

Développement d'un modèle d'étude du stress oxydant chez le porcelet sevré

Eric ROYER (1), Florence BARBE (2), Yvonnick ROUSSELIERE (2,3), Eric CHEVAUX (2), David GUILLOU (2,‡)

(1) IFIP-Institut du Porc, Pôle Techniques d'élevage, 34 boulevard de la Gare, 31500 Toulouse, France

(2) Lallemand SAS, Département R&D, 19 rue des Briquetiers, 31702 Blagnac, France

(3) IFIP-Institut du Porc, Pôle Techniques d'élevage, La Motte, 35651 Le Rheu, France

‡ adresse actuelle: Mixscience, Centre d'affaires Odysée, ZAC Cicé Blossac, CS 17228, 35172 Bruz cedex

eric.royer@ifip.asso.fr

Avec la collaboration technique à la station de Villefranche-de-Rouergue (France), d'A. Vaslin, B. Thomas, G. Roques, K. Marie-Louise-Bredon, S. Pons (GIE Villefranche Grand Sud), N. Lebas, L. Alibert (IFIP-institut du porc), et F. Davodeau (Veto d'Oc).

Développement d'un modèle d'étude du stress oxydant chez le porcelet sevré

Lors de deux essais, 720 porcelets sevrés ([LW×Ld]×Piétrain; 28 j) sont utilisés. Dans l'exp. 1, les facteurs étudiés sont le sexe, la vaccination ou non contre le circovirus de type 2 (PCV2), et un aliment 1^{er} âge à teneur standard en vitamine E et sélénium (SA), ou supplémenté en vitamine E, levure de sélénium et concentré de melon riche en superoxyde dismutase (HA). Dans l'exp. 2, une double vaccination contre le PCV2 et la grippe, un stress thermique (36.5°C pendant 6 h) aux jours 9, 10, 23, 24, 37 et 38, ou des contrôles sont pratiqués, et les aliments SA et HA distribués. Le sang de 6 porcelets par traitement est prélevé à j 13, 28 et 40 (exp. 1), et j 13 et 40 (exp. 2) afin de mesurer l'activité de la glutathion peroxydase (GPx), et la teneur en haptoglobine, lipides peroxydés et protéines carbonylées. Le temps de demi-hémolyse (HT50) du sang total (WB) et des hématies (RBC) exposés à une attaque anti-radicalaire contrôlée est déterminé. L'aliment HA augmente les HT50 du WB et des RBC ($P < 0,02$) dans l'exp. 2, ainsi que du WB à j13 (interaction, $P = 0,04$) et des RBC des porcs non vaccinés (interaction, $P = 0,05$) dans l'exp. 1. Il augmente également la GPx ($P = 0,01$), les lipides peroxydés ($P = 0,01$) et les protéines carbonylées ($P = 0,05$) dans l'exp. 2. La vaccination augmente l'haptoglobine dans les exp. 1 et 2, les lipides peroxydés dans l'exp. 2 ($P = 0,05$), mais diminue la GPx pour les porcs HA à j 40 (interaction, $P = 0,05$) dans l'exp. 2, et les protéines carbonylées dans les exp. 1 et 2 ($P < 0,06$). Des interactions vaccination × stress × temps ($P < 0,05$) sont observées pour les HT50 dans l'exp. 2. A j 40, le stress thermique diminue les HT50 du WB ($P = 0,01$) et des RBC ($P < 0,01$) pour les porcelets vaccinés, alors que ces effets ne sont pas observés pour les porcelets non vaccinés. En conclusion, un modèle expérimental utilisant le stress thermique et la vaccination pourrait être utile pour évaluer des stratégies de limitation du stress oxydant.

Development of an experimental model of oxidative stress in weaned piglets

A total of 720 weaned piglets ([LW×Ld]×Piétrain; 28 d of age) were used. In Exp.1, the factors were the sex, a vaccination at weaning against porcine circovirus type 2 (PCV2) or not, and phase 1 diets with standard levels of vitamin E and selenium (SA) or extra supplementation in vitamin E, selenium yeast and superoxide dismutase-rich melon supplement (HA). In Exp.2, a double vaccination against PCV2 and porcine influenza, heat stress at d 9-10, 23-24 and 37-38 (36.5°C over a 6h period) or controls, and SA or HA diets were applied. Blood samples were taken from 6 piglets per treatment at d 13, 28 and 40 in Exp.1 and d 13 and 40 in Exp.2. Serum haptoglobin, glutathione peroxidase activity (GPx), blood lipid peroxides and protein carbonyls were determined. Half-hemolysis time (HT50) of whole blood (WB) and red blood cells (RBC) exposed to a controlled free radical attack were determined. The HA supplementation increased HT50 of WB and RBC ($P < 0.02$) in Exp.2, as well as HT50 of WB at d13 (interaction, $P = 0.04$) and RBC of non-vaccinated pigs (interaction, $P = 0.05$) in Exp.1. In Exp.2, GPx increased ($P = 0.01$), whereas lipid peroxides ($P = 0.01$) and protein carbonyls ($P = 0.05$) decreased as a result of HA diet. Vaccinations increased haptoglobin in Exp.1 and 2, as well as lipid peroxides in Exp.2 ($P = 0.05$). Furthermore, the double vaccination decreased GPx activity for HA fed pigs at d 40 (interaction, $P = 0.05$) in Exp.2, and protein carbonyls in Exp.1 and 2 ($P < 0.06$). Vaccination × heat stress × time interactions ($P < 0.05$) were observed on HT50 values in Exp.2. At d 40, heat stress decreased WB ($P = 0.01$) and RBC HT50 ($P < 0.01$) for the vaccinated piglets, whereas such effects were not observed for the non-vaccinated piglets. In conclusion, an experimental model using heat stress and vaccination may be useful to assess strategies limiting oxidative stress.

INTRODUCTION

Le sevrage du porc regroupe les différentes composantes de stress (nutritionnel, immunitaire et comportemental) qui induisent un stress oxydant important (Robert *et al.*, 2009). Celui-ci correspond à un déséquilibre entre espèces réactives de l'oxygène et défenses anti-oxydantes, et est étroitement lié au système immunitaire et à l'état inflammatoire. Les réponses à ce type de stress sont très variables d'un animal à l'autre (Marco-Ramell *et al.*, 2011 ; Michiels *et al.*, 2013) et rendent complexe la standardisation des expériences *in vivo*. Des paramètres sanguins tels que la capacité anti-radicalaire du sang, la concentration en produits terminaux d'oxydation, en protéines de la phase aiguë ou en enzymes anti-oxydantes ont déjà été proposés pour le suivi du stress oxydant des animaux (Guillou *et al.*, 2009; Robert *et al.*, 2009; Michiels *et al.*, 2013). Le but de ce travail est de proposer un modèle d'étude du stress oxydatif du sevrage utilisant les effets de la vaccination, du stress thermique et de la supplémentation en antioxydants sur les marqueurs sanguins, afin de disposer de stress d'intensité reproductible.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Dispositif expérimental

Deux essais (exp. 1 et exp. 2) de 41 jours (j) sont réalisés à la station de Villefranche-de-Rouergue. Pour chaque essai, 360 porcelets femelles et mâles castrés (LW×Ld)×Piétrain sont mis en lots au sevrage [28 j d'âge et 8,4 puis 8,7 kg de poids vif (PV) moyen, respectivement pour les exp. 1 et 2.] sur la base du sexe, du PV et de la portée, puis répartis entre les traitements expérimentaux.

Lors de l'exp. 1, les porcs sont vaccinés ou non le jour du sevrage (j 1) contre le circovirus porcin de type 2 (PCV2) (PCV Suvaxyn[®]; Zoetis, Paris, France). Ils reçoivent un régime 1^{er} âge à teneur standard en antioxydants (SA) contenant les niveaux de Se (0,10 mg/kg de sélénite de sélénium ajoutée) et de vitamine E (16 UI/kg d'acétate α -tocophérol) recommandés par le NRC (2012), ou bien un régime élevé en antioxydants (HA) apportant 0,10 mg/kg de Se sous forme de sélénite de sélénium et 0,20 mg/kg sous forme de levure de sélénium (Alkosel[®], Lallemand, Blagnac, France), 100 UI de vitamine E et 30 mg/kg d'un concentré de melon (Melofeed[®], Lallemand, Blagnac, France) riche en superoxyde dismutase (SOD). L'exp. 2 compare les effets des régimes SA et HA, d'une double vaccination à j 1 contre le PCV2 et la grippe porcine (Gripovac[®] 3; Merial, Villeurbanne, France) ou non, d'un stress thermique (moyenne 36,5 °C) de 10:00 à 16:00 h à j 9, 10, 23, 24, 36 et 37 en dehors duquel la température est égale au contrôle (moyenne 27,2°C).

Les animaux sont logés dans deux salles identiques, ayant chacune 12 cases de 15 porcelets, affectées aux deux sexes lors de l'exp. 1 et aux deux conditions de température lors de l'exp. 2. Le dispositif comprend donc une case par classe de PV (lourds, moyens, légers) et par traitement pour chaque sexe lors de l'exp. 1, et une case en sexes mélangés par classe de PV et par traitement lors de l'exp. 2.

Deux aliments 1^{er} âge sont préparés avec les prémix SA et HA, et un aliment 2^{ème} âge avec le prémix SA. Pendant la dernière semaine d'allaitement, les porcelets ont accès à l'aliment 1^{er} âge SA. En post-sevrage, les porcelets reçoivent *ad libitum* l'aliment 1^{er} âge pendant 13 j, puis, sans transition après la pesée intermédiaire, l'aliment 2^{ème} âge de j 14 à 41. Les aliments 1^{er} et 2^{ème} âge sont formulés pour contenir

respectivement 10,6 et 9,8 MJ/kg d'énergie nette, et 1,26 et 1,20 g/MJ EN de lysine digestible (dig). L'apport de tryptophane est établi à un niveau légèrement limitant, soit 18,4 % de la lysine dig. Les rapports entre les autres acides aminés (méthionine, acides aminés soufrés, thréonine, valine, isoleucine, leucine et histidine) et la lysine dig. sont respectivement de 39, 60, 65, 70, 54, 96, 31% et 35, 60, 65, 68, 54, 93, 33% dans l'aliment 1^{er} et 2^{ème} âge.

1.2. Mesures, prélèvements et analyses de laboratoire

Les porcs sont pesés individuellement au sevrage puis, après mise à jeun, à j 14, 29 et 41 et j 14, 28 et 41 respectivement, pour l'exp. 1 et 2. La consommation d'aliment est mesurée par période et par loge. Après chaque retrait ou mort, la quantité restant dans le nourrisseur est pesée afin d'affecter la consommation à un effectif connu. L'état sanitaire des porcelets est observé quotidiennement et des notations par case de la consistance des fèces sont réalisées une fois par semaine selon une grille de 1 à 5 (moulu segmenté à liquide). Les deux porcelets ayant le PV le plus proche du PV moyen de chaque case sont choisis pour les prélèvements sanguins. Ceux-ci sont effectués à la veine jugulaire, entre 08:30 et 10:00 h, à j 13, 28 et 40 pour l'exp. 1, et à j 13 et 40 pour l'exp. 2. Le sang est collecté dans trois tubes de 4 ml avec gel séparateur de phase pour la concentration d'haptoglobine, avec héparine de lithium (17 UI/ml) pour l'activité de la glutathion peroxydase (GPx), avec EDTA K₂E (1,8 mg/ml) pour la détermination de la concentration en lipides et protéines oxydés et le test de capacité anti-radicalaire. Ce dernier consiste à soumettre le sang total, puis les hématies à une procédure d'hémolyse induite par les radicaux libres à l'aide d'un générateur de radicaux libres fonctionnant dans des conditions contrôlées, et décrite par Blache et Prost (1992). De chaque courbe individuelle d'hémolyse, le temps de demi-hémolyse (H50) a été extrait. La concentration en lipides peroxydés est déterminée après réaction des peroxydes biologiques avec la peroxydase et une réaction de coloration en utilisant la TMB, par photométrie à 450 nm (Kit OxyStat, Biomedica, Wien, Autriche). Pour la détermination des protéines carbonylées, les protéines plasmatiques sont dérivées par réaction avec de la DNPH, puis précipitées au TCA. L'absorbance de la protéine-hydrazone est mesurée par spectrophotométrie à 375 nm (Kit OxiSelect, Cell Biolabs Inc., San Diego, USA). L'haptoglobine est mesurée dans le sérum par un test colorimétrique (Phase Haptoglobin Assay, Tridelta Development Ltd, Maynooth, Ireland) et l'activité de la GPx est déterminée sur sang total avec le kit enzymatique Ransel (Randox, Crumlin, Royaume-Uni).

1.3. Analyses statistiques

Les performances zootechniques sont analysées pour les périodes j 1 à 14, j 14 à 41 et totale, par une analyse de variance (proc GLM de SAS 9.4, SAS Inst., Cary, NC) en utilisant la case comme unité expérimentale et en prenant en compte les effets fixes de l'aliment (A), de la simple ou double vaccination (V), de la classe de PV, du sexe (S_x) pour l'exp. 1 ou du stress thermique (ST) pour l'exp. 2, des interactions d'ordre 2 et de l'interaction A × V × S_x (ou ST). Le test de Tukey est utilisé pour les comparaisons de moyennes.

Une transformation par la méthode de Box-cox est appliquée aux teneurs en haptoglobine, et une transformation racine carrée aux valeurs GPx, protéines carbonylées (exp. 1) et lipides peroxydés (exp. 2).

Tableau 1 – Effets de l'apport en antioxydants, de la vaccination et du sexe sur les performances des porcs de l'exp. 1¹

	Antioxydants		Vaccination		Sexe		ETR	P – value ²			Interactions
	-	+	-	+	MC	F		A	V	S _x	
Effectif final (n)	171	175	175	171	176	170					
CMJ ³ , g/j											
j 0 à 14	339	314	330	323	324	329	18	<0,01	NS	NS	V×S _x ^t
j 14 à 41	978	951	969	959	969	960	57	NS	NS	NS	V×S _x ^t
j 0 à 41	760	733	751	742	749	744	40	NS	NS	NS	V×S _x ^t
GMQ ³ , g/j											
j 0 à 14	288	271	280	278	283	275	29	NS	NS	NS	NS
j 14 à 41	561	546	552	556	564	543	28	NS	NS	NS	NS
j 0 à 41	468	452	459	461	468	452	24	NS	NS	NS	NS
IC, g/g											
j 0 à 14	1,18	1,16	1,18	1,16	1,15	1,20	0,07	NS	NS	NS	A×V ^t
j 14 à 41	1,74	1,74	1,76	1,72	1,72	1,77	0,04	NS	0,07	0,01	NS
j 0 à 41 ³	1,62	1,62	1,64	1,61	1,60	1,65	0,02	NS	0,01	<0,01	V×S _x ^t

¹ Les valeurs correspondent aux moyennes ajustées calculées pour 12 cases d'un effectif final de 12 à 15 porcs chacune. La case est l'unité expérimentale.

² Analyse de la variance avec en effets fixes l'apport d'antioxydants (A), la vaccination (V), la classe de poids, le sexe (S_x) et leurs interactions. NS (non significatif) : P > 0,10, ^t P < 0,10. ETR : écart-type résiduel. ³ L'effet de la classe de poids est significatif au moins au seuil de 5 %.

Tableau 2 – Effets de l'apport en antioxydants, de la vaccination et du stress thermique sur les performances des porcs de l'exp. 2¹

	Antioxydant		Vaccination		S. thermique		ETR	P – value ²			Interactions
	-	+	-	+	-	+		A	V	ST	
Effectif final (n)	179	178	178	179	180	177					
CMJ ³ , g/j											
j 0 à 14	289	297	296	290	291	296	16	NS	NS	NS	NS
j 14 à 41	933	935	947	922	949	920	33	NS	0,09	0,05	NS
j 0 à 41	713	718	725	706	724	707	25	NS	NS	NS	NS
GMQ, g/j											
j 0 à 14	211	220	215	216	214	217	15	NS	NS	NS	NS
j 14 à 41 ³	578	576	584	570	584	569	14	NS	0,03	0,02	A×V ^t
j 0 à 41 ³	452	457	460	449	458	451	12	NS	0,04	NS	NS
IC, g/g											
j 0 à 14 ³	1,38	1,35	1,38	1,35	1,37	1,36	0,11	NS	NS	NS	NS
j 14 à 41	1,62	1,62	1,62	1,62	1,62	1,62	0,06	NS	NS	NS	NS
j 0 à 41	1,58	1,57	1,58	1,57	1,58	1,57	0,06	NS	NS	NS	NS

¹ Les valeurs correspondent aux moyennes ajustées calculées pour 12 cases d'un effectif final de 14 à 15 porcs chacune. La case est l'unité expérimentale.

² Analyse de la variance avec en effets fixes l'apport d'antioxydants (A), la vaccination (V), la classe de poids, le stress thermique (ST) et leurs interactions. NS (non significatif) : P > 0,10, ^t P < 0,10. ETR : écart-type résiduel. ³ Voir tableau 1.

L'analyse des paramètres sanguins utilise un modèle mixte (Proc Mixed de SAS), avec l'animal comme sujet des mesures répétées, incluant les effets A, V, S_x (exp. 1) ou ST (exp. 2), la classe de PV, le jour de prélèvement (J), les interactions d'ordre 2 ainsi que les interactions d'ordre 3 : A × V × J, A × J × S_x (ou ST), V × J × S_x (ST). Les comparaisons de moyennes sont effectuées à l'aide du test de Bonferroni.

2. RESULTATS

2.1. Exp. 1 : Effet sur les performances et le stress oxydant

L'exp. 1 est marquée par un épisode de maladie de l'œdème responsable de 13 des 14 pertes de l'essai, soit 3,6% de l'effectif. Les premiers morts apparaissent à j 6 et le pic de mortalité à j 10. En outre, 11 autres porcs reçoivent des soins pour cette pathologie. Ces événements concernent un nombre limité de cases (n = 7) sans différence entre traitements. A l'exception d'un porc mort à j 14, aucun de ceux retenus pour les prises de sang n'est malade ou traité. Aucun signe de diarrhée n'apparaît et la consistance des fèces ne montre aucune différence entre les traitements (note moyenne : 2,0). De j 0 à 14 (Tableau 1), les porcelets qui reçoivent l'aliment HA ont une consommation moyenne journalière (CMJ) moins élevée (P < 0,01) sans conséquence sur le gain moyen quotidien (GMQ). En 2^{ème} âge, les CMJ ne sont pas modifiées

par les traitements. L'indice de consommation (IC) des porcs vaccinés est moins élevé pour la période totale (P = 0,01). La concentration en haptoglobine (Tableau 3) est plus élevée chez les femelles (P = 0,03) comparativement aux mâles castrés. Elle atteint un maximum à j 13 puis est divisée par 3 à j 28 (P < 0,001). L'interaction V × J (P = 0,04) s'explique par un effet numérique de la vaccination (+ 42 % ; P > 0,05) seulement à j 13.

L'effet des antioxydants sur la H50 du sang total dépend du jour de prélèvement (interaction A × J ; P = 0,04). Ainsi, à j 13, les porcelets HA tendent à avoir des H50 plus élevés que les porcelets SA (P = 0,10), ce qui n'est plus le cas ensuite. L'interaction A × S_x (P = 0,04) s'explique par un effet favorable du régime HA seulement pour les femelles (P = 0,04). Pour les hématies, l'interaction A × V (P = 0,05) est liée, parmi les porcs non vaccinés, à des H50 augmentés avec l'aliment HA par rapport à l'aliment SA (NS).

L'activité de la GPx s'élève fortement de j 13 à 28 (P < 0,001) puis retrouve en fin de post-sevrage une valeur proche de celle du premier prélèvement. Cette hausse est numériquement plus prononcée avec le régime HA (+82%) qu'avec SA (+66 %) expliquant l'interaction A × J (P = 0,02). La concentration sanguine en lipides peroxydés est doublée de j 13 à 28 alors que celle des protéines carbonylées est diminuée de 29 %. Puis, à j 40, les concentrations des deux marqueurs sont légèrement supérieures à celles du premier prélèvement.

La teneur en protéines carbonylées est plus faible pour les porcs vaccinés en comparaison avec les non vaccinés ($P = 0,05$), particulièrement s'ils reçoivent l'aliment HA ($P = 0,08$), et à j 28 et 40.

2.2. Exp. 2 : Effet sur les performances et le stress oxydant

Lors de l'exp. 2, la totalité des porcs est vaccinée contre la maladie de l'œdème (Ecoporc Shiga, IDT Biologika GmbH, Dessau-Rosslau, Allemagne) entre 4 et 6 j d'âge. Le nombre de pertes ($n = 3$ porcs) et de traitements ($n = 4$ porcs) reste limité, et aucun cas de maladie de l'œdème n'apparaît. Les traitements ne modifient pas les notes de fèces (note moyenne : 2,4). De j 0 à 14, les traitements n'influencent pas les performances (Tableau 2). Pendant le 2^{ème} âge, la CMJ tend à être diminuée par la vaccination ($P = 0,09$). Fait intéressant, les porcs soumis à la répétition d'un stress thermique aux jours 9 et 10, 23 et 24, et 36 et 37 n'ont une CMJ inférieure que lors de la période de j 28 à 41 (données non présentées ; $P < 0,01$). Le GMQ de 2^{ème} âge est diminué par la vaccination ($P = 0,03$) et le stress thermique ($P = 0,02$). Cependant, une interaction A x V tend à être significative ($P = 0,06$), résultant d'un GMQ inférieur des porcelets vaccinés par rapport aux non vaccinés (564 vs 591 g/j, $P = 0,03$) lorsque l'aliment SA est distribué. Pour l'ensemble des périodes, l'IC n'est pas modifié par les traitements.

La concentration en haptoglobine est augmentée par la vaccination ($P < 0,001$) et n'est pas modifiée par les autres traitements (Tableau 4). Les porcelets nourris avec le régime HA montrent une capacité anti-radicalaire plus élevée du sang total et des hématies. Des interactions entre le stress thermique et la vaccination interviennent en fin d'essai ($V \times ST \times J$; $P < 0,05$). En effet, sans vaccination, les porcelets exposés au stress thermique ont des H50 à j 40 équivalents à ceux des porcelets maintenus à la thermoneutralité, alors que s'ils sont vaccinés, les porcelets ont, après un stress thermique, des H50 plus faibles du sang total ($P = 0,01$) et des hématies ($P < 0,01$). L'activité de la GPx est augmentée par le régime HA ($P = 0,01$). La vaccination est à l'origine d'une baisse non significative de la concentration en GPx ($P = 0,14$), plus prononcée à j 40 pour les porcelets ayant reçu le régime HA ($A \times V \times J$; $P = 0,05$). Les quantités de lipides peroxydés sont augmentées par la vaccination ($P < 0,001$) et diminuées par le régime HA ($P = 0,01$). Des interactions $V \times ST$ ($P = 0,02$) et $ST \times J$ ($P < 0,01$) sont observées. Sans stress thermique, les porcs vaccinés ont à j 13 plus de lipides peroxydés comparativement aux porcelets non vaccinés (1355 vs 336 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0,01$). Au contraire, pour les porcelets exposés au stress thermique, la vaccination n'a pas d'effet sur les lipides peroxydés (444 vs 395 $\mu\text{mol/L}$, $P > 0,15$). Enfin, la concentration en protéines carbonylées est diminuée par l'aliment HA ($P = 0,05$) et tend à l'être par la vaccination ($P = 0,06$). L'interaction $A \times V$ ($P < 0,001$) s'explique par une concentration à j 13 inférieure pour les porcs recevant l'aliment HA et vaccinés, par rapport aux porcs HA non vaccinés ($P = 0,01$), ou aux porcs SA et vaccinés ($P < 0,01$). À j 40, les teneurs convergent et sont plus faibles qu'à j 13 ($P < 0,001$).

3. DISCUSSION

Peu d'effets directs de l'apport d'antioxydants sur la performance sont observés dans cette étude, conformément aux résultats précédents sur les quantités de sélénium ou de vitamine E (Young *et al.*, 1976; Guillou *et al.*, 2009).

Le stress thermique se traduit par une réduction de la CMJ et du GMQ de 2^{ème} âge de l'exp. 2 en accord avec l'étude de Hicks *et al.* (1998). Les effets de la vaccination divergent entre les deux essais.

La simple vaccination entraîne un meilleur IC dans l'exp. 1. A l'inverse, la double vaccination au sevrage dans l'exp. 2 entraîne des baisses de la CMJ et du GMQ de 2^{ème} âge, mais qui sont limitées par l'apport d'antioxydants aux porcelets. La concentration nettement plus élevée en haptoglobine lors du premier prélèvement de l'exp. 1 signale probablement une situation modérée d'inflammation et d'infection provoquée par la maladie de l'œdème. Le sevrage se caractérise par une hausse de la teneur en haptoglobine (Sauerwein *et al.*, 2005; Robert *et al.*, 2009). Dans notre étude, l'effet de la simple vaccination n'est que transitoire dans l'exp. 1 alors que celui de la double vaccination se maintient lors de l'exp. 2. Ni le stress thermique, conformément aux résultats de Hicks *et al.* (1998), ni l'apport d'antioxydants n'influencent cette concentration. Lors du test d'hémolyse, les antioxydants présents dans l'échantillon réagissent avec les radicaux libres, et retardent le début des réactions d'oxydation. Le test permet d'évaluer ainsi la quantité d'antioxydants du sang et des globules rouges. Les temps de demi-hémolyse à j 13 sont proches dans les deux essais et supérieurs à ceux relevés 11 jours après le sevrage par Guillou *et al.* (2009). Nos essais indiquent, au cours du post sevrage, une légère réduction de la résistance du sang total alors que celle des hématies évolue peu, en accord avec les résultats de Young *et al.* (1976) et de Guillou *et al.* (2009). Les hématies sont riches en enzymes anti-oxydantes telles que la catalase, la SOD et la GPx. Leur concentration est souvent augmentée par un mécanisme d'adaptation en cas de stress oxydant modéré mais diminue lorsque ce stress devient trop important. La cinétique de l'activité de la GPx diffère entre les deux essais. Elle est initialement plus importante dans l'exp. 1 où elle atteint un maximum après 4 semaines puis diminue. Au contraire, elle s'élève progressivement pendant l'exp. 2, ce qui indique que le stress oxydant du sevrage est progressivement corrigé (Petrovič *et al.*, 2009).

Robert *et al.* (2009) soulignent que l'emploi des marqueurs d'oxydation des lipides pour évaluer le stress oxydant est complexe, compte tenu du faible niveau de lipides circulant chez le porcelet après le sevrage. Les concentrations en lipides peroxydés sont comparables en début et en fin de la période de post-sevrage dans les deux essais mais les effets du régime et de la vaccination ne sont significatifs que lors de l'exp. 2. L'exp. 1 révèle un pic à j 28 qui coïncide avec celui de la GPx connue pour participer à la destruction des lipides peroxydés. Lors des deux essais, les porcs recevant l'aliment HA et vaccinés ont de plus faibles concentrations plasmatiques de protéines carbonylées. Celles-ci sont un marqueur usuel du stress oxydant bien que des résultats contradictoires soient fréquents selon Lykkesfeldt et Svendsen (2007). Ainsi, l'évolution de leur concentration lors d'un stress diffère entre les porcs (Marco-Ramell *et al.*, 2011). La réduction des protéines carbonylées circulantes, suite à la vaccination, pourrait indiquer l'intervention du foie dans les mécanismes de détoxification (Tkachenko *et al.*, 2014).

Dans l'étude, les vaccinations induisent une réponse oxydante plus marquée dans l'exp. 2 grâce au double challenge vaccinal et à une moindre stimulation basale des porcelets. Celle-ci reste identifiable dans l'exp. 1 malgré l'évènement sanitaire décrit plus haut. Le virus de la grippe et le PCV2 contribuent à augmenter le stress oxydant (Schwarz, 1996; Chen *et al.*, 2012a). La vaccination interagit avec les autres facteurs de stress étudiés.

Tableau 3 – Effets de l’apport en antioxydants, de la vaccination et du sexe sur le stress oxydant des porcs de l’exp. 1¹

Critère ³	Date	Antioxydants		Vaccination		Sexe		ETR	P – value ^{2,4}				Interactions
		-	+	-	+	MC	F		A	V	S _x	J	
Haptoglobine, g/l	j 13	1,90	1,78	1,52	2,16	1,41	2,24	0,69	NS	NS	0,03	<0,001	V×J*
	j 28	0,54	0,50	0,64	0,40	0,49	0,54						
	j 40	0,54	0,54	0,59	0,49	0,46	0,61						
H50, sang total, min	j 13	130	142	137	135	134	138	10	0,09	NS	NS	<0,001	A×S _x *, A×J*
	j 28	117	120	121	116	119	118						
	j 40	115	119	119	115	118	116						
H50, hématies, min	j 13	96	97	97	95	94	98	9	NS	NS	NS	<0,001	A×V*, A×S _x ×J*
	j 28	85	89	89	85	89	86						
	j 40	102	106	103	105	105	104						
GPx, 1000 × IU/l	j 13	19,2	19,1	19,1	19,1	19,9	18,4	0,3	NS	NS	NS	<0,001	A×J*, S _x ×J*
	j 28	32,0	34,9	34,0	32,9	32,3	34,6						
	j 40	16,3	16,0	16,2	16,2	16,1	16,2						
Lipides peroxydés, µmol/l	j 13	724	735	686	774	918	541	681	NS	NS	NS	<0,001	NS
	j 28	1 731	1 520	1 364	1 888	1 740	1 511						
	j 40	874	855	861	868	871	858						
Protéines carbonylées, µmol/l	j 13	4,33	4,48	4,30	4,51	4,21	4,60	0,10	NS	0,05	NS	<0,001	NS
	j 28	3,11	2,78	3,33	2,55	2,94	2,94						
	j 40	4,72	4,40	4,85	4,27	4,41	4,70						

¹ Les valeurs correspondent aux moyennes ajustées calculées pour 23 ou 24 porcs pour l’activité de la GPx et les concentrations en haptoglobine, lipides peroxydés et protéines carbonylées, et 16 porcs pour les autres critères. ² Analyse de variance (modèle mixte) incluant les effets de l’apport d’antioxydants (A), de la vaccination (V), du sexe (S_x), de la classe de poids et du jour de prélèvement (J), et leurs interactions d’ordre 2 ainsi que les interactions d’ordre 3 : A×V×J, A×J×S_x et V×J×S_x, avec l’animal comme sujet des mesures répétées. NS (non significatif) : P > 0,10, * P < 0,05. ETR: écart-type résiduel. ³ H50: temps de demi-hémolyse, GPx: glutathion-peroxydase. ⁴ L’effet de la classe de poids n’est jamais significatif (P > 0,05).

Tableau 4 - Effets de l’apport en antioxydants, de la vaccination et du stress thermique sur le stress oxydant des porcs de l’exp. 2¹

Critère ³	Date	Antioxydants		Vaccination		S. thermique		ETR	P – value ^{2,4}				Interactions
		-	+	-	+	-	+		A	V	ST	J	
Haptoglobine, g/l	j 13	0,76	0,82	0,46	1,12	0,67	0,90	0,57	NS	<0,001	NS	NS	NS
	j 40	0,58	0,63	0,43	0,78	0,53	0,68						
H50, sang total, min	j 13	127	142	136	133	132	137	12	<0,01	NS	0,08	0,07	ST×J**, V×ST×J*
	j 40	125	131	130	127	138	119						
H50, hématies, min	j 13	90	100	95	95	94	97	11	0,02	NS	0,04	NS	ST×J**, V×ST×J*
	j 40	92	102	97	97	107	87						
GPx, 1000 × IU/l	j 13	13,3	16,3	15,4	14,2	14,4	15,2	0,2	0,01	NS	NS	<0,001	A×V×J*
	j 40	23,3	27,6	26,8	24,0	25,6	25,2						
Lipides peroxydés, µmol/l	j 13	726	539	365	900	846	419	123	0,01	<0,001	NS	NS	V×ST*, ST×J**
	j 40	990	520	538	972	561	948						
Protéines carbonylées, µmol /l	j 13	5,71	5,11	5,68	5,15	5,21	5,62	1,07	0,05	0,06	NS	<0,001	A×V**
	j 40	3,02	2,92	3,04	2,90	3,04	2,90						

¹ Voir Tableau 3. ² Analyse de variance (modèle mixte) incluant les effets de l’apport d’antioxydants (A), de la double vaccination (V), du stress thermique (ST), de la classe de poids et du jour de prélèvement (J), et leurs interactions d’ordre 2 ainsi que les interactions d’ordre 3 : A×V×J, A×J×ST et V×J×ST, avec l’animal comme sujet des mesures répétées. NS (non significatif) : P > 0,10, * P < 0,05, ** : P < 0,01. ETR: écart-type résiduel. ⁴ L’effet de la classe de poids n’est pas significatif au seuil de 5 % sauf pour l’haptoglobine (P<0,01) et les lipides peroxydés (P=0,04).

Elle intervient dans la capacité anti-radicalaire sanguine en annulant l’effet favorable des antioxydants dans l’exp. 1 et en renforçant l’effet du stress thermique dans l’exp. 2. Elle réduit l’activité de la GPx et augmente la peroxydation des lipides dans l’exp. 2. Chen *et al.* (2012b) montrent que le PCV2 diminue l’activité de la GPx, mais augmente aussi les niveaux d’ARNm de la GPx, suggérant un rôle de la GPx dans les mécanismes de défense contre le PCV2.

Le stress thermique augmente la production de radicaux libres et affaiblit la capacité anti-oxydante, conduisant à des concentrations plus élevées de malondialdéhyde (MDA) dans le sang de poulet (Altan *et al.*, 2003) et dans le muscle porcin (Yang *et al.*, 2014), à une accumulation de protéines modifiées par le MDA (Rosado Montilla *et al.*, 2014) et de lipides peroxydés (Altan *et al.*, 2003). Le stress thermique ne modifie les performances ou les biomarqueurs qu’en fin de période de 2^{ème} âge. Une explication possible serait que la température appliquée ne s’écarte pas assez de la zone de thermoneutralité du porcelet au

début du post sevrage. La synergie entre la vaccination et le stress thermique est l’un des résultats les plus intéressants de la présente étude. Alors que la vaccination seule n’influence pas la capacité anti-radicalaire sanguine, le stress thermique se traduit par une diminution de cette capacité en fin d’essai chez les porcs vaccinés. Paradoxalement, la hausse en lipides peroxydés à j 13 résultant de la vaccination est annulée chez les porcelets exposés aux températures élevées, alors que les effets de la vaccination et du stress thermique sont additifs au jour 40.

Le stress thermique n’occasionne pas de réponse inflammatoire, en accord avec Rosado-Montilla *et al.* (2014). Notre expérience ne détecte pas d’impact sur la GPx, alors que des activités inférieures de la SOD et de la catalase sont observées par Yang *et al.* (2014) dans le muscle de porc et, inversement, des augmentations pour la catalase, la SOD et la GPx par Altan *et al.* (2003) en accord avec Rosado Montilla *et al.* (2014). Cependant dans ces études, les analyses sont réalisées moins d’une journée après l’exposition à la

chaleur, alors que les réactions pro-oxydantes puis les activités des enzymes anti-oxydantes sont induites. Cette compensation intervient rapidement et Rosado Montilla *et al.* (2014) ne détectent plus de production de radicaux libres ou d'enzymes anti-oxydantes après 3 jours d'exposition, ce qui correspond à l'intervalle entre les périodes d'exposition et de prélèvement de l'exp. 2. Cet intervalle a également pu limiter les réponses mesurées au début de notre essai.

La supplémentation effectuée dans l'aliment HA correspond à plusieurs antioxydants : SOD, sélénium, vitamine E. Dans l'étude, ces antioxydants augmentent l'activité de la GPx et diminuent la concentration en produits de l'oxydation. La capacité anti-radicalaire sanguine est améliorée à la fin de la distribution de l'aliment HA, en accord avec les résultats de Guillou *et al.* (2009), et se maintient après l'arrêt de la supplémentation dans l'exp. 2. La double vaccination interagit avec les antioxydants, en limitant leur effet favorable sur la hausse de l'activité de la GPx pendant le post-sevrage. Mais elle concourt également à une moindre oxydation des protéines en synergie avec l'apport d'antioxydants.

CONCLUSION

Ce travail confirme que la supplémentation en antioxydants n'influence pas les performances, mais a un effet positif sur la résistance sanguine et le statut oxydant. Par ailleurs, l'étude montre la sensibilité des marqueurs sanguins aux modifications du statut de stress oxydant. Le modèle de l'exp. 2 est plus efficace que celui de l'exp.1.

L'emploi dans l'exp. 2 d'une double vaccination contre le PCV2 et la grippe porcine et la répétition de périodes de stress thermique, au lieu d'une simple vaccination lors de l'exp. 1, permettent d'obtenir une réponse pour un plus grand nombre de marqueurs sanguins. La double vaccination influence les marqueurs des fonctions inflammatoire, enzymatique, et les produits de l'oxydation. La capacité anti-radicalaire sanguine n'est pas affectée par les effets simples de la vaccination ou du stress thermique, mais est diminuée par les deux facteurs cumulés. Ils favorisent conjointement la peroxydation des lipides après plusieurs expositions aux températures élevées. Le choix des périodes de prélèvements sanguins et de stress thermique, l'intensité de celui-ci peuvent être précisés par des travaux complémentaires. Un tel modèle permet de renforcer et standardiser le stress oxydant du sevrage en appliquant des challenges facilement reproductibles. Il pourrait donc être utilisé pour évaluer les stratégies permettant de prévenir ou limiter le stress oxydant.

REMERCIEMENTS

Cette étude a bénéficié de soutiens financiers de Lallemand SAS, du Programme national de développement agricole et rural (PNDAR), du Fonds unique interministériel (FUI) et de plusieurs collectivités territoriales (régions Provence-Alpes-Côte d'Azur et Languedoc-Roussillon, département du Vaucluse et Agglomération d'Avignon). Les auteurs remercient tout particulièrement S. André et P.-H. Pitel (Labéo - Frank Duncombe), F. Montagnon (Cooperl) et G. Poudevigne (Socsa).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Altan Ö., Pabuçcuoğlu A., Altan A., Konyalıoğlu S., Bayraktar H., 2003. Effect of heat stress on oxidative stress, lipid peroxidation and some stress parameters in broilers. *Brit. Poult. Sci.*, 44(4), 545-550.
- Blache D., Prost M., 1992. Free radical attack: Biological test for human resistance capability. In *Proceedings of the IX College Park Colloquium on Chemical Evolution: A Lunar-Based Chemical Analysis Laboratory (LBCAL 1989)*. NASA, Washington D.C., 82-98.
- Chen X., Ren F., Hesketh J., Shi X., Li J., Gan F., Huang K., 2012a. Reactive oxygen species regulate the replication of porcine circovirus type 2 via NF-κB pathway. *Virology*, 426, 66-72.
- Chen X., Ren F., Hesketh J., Shi X., Li J., Gan F., Huang K., 2012b. Selenium blocks porcine circovirus type 2 replication promotion induced by oxidative stress by improving GPx1 expression. *Free Rad. Biol. Med.*, 53, 395-405.
- Guillou D., Launay C., Durand P., Prost M., 2009. Effet de la supplémentation en vitamine E et en sélénium organique sur la mesure du potentiel global de défense anti-radicalaire des porcelets. *Journées Rech. Porc.*, 41, 195-196.
- Hicks T., McGlone J.J., Whisnant C.S., Kattesh H.G., Norman R.L., 1998. Behavioral, endocrine, immune, and performance measures for pigs exposed to acute stress. *J. Anim. Sci.*, 76, 474-483.
- Lykkesfeldt J., Svendsen O., 2006. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *The Vet. J.*, 173, 502-511.
- Marco-Ramell A., Pato R., Peña R., Saco Y., Manteca X., Ruiz de la Torre J.L., Bassols A., 2011. Identification of serum stress biomarkers in pigs housed at different stocking densities. *The Vet. J.*, 190, e66-e71.
- Michiels J., De Vos M., Missotten J., Olyn A., De Smet S., Van Ginneken C., 2013. Maturation of digestive function is retarded and plasma antioxidant capacity lowered in fully weaned low birth weight piglets. *Brit. J. Nutr.*, 109, 65-75.
- Petrovič V., Novotný J., Hisira V., Link R., Leng L., Kováč G., 2009. The impact of suckling and post-weaning period on blood chemistry of piglets. *Acta Vet. Brno*, 78, 365-371.
- Robert F., Bebin K., Garrau J.M., Gueriot J.F., Foret R., Brack M., Garrel C., 2009. Evaluation et correction du stress oxydatif du porcelet en post-sevrage. *Journées Rech. Porcine*, 41, 173-178.
- Rosado Montilla S.I., Johnson T.P., Pearce S.C., Gardan-Salmon D., Gabler N.K., Ross J.W., Rhoads R.P., Baumgard L.H., Lonergan S.M., Selsby J.T., 2014. Heat stress causes oxidative stress but not inflammatory signaling in porcine skeletal muscle. *Temperature*, 1(1), 42-50.
- Sauerwein H., Schmitz S., Hiss S., 2005. The acute phase protein haptoglobin and its relation to oxidative status in piglets undergoing weaning-induced stress. *Redox Rep.*, 10(6), 295-302.
- Schwartz K.B., 1996. Oxidative stress during viral infection: a review. *Free Radic. Biol. Med.*, 21(5), 641-649.
- Tkachenko H., Kurhaluk N., Grudniewska J., Andriichuk A., 2014. Tissue-specific responses of oxidative stress biomarkers and antioxidant defenses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* during a vaccination against furunculosis. *Fish Physiol. Biochem.*, 40, 1289-1300.
- Yang P., Hao Y., Feng J., Lin H., Feng Y., Wu X., Yang X., Gu X., 2014. The expression of carnosine and its effect on the antioxidant capacity of *longissimus dorsi* muscle in finishing pigs exposed to constant heat stress. *Asian Aust. J. Anim. Sci.*, 27(12), 1763-1772.
- Young L.G., Lumsden J.H., Lun A., Claxton J., Edmeades D.E., 1976. Influence of dietary levels of vitamin E and selenium on tissue and blood parameters in pigs. *Can. J. Comp. Med.*, 40, 92-97.