

# Effet de deux sources d'oxyde de zinc sur différents paramètres de la muqueuse intestinale de porcelets

Agathe ROMÉO (1), Noémie VAN NOTEN (2), Jeroen DEGROOTE (2), Wei WANG (2), Joris MICHIELS (2)

(1) ANIMINE, 74330 Sillingy, France

(2) Université de Gand, Département des Biosciences Appliquées, 9000 Gand, Belgique

aromeo@animine.eu

## Effects of zinc oxide sources and doses on criteria of the intestinal mucosa

Zinc oxide (ZnO) can be supplied at a pharmacological dose (2400 ppm of Zn) in feeds of weaned piglets to improve performance by adjusting gut health. In this study, two ZnO sources were compared at different doses: 110 ppm or 2400 ppm of Zn from standard ZnO (+ 100 or 500 ppm of Fe from FeSO<sub>4</sub>) vs. 110 ppm or 220 ppm of Zn from potentiated ZnO HiZox<sup>®</sup> (+ 500 ppm of Fe from FeSO<sub>4</sub>). The higher iron level was used to induce gastro-intestinal disturbances. Each treatment was replicated in 4 pens (2 piglets per pen, weaned at 21 days) for 15 days. At the end of the trial, gut integrity was evaluated in Ussing chambers. Supplementary analyses by qPCR (expression of gene coding for tight junction proteins and alkaline phosphatase) and measurement of Zn concentration in mucosa were performed for treatments with the higher iron level. Compared to standard ZnO at the nutritional level, potentiated ZnO increased transepithelial electrical resistance (TEER) of jejunal mucosa ( $P < 0.05$ ) and gene expression for alkaline phosphatase ( $P < 0.05$ ), claudin 1 ( $P = 0.08$ ) and zona occludens ( $P = 0.09$ ). Zn concentration in mucosa was significantly higher ( $P < 0.05$ ) with potentiated ZnO than with standard ZnO at the same dose. In conclusion, potentiated ZnO at a low dose showed positive effects on piglet mucosa, with different modes of action (e.g. stimulation of tight junction expression, improvement of inflammatory status).

## INTRODUCTION

Dans certains pays européens et hors Europe, l'oxyde de zinc (ZnO) peut être supplémenté à dose pharmacologique (environ 2500 ppm de Zn) pour améliorer les performances de croissance des porcelets sevrés et diminuer la dégradation de leur santé intestinale (Starke *et al.*, 2014). Son mode d'action n'est pas complètement élucidé à l'heure actuelle.

Une étude récente comparant une source de ZnO standard et une source de ZnO potentialisé a montré des effets significativement différents au niveau de la muqueuse intestinale (Roméo *et al.*, 2017). Suite à ce travail, des analyses complémentaires ont été réalisées pour identifier le mode d'action des deux sources de ZnO, notamment leur effet sur les jonctions serrées et sur le statut inflammatoire du porcelet.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Animaux et aliments expérimentaux

L'étude a été conduite sur deux bandes de 24 porcelets mâles et femelles (Topics x Pietrain), répartis dans 12 cases de 2,1 m<sup>2</sup>, avec deux jours d'écart entre les deux répétitions de l'essai. Chaque répétition débutait au sevrage des porcelets (à 21 jours, pour un poids de 6,0 ± 1,5 kg) et durait 15 jours.

Les animaux ont consommé *ad libitum* un mélange à base d'orge, de maïs, de blé et de tourteaux de soja (18% de protéines, 2400 kcal EN/kg). Les aliments comportaient environ 40 ppm de Zn et 130 ppm de Fe endogènes, avant d'être

supplémentés : (T1) 110 ppm Zn de ZnO standard + 100 ppm Fe, (T2) 2400 ppm Zn de ZnO standard + 100 ppm Fe, (T3) 110 ppm Zn de ZnO standard + 500 ppm Fe, (T4) 2400 ppm Zn de ZnO + 500 ppm Fe, (T5) 110 ppm Zn de ZnO potentialisé (HiZox<sup>®</sup>) + 500 ppm Fe et (T6) 220 ppm Zn de ZnO potentialisé + 500 ppm Fe.

### 1.2. Analyses

Les porcelets ont été euthanasiés après 15 jours d'essai. Le tractus gastro-intestinal a été prélevé. Un segment de jéjunum de 30 cm, situé à 75% de la longueur totale de l'intestin grêle, a été conservé pour des tests en chambres d'Ussing (Carlson *et al.*, 2004) et pour des analyses complémentaires en laboratoires. Ces dernières ont été réalisées uniquement sur les traitements avec un dosage élevé en fer (T3, T4, T5 et T6). Les ARNm codant pour les protéines des jonctions serrées et pour la phosphatase alcaline intestinale (PAL) ont été quantifiés par qPCR, relativement aux gènes de ménage de référence (TBP, PPIA, HPRT1). La concentration de zinc dans la muqueuse a également été mesurée.

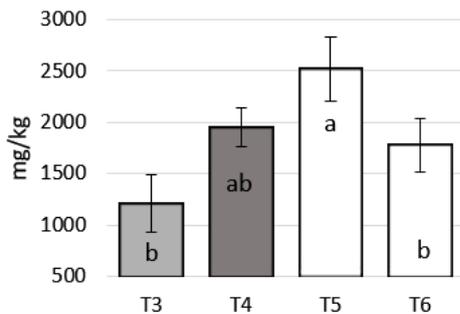
### 1.3. Analyses statistiques

Sachant que notre modèle comportait un facteur fixe (traitements) et un facteur aléatoire (blocs de six cases), les données ont été analysées en utilisant la procédure Mixed Model de SAS. L'unité expérimentale était le porcelet. Les résultats étaient considérés significatifs avec  $P < 0,05$  ; un test de Tukey a alors permis de déterminer quels groupes étaient significativement différents.

## 2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les tests en chambre d'Ussing incluaient la mesure des résistances électriques transépithéliales (TEER) de la muqueuse dans les six groupes ; cette mesure a montré que le ZnO potentialisé améliorait l'intégrité des tissus (Roméo *et al.*, 2107). Comme le dosage en Fe n'avait aucun effet sur les résultats, seuls les traitements T3, T4, T5 et T6 ont été conservés pour les analyses complémentaires.

La concentration de Zn dans la muqueuse du jéjunum était significativement plus élevée avec le ZnO potentialisé qu'avec le ZnO standard, à même dose ( $P < 0,05$ ) (Figure 1).



**Figure 1** – Concentration de zinc dans la muqueuse du jéjunum

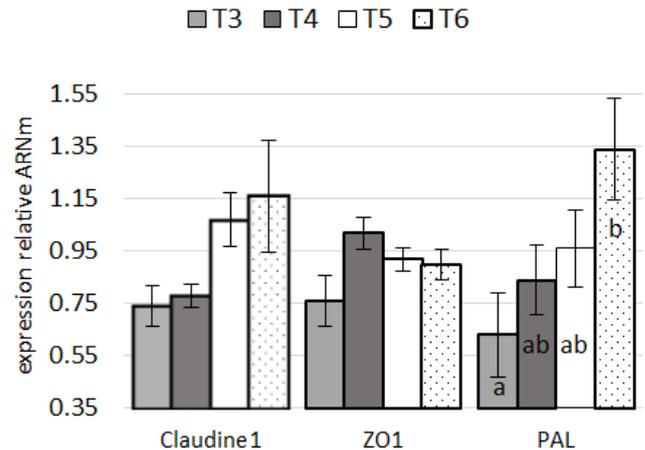
Des lettres différentes indiquent une différence significative ( $P < 0,05$ )

Ces différences pourraient être expliquées par les caractéristiques physico-chimiques particulières de la source de ZnO potentialisée, qui aurait un comportement différent dans le tractus et au niveau de la muqueuse (Cardoso *et al.*, 2017).

Comme le ZnO à dose pharmacologique, la source de ZnO potentialisé a diminué la perméabilité intestinale. Une des hypothèses avancées concernait une modification de l'expression des jonctions serrées. Le nombre de transcrits mesuré pour les protéines des jonctions serrées tendait à être plus faible avec le groupe qui a consommé le ZnO standard à dose nutritionnelle, pour claudine 1 ( $P = 0,08$ ) comme pour zona occludens 1 ( $P = 0,09$ ) (Figure 2). Ce résultat peut être rapproché des observations d'une étude antérieure : un apport de ZnO à dose pharmacologique avait également augmenté le nombre de transcrits pour les ARNm relatifs à certains jonctions serrées (occludine, zona occludens 1) ainsi que l'expression des protéines associées (Zhang et Guo, 2009).

Une autre hypothèse se focalisait sur le statut inflammatoire du porcelet, en réponse au stress du sevrage et à l'action des bactéries pathogènes. Le nombre de transcrits mesuré pour la phosphatase alcaline était significativement inférieur ( $P < 0,05$ ) avec T3, comparé à T6 (Figure 2).

Comme dans notre essai, la phosphatase alcaline intestinale est associée à de meilleures performances de croissance dans d'autres études, notamment via l'inhibition de la cascade inflammatoire du tractus gastro-intestinal (Melo *et al.*, 2016) et la diminution de la toxicité des lipopolysaccharides (Lallès, 2010).



**Figure 2** – Expression relative des ARNm codant pour les protéines des jonctions serrées et pour la phosphatase alcaline

Des lettres différentes indiquent une différence significative ( $P < 0,05$ )

## CONCLUSION

En conclusion, différentes hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'effet positif du ZnO potentialisé sur la muqueuse intestinale : non seulement il agirait sur l'expression des gènes relatifs aux jonctions serrées (comme le ZnO à dose pharmacologique) mais il pourrait également améliorer le statut inflammatoire des porcelets via une augmentation de la phosphatase alcaline.

Des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre ses effets exacts sur la muqueuse intestinale.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cardoso D., Chevalier Y., Narcy A., 2017. Physicochemical characterization of feed-grade zinc oxide sources. Poultry Science Association 106<sup>th</sup> Annual Meeting, Orlando, USA, pp. 2-3
- Carlson D., Poulsen H. D., Sehested J., 2004. Influence of weaning and effect of post weaning dietary zinc and copper on electrophysiological response to glucose, theophylline and 5-HT in piglet small intestinal mucosa. *Comp. Biochem. Physiol.*, 137, 757-756.
- Lallès J.P., 2010. Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. *Nutr. Rev.*, 68, 323-332.
- Melo A. D. B., Silveira H., Luciano F. B., Andrade C., Costa L. B., Rostagno M. H., 2016. Intestinal alkaline phosphatase: potential roles in promoting gut health in weanling piglets and its modulation by feed additives – a review. *Asian Australas. J. Anim. Sci.*, 29, 16-22.
- Roméo A., Van Noten N., Degroote J., Wang W., Michiels J., 2017. Effet de deux sources d'oxyde de zinc à différentes doses sur la perméabilité et les populations bactériennes de l'intestin des porcelets. *Journées Rech. Porcine*, 49, 213-214.
- Starke I. C., Pieper R., Neumann K., Zentek J., Vahjen W., 2014. The impact of high dietary zinc oxide on the development of the intestinal microbiota in weaned piglets. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 87, 416-427.
- Zhang B., Guo Y., 2009. Supplemental zinc reduced intestinal permeability by enhancing occludin and zonula occludens protein-1 (ZO-1) expression in weaning piglets. *Br. J. Nutr.*, 102, 687-693.