

53

**TRANSIT BACTERIEN DANS LE TUBE DIGESTIF DE LA TRUITE
ARC-EN-CIEL**

R. LÉSEL*, B. FAUCONNEAU**, P. ALZIEU*

* Laboratoire des microorganismes

** Laboratoire de nutrition et d'élevage des poissons

Station d'hydrobiologie - INRA. Saint-Pée-sur-Nivelle, 64310 ASCAIN (FRANCE)

RÉSUMÉ - Cette étude a pour objet le transit des bactéries dans le tube digestif de la truite arc-en-ciel à 13°C et l'excrétion fécale comparée de 4 marqueurs dans le bol alimentaire, un marqueur bactérien inerte : spores de *Bacillus stearothermophilus*, un marqueur bactérien susceptible de se multiplier dans les compartiments digestifs : *Citrobacter freundii*, un marqueur de la phase liquide : polyéthylène glycol (PEG), un marqueur de la phase solide, Cr₂O₃. L'analyse montre qu'il existe deux pics d'excrétion bactérienne fécale : le premier a lieu dans les 4 premières heures qui suivent l'ingestion du repas marqué, le second pic, cent fois plus important, se produit 10 heures après le repas. Cette excrétion bimodale corrobore les observations précédentes. Les marqueurs physiques utilisés (PEG et Cr₂O₃) paraissent suivre un mode d'excrétion analogue, malgré une sensibilité moindre. Ils indiquent l'existence d'une excrétion fécale précoce. La présence d'un nombre élevé de caeca pyloriques ne paraît pas induire de modification sensible de la vitesse du transit digestif. Ces résultats montrent l'intérêt des bactéries comme marqueurs des phases liquide et solide du bol alimentaire.

Mots clés : bactérie, marqueur, bol alimentaire, phase liquide, phase solide, truite.

ABSTRACT - The present study concerns bacterial transit in the digestive tract of rainbow trout at 13°C and compares fecal excretion of 4 tracers in the alimentary bolus, an inert bacterial tracer: spores of *Bacillus stearothermophilus*, a marker bacterial susceptible to multiply in the digestive compartments: *Citrobacter freundii*; a tracer of the liquid phase: polyethylene glycol (PEG), a tracer of the solid phase: Cr₂O₃. Two peaks of fecal excretion of bacterial bodies are indicated in the results, the first one taking place within the first 4 hours following ingestion of the traced meal, the second peak, a hundred times more important, occurring 10 hours after the meal. This two-phase mode of excretion corroborates the observations previously made. The physical tracers (PEG and Cr₂O₃) utilized seem to follow the same pattern of excretion, in spite of a lesser sensitivity. They show the existence of an early faecal excretion. A high number of pyloric caeca does not seem to involve modifications of the digestive transit speed. These results show the interest of bacteria as markers of liquid and solid phases in the alimentary bolus.

Key words : bacteria, marker, alimentary bolus, liquid phase, solid phase, trout.

INTRODUCTION

Dans la majorité des cas, les relations entre bactéries et hôte dépendent étroitement du nombre de corps bactériens présents dans le tube digestif. Les bactéries absorbées *per os* doivent avoir la possibilité de se développer au cours de leur transit dans les différentes parties du tractus digestif. Une population bactérienne abondante peut manifester une capacité métabolique susceptible d'interférer avec le métabolisme de l'animal qui l'héberge. Diverses études permettent de connaître les caractéristiques de la flore des compartiments digestifs chez le poisson (Shewan, 1961; Horsley 1977; Lésel, 1981). Elles indiquent que cette flore est numériquement peu abondante (10⁴ à 10⁷ bactéries g⁻¹ de compartiment) et qualitativement dépendante de la flore du milieu environnant.

Ces caractéristiques sont en contradiction avec ce qui est observé chez les Mammifères et les Oiseaux, où l'importance métabolique de ces communautés symbiotiques de leur hôte est connue (Savage, 1977 ; Ducluzeau et Raibaud, 1979) ; elles ont conduit à l'étude des facteurs de variations quantitatives dans le tube digestif des Poissons (Lésel, 1984). Parmi ceux-ci, les conditions du transit sont importantes ; les bactéries observées *per os* doivent avoir la possibilité de se développer au cours de leur séjour dans les divers compartiments digestifs pour atteindre une densité pendant leur action effective.

Chez les Vertébrés supérieurs, le transit bactérien est le plus souvent assimilé à celui des éléments figurés fins. Pour en obtenir une représentation plus fidèle que celle donnée par des marqueurs physiques, Contrepois et Gouet (1969) ont proposé l'utilisation de spores de *Bacillus stearothermophilus* ; indépendamment de leur dimension comparable à celle de la majorité des bactéries, ces spores ont en plus une densité identique à celle de ces bactéries.

L'utilisation de ce marqueur pour l'étude du transit bactérien dans le tube digestif de la truite arc-en-ciel (Lésel et Séchet, 1982 ; Lésel et Le Gac, 1983) a montré l'existence d'une excrétion fécale en deux temps ; on observe un premier pic d'excrétion 2 à 4 heures après l'absorption du repas marqué, suivi d'un second beaucoup plus important environ 6 heures plus tard. Ce mode d'excrétion implique que le transit bactérien s'effectue suivant un schéma différent de celui de la phase solide chez la truite arc-en-ciel (Possompes *et al.*, 1975). Il rappelle celui de la phase liquide chez les animaux homéothermes (Poulakos et Kent, 1973 ; Summers *et al.*, 1976) et chez l'Homme (Jian *et al.*, 1979). Lésel et Le Gac (1983) expliquent ainsi l'apparition précoce du marqueur bactérien dans la lumière intestinale et dans les fèces des sujets étudiés.

Il devenait donc nécessaire de déterminer les conditions du transit des bactéries du bol alimentaire et de préciser si les corps bactériens pouvaient migrer avec la phase liquide du contenu digestif.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'étude décrite a pour objet la comparaison de l'excrétion fécale de quatre marqueurs :

- un marqueur bactérien inerte ;
- un marqueur bactérien susceptible de multiplication ;
- un marqueur de la phase liquide ;
- un marqueur de la phase solide.

Caractéristiques concernant les truites et leur alimentation

Les sujets utilisés étaient des truites arc-en-ciel, *Salmo gairdneri* Richardson, issues de familles génétiques sélectionnées sur le nombre d'appendices pyloriques. Ces appendices sont, chez la truite, le siège d'un transit réduit du bol alimentaire (Bergot, 1981). Ils peuvent constituer un site privilégié permettant un ralentissement, voire un arrêt de transit bactérien, favorisant ainsi une éventuelle augmentation numérique des communautés bactériennes. Afin de déterminer l'action éventuelle des caeca sur le transit bactérien, deux familles génétiques ont été utilisées : l'une possède un nombre de caeca réduit (famille A), l'autre en a un nombre important (famille B). Les truites ont subi une période d'acclimatation d'au moins 15 jours aux bacs expérimentaux. Dans la famille A le poids variait de 60 à 70 g, dans la famille B ce poids allait de 70 à 80 g. Chaque lot comprenait 21 à 22 sujets. Les essais ont été réalisés dans un circuit d'élevage en eau recyclée d'un volume de 50 m³.

Les truites recevaient deux fois par jour (repas R) un régime de maintien composé d'aliment granulé du commerce pendant la période d'acclimatation et durant l'expérimentation, les poissons étaient soumis aux conditions d'éclairage du cycle nyctéméral naturel (mai). Au cours de cette période, la température de l'eau était de $13^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Prélèvements et système de récolte

Après absorption du repas marqué (RM) tous les produits de l'excrétion fécale sont recueillis au moyen du système de récolte décrit par Choubert *et al.*, (1979). Ils sont récoltés dans des barquettes en aluminium à un rythme de prélèvement indiqué figure 1. L'échantillon est conservé à 4°C pendant 12 h au plus.

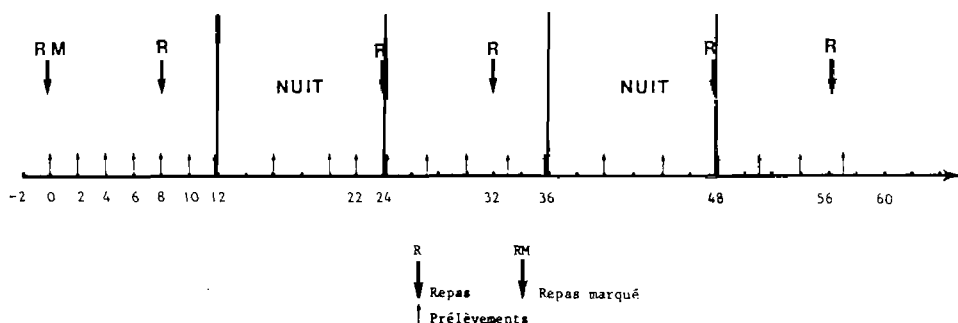


Figure 1 : Rythme des prélèvements.

Les marqueurs de transit et leur méthode d'analyse.

Les marqueurs bactériens

Le marqueur bactérien inerte qui sert de référence est constitué par les spores de *B. stearotherophilus* (B.s.) streptomycino-résistantes ($100\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de streptomycine) à raison de $2,1 \times 10^4$ bactéries g^{-1} d'aliment marqué.

Une souche streptomycino-résistante ($100\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de *Citrobacter freundii* (C.f.) isolée du tube digestif de truite a été employée comme marqueur capable de multiplication ($4,95 \times 10^6$ bactéries g^{-1} d'aliment).

Les marqueurs physiques

L'oxyde de chrome Cr_2O_3 a été utilisé comme marqueur de la phase solide du bol alimentaire (concentration : 2 %)

Le polyéthylène glycol (PEG) est l'une des substances utilisées comme marqueurs de la phase liquide (Laplace, 1972). Nous avons employé du PEG ^{14}C (activité spécifique $0,8\text{ m Ci g}^{-1}$, NEN Boston) dont le poids moléculaire moyen est de 4000 (21365 DPM g^{-1}).

Préparation et caractéristiques du granulé marqué

Le granulé marqué est préparé cinq jours avant le début d'un essai. Il est composé d'aliment commercial broyé dans lequel sont incorporés les différents marqueurs. Il est analysé bactériologiquement avant et après séchage, ainsi que le jour de sa distribution. L'analyse des marqueurs physiques se fait simultanément à celle des prélèvements.

Les contrôles effectués ont montré que les opérations de préparation de l'aliment marqué ne provoquent pas de modifications des caractéristiques des marqueurs utilisés.

Traitement des prélèvements

Analyse bactériologique

Les populations bactériennes du prélèvement sont dénombrées sur boîtes de Pétri suivant la méthode décrite par Lésel M. (1976). L'introduction dans l'aliment marqué d'un taxon bactérien susceptible de multiplication lors du transit digestif impose le suivi régulier des fluctuations de la flore dominante hétérotrophe aérobique et anaérobique facultative, elle a été dénombrée sur milieu TVG1P (Tryptone DIFCO 2,5 g.l⁻¹; extrait de viande de bœuf Merck 5 g.l⁻¹; glucose 1 g.l⁻¹; protéase peptone DIFCO 5 g.l⁻¹, pourpre de bromocrésol 0.02 g.l⁻¹; agar 10 g.l⁻¹; pH 7,5). *Citrobacter freundii* est dénombré sélectivement en présence de streptomycine (100 mg.l⁻¹) sur milieu DPTS (Fournaud et Morand-Fehr, 1965; desoxycholate de sodium 1 g.l⁻¹; protéose peptone DIFCO 15 g.l⁻¹, Tryptone 10 g.l⁻¹; sofranine 0,02 g.l⁻¹; agar 10 g.l⁻¹; pH 7,5). les spores de *B. stearothermophilus* sont obtenues et dénombrées suivant la technique décrite par Contrepois et Gouet (1969).

Si la température de germination des spores (55°C) et l'antibiorésistance suffisaient pour identifier *B.s.* dans les fèces, il n'en était pas de même pour *C.f.* Après dénombrement, 12 colonies sur 100 environ appartenant à la flore dominante développée sur milieu DPTS, ont été prélevées au hasard, levées et repiquées sur milieu de Kligler (DIFCO), toutes les souches étaient ensuite identifiées sur plaque API. ce qui a permis de suivre l'évolution de *C.f.* dans les fèces.

Analyse des marqueurs physiques

- Analyse de Cr₂O₃

L'oxyde de chrome est dosé dans l'aliment et dans les fèces selon la méthode de Bolin *et al* (1952). L'oxyde de chrome Cr₂O₃ est oxydé à chaud par l'acide perchlorique en Cr₂O₇²⁻. La coloration jaune-orangé développée par l'échantillon est lue à 440 nm (spectrophotomètre Beckman).

- Analyse du PEG

La radioactivité liée au ¹⁴C PEG est mesurée dans l'aliment et dans les fèces après digestion de la matière organique des échantillons par une amine quaternaire (Soluene 350, Packard). Le mélange scintillant utilisé permet d'atténuer le phénomène de chimio-luminescence (Dimilume, Packard). Les comptages sont réalisés sur un compteur à scintillation liquide (β Matic II, Kontron).

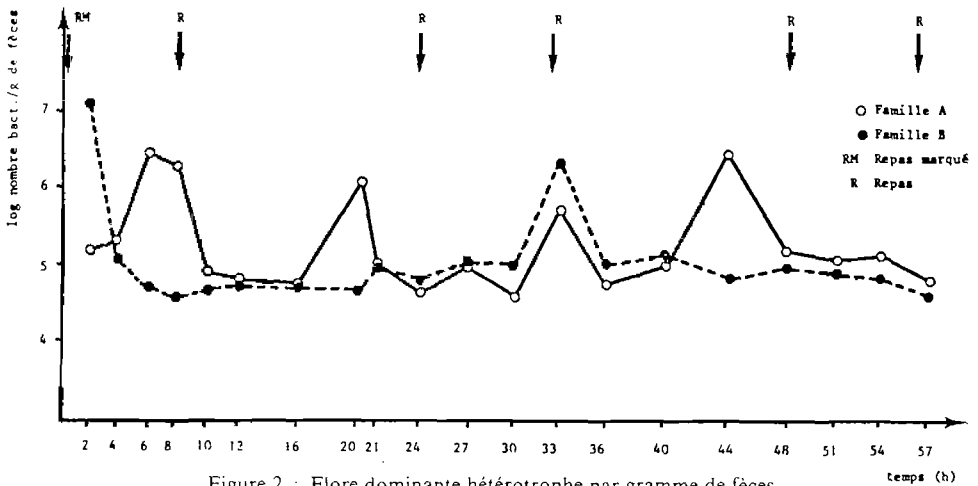


Figure 2 : Flore dominante hétérotrophe par gramme de fèces.

RÉSULTATS

Transit des marqueurs bactériens

L'évolution de la flore bactérienne hétérotrophe aérobie et anaérobie facultative (fig. 2) montre que l'excrétion dans la famille A est peu différente de celle de la famille B. Dans celle-ci en effet, elle paraît plus uniforme. L'administration de bactéries vivantes ne provoque pas de fluctuations de la flore dominante hétérotrophe fécale.

L'excrétion des marqueurs bactériens (fig. 3) est bimodale : un premier pic d'excrétion se produit dans les 4 premières heures qui suivent l'ingestion du repas marqué, suivi d'un second, 6 heures plus tard. Cette seconde phase d'excrétion indique des concentrations en corps bactériens environ 100 fois plus importantes. A ce pic succède une phase de déclin progressif du nombre de corps bactériens dans les fèces. Dans aucune des deux séries il n'a été possible d'atteindre l'arrêt de l'excrétion des spores et des bactéries antibiorésistantes.

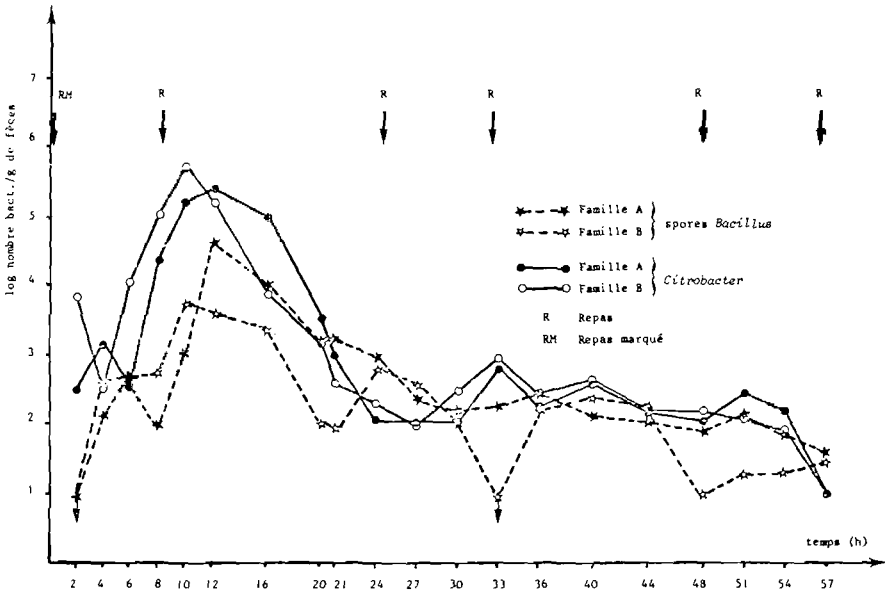


Figure 3 : Excrétion fécale bactérienne (*Citrobacter* et spores de *Bacillus*).

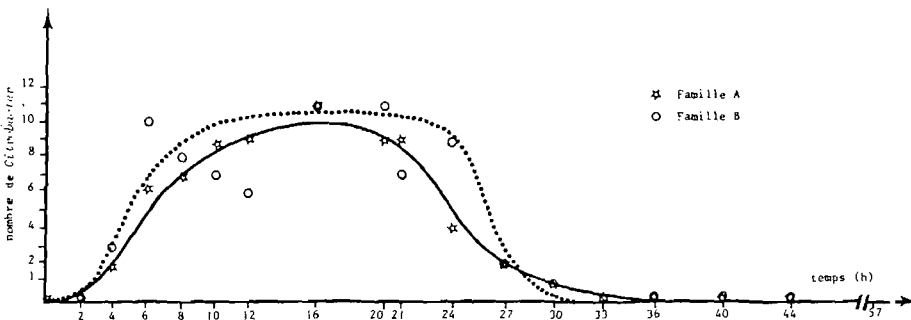


Figure 4 : Evolution du nombre de *Citrobacter* excrété dans les fèces (sur 12 colonies repiquées).

-
- BERGOT P., 1981. Structure et fonction des caeca pyloriques. In FONTAINE M. (Ed.), *Nutrition des poissons*, Actes Coll. CNERNA, Paris, Mai 1979, 45-52, CNRS, Paris.
- BOLIN D.W., KING R.P., KLOSTERMAN W.W., 1952. Simplified method for the determination of chromic oxide (Cr_2O_3) when used as an inert substance. *Science (Wash)*, 116 (3023), 634-635.
- CASTLE E.J., 1956. The rate of passage of foodstuffs through the alimentary tract of goat. I. Studies on the adult animal fed on hay and concentrates. *Br. J. Nutr.*, 10, 15-23.
- CHOUBERT G., DE LA NOUE J., LUQUET P., 1979. Continuous quantitative automatic collector for fish feces. *Prog. Fish-Cult.*, 41, 64-67.
- CONTREPOIS M., GOULI Ph., 1969. Utilisation d'une technique microbiologique pour la mesure de la vitesse de transit des microparticules dans le tractus digestif des ruminants. *C. r. hebdomadaire Séances Acad. Sci. Paris*, 268, 1757-1759.
- DUCLUZEAU R., RAIBAUD P., 1979. Ecologie microbienne du tube digestif. I vol., Masson, Paris, 95 p.
- FOURNAUD J., MORAND-FEHR C. 1965. Contribution à l'étude microbiologique de la viande désossée et congelée d'origine française. Comparaison avec quelques viandes d'autre origine. *Bull. Inst. Int. Froid. Annex. 1965-1*, 63-74.
- HORSLEY R.W., 1977. A review of the bacterial flora of Teleosts and Elasmobranchs including methods for its analysis. *J. Fish Biol.*, 10, 529-553.
- JIAN R., PECKING A., NAJEAN Y., BERNIER J.J., 1979. Etude de la progression d'un repas dans l'intestin grêle de l'homme par une méthode scintigraphique *Gastroentérol. Clin. Biol.*, 3, 755-762.
- LAPLACE J.P., 1972. Le transit digestif chez les monogastriques. I. Les techniques d'études. *Ann. Zootech.*, 21, 83-105.
- LESEL M., 1976. Etude de la microflore du tube digestif d'un salmonidé d'élevage. Mise au point technique. *Dipl. Etud. Sup. Sci. nat. Univ. Bordeaux I.*, 74 p.
- LESEL R., 1981. Microflore bactérienne du tractus digestif. In FONTAINE M. (Ed.). *Nutrition des poissons*, Actes Coll. CNERNA, Paris, Mai 1979, 89-100, CNRS/ Paris.
- LESEL R., SECHET J., 1982. Influence d'un stress de manipulation sur le transit de la microflore bactérienne digestive chez la truite arc-en-ciel *Salmo gairdneri* Richardson. *Acta Oecol. (Oecol. Appl.)*, 3, 23-33.
- LESEL R., LE GAC P. 1983. Transit of enterobacteria originating from homeotherms in fish living at low temperatures. *Aquaculture*, 31, 109-115.
- LESEL R., 1984. Flore bactérienne du tractus digestif des poissons : facteurs de variation quantitative. In : *Bactériologie marine*, Marseille, Mai 1982, 141-149, CNRS, Paris.
- POSSOMPES B.P., BERGOT P., LUQUET P., 1975. Mise au point d'une méthode d'étude du transit gastro-intestinal chez la truite arc-en-ciel *Salmo gairdneri* Richardson. Influence du nombre de repas, des quantités ingérées et de la température d'acclimatation. *Ann. Hydrobiol.*, 6, 131-143.
- POULAKOS L., KENT T.H., 1973. Gastric emptying and small intestinal propulsion in fed and fasted rats. *Gastroenterology*, 64, 962-967.
- SAVAGE D.C., 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Ann. Rev. Microbiol.*, 31, 107-133.
- SHEWAN J.M., 1961. The microbiology of sea-water fish. In BORGSTROM G. (Ed.) *Fish as food. I. Production, Biochemistry, Microbiology*, 487-560, Academic Press, New-York.
- SUMMERS R.W., HELM J., CHRISTENSEN J., 1976. Intestinal propulsion in the dog. Its relation to food intake and the migratory myoelectric complex. *Gastroenterology*, 70, 753-758.