Eppink MHM 2015. Mild disintegration of the green microalgae *Chlorella vulgaris* using bead milling. *Biores. Technol.* 184, 297-304.

Prabakaran P et Ravindran AD 2011. A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. *Lett. Appl. Microbiol.* 53, 150-154.

Pugh N, Ross SA, ElSohly HN, ElSohly MA et Pasco DS 2001. Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from *Spirulina platensis*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Planta Med.* 67, 737-742.

Quesnel H, Renaudin A, Le Floc'h N, Jondreville C, Pere M-C, Taylor-Pickard J et Le Dividich J 2008. Effect of organic and inorganic selenium sources in sow diets on colostrum production and piglet response to a poor sanitary environment after weaning. *Animal* 2, 859-866.

Qureshi MA et Ali RA 1996. *Spirulina Platensis* exposure enhances macrophage phagocytic function in cats. *Immunopharm. Immunot.* 18, 457-463.

Rakhshandeh A et de Lange C 2012. Evaluation of chronic immune system stimulation models in growing pigs. *Animal* 6, 305-310.

Rantzer D, Svendsen J et Weström B 1996. Effects of a strategic feed restriction on pig performance and health during the post-weaning period. *Acta Agr. Scand.* 46, 219-226.





Rasmussen H, Martinez I, Lee J et Walter J 2009. Alteration of the gastrointestinal microbiota of mice by edible blue-green algae. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1108-1118.

Redlich J, Souffrant WB, Laplace JP, Hennig U, Berg R et Mouwen J 1997. Morphometry of the small intestine in pigs with ileo-rectal anastomosis. *Can. J. Vet. Res.* 61, 21-27.

Reilly P, O'doherty J, Pierce K, Callan J, O'sullivan J et Sweeney T 2008. The effects of seaweed extract inclusion on gut morphology, selected intestinal microbiota, nutrient digestibility, volatile fatty acid concentrations and the immune status of the weaned pig. *Animal* 2, 1465-1473.

Renz H, Brandtzaeg P et Hornef M 2012. The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 9-23.

Richards J, Gong J et De Lange C 2005. The gastrointestinal microbiota and its role in monogastric nutrition and health with an emphasis on pigs: Current understanding, possible modulations, and new technologies for ecological studies. *Can. J. Anim. Sci.* 85, 421-435.

Rigor E, Eusebio J et Garcia B 1980. Chlorella as a protein feed supplement for swine. NSDB technology Journal-National Science Development Board (Philippines).

Romay C, Ledón N et González R 1998a. Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation. *Inflamm. Res.* 47, 334-338.

Romay C, Delgado R, Ramirez D, Gonzalez R et Rojas A 2001. Effects of phycocyanin extract on tumor necrosis factor-alpha and nitrite levels in serum of mice treated with endotoxin. *Arzneimittel-Forsch.* 51, 733-736.

Romay C, Gonzalez R, Ledon N, Ramirez D et Rimbau V 2003. C-phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Curr. Protein Pept. Sci.* 4, 207-216.

Romay C, Armesto J, Ramirez D, González R, Ledon N et García I 1998b. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae. *Inflamm. Res.* 47, 36-41.

Rooke JA et Bland IM 2002. The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. *Livest. Prod. Sci.* 78, 13-23.

Ross E et Dominy W 1990. The nutritional value of dehydrated, blue-green algae (*Spirulina platensis*) for Poultry. *Poultry Sci.* 69, 794-800.

Round JL et Mazmanian SK 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 313-323.



Safi C, Zebib B, Merah O, Pontalier P-Y et Vaca-Garcia C 2014a. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 35, 265-278.

Safi C, Charton M, Ursu AV, Laroche C, Zebib B, Pontalier P-Y et Vaca-Garcia C 2014b. Release of hydro-soluble microalgal proteins using mechanical and chemical treatments. *Algal Res.* 3, 55-60.

Safi C, Frances C, Ursu AV, Laroche C, Pouzet C, Vaca-Garcia C et Pontalier P-Y 2015. Understanding the effect of cell disruption methods on the diffusion of *Chlorella vulgaris* proteins and pigments in the aqueous phase. *Algal Res.* 8, 61-68.

Sarada DL, Sreenath Kumar C et Rengasamy R 2011. Purified C-phycocyanin from *Spirulina platensis* (Nordstedt) Geitler: a novel and potent agent against drug resistant bacteria. *World J. Microbiol. Biot.* 27, 779-783.

Sarada R, Pillai MG et Ravishankar GA 1999. Phycocyanin from *Spirulina sp.*: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochem.* 34, 795-801.

Satyanarayana K, Mariano A et Vargas J 2011. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. *Int. J. Energ. Res.* 35, 291-311.

Sauerwein H, Schmitz S et Hiss S 2007. Effects of a dietary application of a yeast cell wall extract on innate and acquired immunity, on oxidative status and growth performance in weanling piglets and on the ileal epithelium in fattened pigs. *J. Anim. Physiol. An. N.* 91, 369-380.

Schepetkin IA et Quinn MT 2006. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int. Immunopharmacol.* 6, 317-333.

Seal BS, Lillehoj HS, Donovan DM et Gay CG 2013. Alternatives to antibiotics: a symposium on the challenges and solutions for animal production. *Anim. Health Res. Rev.* 14, 78-87.

Sears CL et Kaper JB 1996. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol. Rev.* 60, 167-215.

Serive B, Kaas R, Bérard J-B, Pasquet V, Picot L et Cadoret J-P 2012. Selection and optimisation of a method for efficient metabolites extraction from microalgae. *Biores. Technol.* 124, 311-320.

Shen Y, Piao X, Kim S, Wang L, Liu P, Yoon I et Zhen Y 2009. Effects of yeast culture supplementation on growth performance, intestinal health, and immune response of nursery pigs. *J. Anim. Sci.* 87, 2614-2624.



Sialelli J 2012. L'usage des antibiotiques dans la filière porcine. Bulletin de l'Académie vétérinaire de France 165, 119-122.

Sibi G et Rabina S 2016. Inhibition of Pro-inflammatory mediators and cytokines by *Chlorella vulgaris* extracts. Pharmacognosy Res. 8, 118-122.

Singh M, Reynolds DL et Das KC 2011. Microalgal system for treatment of effluent from poultry litter anaerobic digestion. Biores. Technol. 102, 10841-10848.

Smith M 1985. Expression of digestive and absorptive function in differentiating enterocytes. Annu. Rev. Physiol. 47, 247-260.

Sommer F et Bäckhed F 2013. The gut microbiota—masters of host development and physiology. Nat. Rev. Microbiol. 11, 227-238.

Song M, Liu Y, Soares J, Che T, Osuna O, Maddox C et Pettigrew J 2012. Dietary clays alleviate diarrhea of weaned pigs. J. Anim. Sci. 90, 345-360.

Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E et Isambert A 2006. Commercial applications of microalgae. J. Biosci. Bioeng. 101, 87-96.

Spreeuwenberg MAM, Verdonk JMAJ, Gaskins HR et Verstegen MWA 2001. Small intestine epithelial barrier function is compromised in pigs with low feed intake at weaning. J. Nutr. 131, 1520-1527.

Spreeuwenberg M 2002. Diet composition and gut integrity in weaned piglets. Wageningen Univ.

Stadnyk AW 2002. Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines. Can. J. Gastroenterol. Hepatol. 16, 241-246.

Stokes C, Bailey M et Wilson A 1994. Immunology of the porcine gastrointestinal tract. Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 143-150.

Stokes CR, Bailey M, Haverson K, Harris C, Jones P, Inman C, Pié S, Oswald IP, Williams BA et Akkermans AD 2004. Postnatal development of intestinal immune system in piglets: implications for the process of weaning. Anim. Res. 53, 325-334.

Sugiharto S, Henckel P et Lauridsen C 2010. Fatty acids profile of meat, mucosal sIgA concentration and production index of broiler as a response to *Chlorella sp.* administration in the diet. J. Indonesian Trop. Anim. Agric. 35, 172-178.

Suzuki T 2013. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. Cell. Mol. Life Sci. 70, 631-659.

Svensmark B, Nielsen K, Willeberg P et Jorsal S 1988. Epidemiological studies of piglet diarrhoea in intensively managed Danish sow herds. II. Post-weaning diarrhoea. Acta Vet. Scand. 30, 55-62.



Syed SA, Abrams GD et Freter R 1970. Efficiency of various intestinal bacteria in assuming normal functions of enteric flora after association with germ-free mice. *Infect. Immun.* 2, 376-386.

Tabarsa M, Shin I-S, Lee JH, Surayot U, Park W et You S 2015. An immune-enhancing water-soluble  $\alpha$ -glucan from *Chlorella vulgaris* and structural characteristics. *Food Sci. Biotechnol.* 24, 1933-1941.

Takeuchi T, Lu J, Yoshizaki G et Satoh S 2002. Effect on the growth and body composition of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* fed raw Spirulina. *Fisheries Sci.* 68, 34-40.

Tanaka K, Koga T, Konishi F, Nakamura M, Mitsuyama M, Himeno K et Nomoto K 1986. Augmentation of host defense by a unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*, to *Escherichia coli* infection. *Infect. Immun.* 53, 267-271.

Tang D, Han W, Li P, Miao X et Zhong J 2011. CO<sub>2</sub> biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO<sub>2</sub> levels. *Biores. Technol.* 102, 3071-3076.

Tojo R, Suárez A, Clemente MG, de los Reyes-Gavilán CG, Margolles A, Gueimonde M et Ruas-Madiedo P 2014. Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J. Gastroenterol.* 20, 15163-15176.

Tokuşoglu Ö et Ünal M 2003. Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *J. Food Sci.* 68, 1144-1148.

Torrallardona D, Conde MR, Badiola I, Polo J et Brufau J 2003. Effect of fishmeal replacement with spray-dried animal plasma and colistin on intestinal structure, intestinal microbiology, and performance of weanling pigs challenged with *Escherichia coli* K99. *J. Anim. Sci.* 81, 1220-1226.

Tredici M, Carlozzi P, Zittelli GC et Materassi R 1991. A vertical alveolar panel (VAP) for outdoor mass cultivation of microalgae and cyanobacteria. *Biores. Technol.* 38, 153-159.

Uma R, Sivasubramanian V et Niranjali Devaraj S 2011. Preliminary phytochemical analysis and *in vitro* antibacterial screening of green micro algae, *Desmococcus Olivaceous*, *Chlorococcum humicola* and *Chlorella vulgaris*. *J. Algal Biomass Util.* 2, 74-81.

van Beers-Schreurs H, Vellenga L, Wensing T et Breukink H 1992. The pathogenesis of the post-weaning syndrome in weaned piglets; a review. *Vet. Quart.* 14, 29-34.

Van den Broeck W, Cox E et Goddeeris BM 1999. Induction of immune responses in pigs following oral administration of purified F4 fimbriae. *Vaccine* 17, 2020-2029.





Van der Klis J et Jansman A 2002. Optimising nutrient digestion, absorption and gut barrier function in monogastrics: Reality or illusion. In, pp. 15-36. Wageningen Academic Publishers, Wageningen.

Van der Klis J, Van Voorst A et Van Cruyningen C 1993. Effect of a soluble polysaccharide (carboxy methyl cellulose) on the physico-chemical conditions in the gastrointestinal tract of broilers. *Brit. Poultry Sci.* 34, 971-983.

Van Soest Pv, Robertson J et Lewis B 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583-3597.

Vega-Lopez M, Arenas-Contreras G, Bailey M, Gonzalez-Pozos S, Stokes C, Ortega M et Mondragon-Flores R 2001. Development of Intraepithelial Cells in the Porcine Small Intestine. *J. Immunol. Res.* 8, 147-158.

Vega-López MA, Bailey M, Telemo E et Stokes CR 1995. Effect of early weaning on the development of immune cells in the pig small intestine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 44, 319-327.

Vente-Spreuwenberg M, Verdonk J, Verstegen M et Beynen A 2003. Villus height and gut development in weaned piglets receiving diets containing either glucose, lactose or starch. *Brit. J. Nutr.* 90, 907-913.

Vente-Spreuwenberg M, Verdonk J, Bakker G, Beynen A et Verstegen M 2004. Effect of dietary protein source on feed intake and small intestinal morphology in newly weaned piglets. *Livest. Prod. Sci.* 86, 169-177.

Verdonk J, Spreuwenberg M, Bakker G et Verstegen M 2001. 92 Nutrient intake level affects histology and permeability of the small intestine in newly weaned piglets. *Digestive physiology of pigs: Proceedings of the 8<sup>th</sup> Symposium*, p. 332.

Verdonk JMAJ, Bruininx EMAM, van der Meulen J et Verstegen MWA 2007. Post-weaning feed intake level modulates gut morphology but not gut permeability in weaned piglets. *Livest. Sci.* 108, 146-149.

Vetayasuporn S 2004. The potential for using wastewater from household scale fermented Thai rice noodle factories for cultivating *Spirulina platensis*. *Pak. J. Biol. Sci.* 7, 1554-1558.

Vijayavel K, Anbuselvam C et Balasubramanian M 2007. Antioxidant effect of the marine algae *Chlorella vulgaris* against naphthalene-induced oxidative stress in the albino rats. *Mol. Cell. Biochem.* 303, 39-44.



Volkman J, Jeffrey S, Nichols P, Rogers G et Garland C 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 128, 219-240.

Wang J, Chen L, Li P, Li X, Zhou H, Wang F, Li D, Yin Y et Wu G 2008. Gene expression is altered in piglet small intestine by weaning and dietary glutamine supplementation. *J. Nutr.* 138, 1025-1032.

Wathes CM, Miller BG et Bourne FJ 1989. Cold stress and post-weaning diarrhoea in piglets inoculated orally or by aerosol. *Anim. Sci.* 49, 483-496.

Wellock I, Fortomaris P, Houdijk J et Kyriazakis I 2008a. Effects of dietary protein supply, weaning age and experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection on newly weaned pigs: health. *Animal* 2, 834-842.

Wellock I, Fortomaris P, Houdijk J et Kyriazakis I 2008b. The effect of dietary protein supply, weaning age and experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection on newly weaned pigs : performance. *Animal* 2, 825-833.

Whelan K, Judd P et Taylor M 2004. Assessment of fecal output in patients receiving enteral tube feeding: validation of a novel chart. *Eur. J. Clin. Nutr.* 58, 1030-1037.

Whittemore C et Green D 2001. Growth of the young weaned pig. *The Weaner Pig—Nutrition and Management*. CAB International, Wallingford, UK, 1-15.

Wijtten PJ, van der Meulen J et Verstegen MW 2011. Intestinal barrier function and absorption in pigs after weaning: a review. *Brit. J. Nutr.* 105, 967-981.

Williams BA, Verstegen MW et Tamminga S 2001. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutr. Res. Rev.* 14, 207-228.

Wray C et Morris J 1985. Aspects of colibacillosis in farm animals. *J. Hyg.* 95, 577-593.

Wu G 1998. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J. Nutr.* 128, 1249-1252.

Wu S, Zhang F, Huang Z, Liu H, Xie C, Zhang J, Thacker PA et Qiao S 2012. Effects of the antimicrobial peptide cecropin AD on performance and intestinal health in weaned piglets challenged with *Escherichia coli*. *Peptides* 35, 225-230.

Xu R, Mellor D, Tungthanathanich P, Birtles M, Reynolds G et Simpson H 1992. Growth and morphological changes in the small and the large intestine in piglets during the first three days after birth. *J. Dev. Physiol.* 18, 161-172.

Yaakob Z, Ali E, Zainal A, Mohamad M et Takriff MS 2014. An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *J. Biol. Res.* 21, 6.



Yan L, Lim SU et Kim IH 2012. Effect of fermented *Chlorella* supplementation on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, fecal microbial and fecal noxious gas content in growing pigs. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 25, 1742-1747.

Yap TN, Wu JF, G. PW et L. K 1982. Feasibility of feeding *Spirulina maxima*, *Arthrospira platensis* or *Chlorella sp.* to pigs weaned to a dry diet at 4 to 8 days of age. *Nutr. Rep. Int.* 25, 543-552.

Yoshida M et Hoshii H 1980. Nutritive value of *Spirulina*, green algae, for poultry feed. *Japan. Poultry Sci.* 17, 27-30.

Zhang H, Malo C et Buddington RK 1997. Suckling induces rapid intestinal growth and changes in brush border digestive functions of newborn pigs. *J. Nutr.* 127, 418-426.

Zhu L, Zhao K, Chen X et Xu J 2012. Impact of weaning and an antioxidant blend on intestinal barrier function and antioxidant status in pigs. *J. Anim. Sci.* 90, 2581-2589.







# RÉSUMÉ ABSTRACT

## Effets d'une supplémentation en Spiruline et en Chlorelle sur la croissance et la santé digestive du porcelet au sevrage

Au sevrage, la séparation de la mère, le changement d'environnement et la transition d'un régime lacté à un régime solide et complexe déstabilisent les fonctions de digestion et de défense du porcelet. Le sevrage entraîne l'apparition de diarrhées nécessitant souvent l'utilisation d'antibiotiques pour contrôler les infections digestives. L'émergence de souches bactériennes antibiorésistantes est devenue un enjeu de santé publique majeur. Développer des méthodes alternatives aux antibiotiques pour promouvoir la santé du porcelet sevré est une nécessité. L'objectif de la thèse est d'évaluer le potentiel de deux microalgues – la Spiruline et la Chlorelle – pour promouvoir la santé digestive du porcelet au sevrage.

Deux essais ont été effectués chez des porcelets sevrés dans des conditions d'hygiène contrastées –standard ou dégradées– recevant ou non 1% de Spiruline ou de Chlorelle dans l'aliment. En conditions d'hygiène standard, la supplémentation en Spiruline ou en Chlorelle a amélioré la digestibilité des nutriments et la morphologie intestinale sans impact sur la croissance du porcelet sevré. En conditions d'hygiène dégradée, la supplémentation en Spiruline ou en Chlorelle a altéré les performances de croissance sans affecter sensiblement les indicateurs de la santé digestive. Dans un troisième essai, une administration orale en microalgues en amont et en aval du sevrage a été testée afin d'évaluer la capacité de la Spiruline ou de la Chlorelle à limiter la déstabilisation précoce du système digestif au sevrage. L'administration orale de Spiruline a favorisé la croissance en maternité et réduit l'occurrence des diarrhées en post-sevrage. Les mécanismes d'action potentiels des microalgues ont été suggérés mais nécessitent des investigations supplémentaires.

**Mots-clefs :** sevrage, nutrition, digestion, santé, porc, intestin, microalgues, lipopolysaccharides

## Effects of Spirulina and Chlorella supplementation on growth and digestive health in piglets at weaning

Weaning is a critical step in pig farms. Separation from the sow, change in the environment and dietary transition from liquid milk to a solid diet induces a destabilization of digestive and defense functions in weaned pig. Weaning leads to digestive disorders and growth alteration that often require antibiotic use to alleviate pathogen invasion and mortality. Bacterial resistance to antibiotics has become a major concern for public health. Thus, it has become necessary to find new strategies to promote digestive health in weaned pigs. The aim of this thesis is to evaluate the potential of two microalgae – Spirulina and Chlorella – as new functional ingredients to promote digestive health in piglets at weaning.

Two trials were conducted in pigs weaned in contrasted sanitary conditions –good or poor– and that received 1% of Spirulina or Chlorella in starter diet. In good sanitary conditions, dietary supplementation with Spirulina and Chlorella both enhanced nutrient digestibility and intestinal morphology but did not affect growth performance. In poor sanitary conditions, both Spirulina and Chlorella supplementation altered growth performance with slight effect on indicators of digestive health. In a third trial, oral administration of the two microalgae before and after weaning was assayed to evaluate the ability of Spirulina and Chlorella to limit the early intestinal changes caused by weaning. Spirulina administration before and after weaning enhanced growth in suckling piglets and reduced risk of diarrhoea outcome in weaned pigs. Potential mechanisms of action of Spirulina and Chlorella on the digestive tract of piglet have been hypothesized but necessitate further investigation.

**Keywords:** weaning, nutrition, digestion, health, pig, Intestine, microalga, Lipopolysaccharides,



AGROCAMPUS OUEST • Institut supérieur des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage  
65 rue de Saint-Brieuc – CS84215 – F-35042 Rennes Cedex  
Tél. : 02 23 48 50 00  
[www.agrocampus-ouest.fr](http://www.agrocampus-ouest.fr)

