

Evaluation de l'intégrité et du statut inflammatoire intestinal du porcelet nourri avec ou sans additifs antimicrobiens dans l'aliment

Gemma TEDO, Marta BLANCH et Jose J. PASTOR

LUCTA, SA - Innovation Division, UAB Research Park, Eureka, 08170 Campus UAB, Bellaterra, Espagne

gemma.tedo@lucta.com

Avec la collaboration de Carles COLOM, Jordi FORNES et François DENIEUL

Evaluation of intestinal inflammatory and permeability markers in piglets fed medicated transition diets

The aim of this study was to evaluate the inflammatory and intestinal integrity response of piglets fed with or without antimicrobials added to their transition diets. For this purpose, eighty piglets ((LD x LW) x Pietrain) were weaned at 21 d of age (6.4 ± 0.1 kg body weight (BW)) and divided into two groups according to their diet: control diet (C) and control diet with antimicrobials (AMA: 300 ppm amoxicillin, 120 ppm colistin sulfate and 2500 ppm ZnO). Piglets were housed in groups of 5 ($n = 8$) and fed *ad libitum* a prestarter diet (weaning to d 14 after weaning (a.w.)) and a starter diet (d 15-42 a.w.). BW and feed intake were measured weekly from weaning until the end of the trial. To evaluate effects of antimicrobials on gut integrity, expression in tight junction protein genes (ZO-1, Occludin, E-Cadherin) and inflammatory markers (IL-1 β , IL-8, COX-2, iNOS and TNF- α) was measured in ileal samples, as well as TEER and *Isc* evaluation in Ussing Chambers. Performance and *ex-vivo* data were analyzed using a mixed-effect model, and gene expression data were analyzed using Student's t-test. Performance data did not differ between treatments. The AMA group showed a reduction in ileal mRNA abundance of certain inflammatory markers, such as COX-2 ($P < 0.05$), compared to the C group. No differences were observed in either the expression of tight junction genes or in TEER and *Isc* measurements. Antimicrobials may have an intestinal anti-inflammatory effect when added continuously to piglet feed, and they do not modulate zootechnical performance or gut integrity in non-challenging situations.

INTRODUCTION

Une inflammation intestinale chronique subclinique est l'un des effets qui entraîne une atteinte de l'intégrité intestinale et une moindre performance chez les porcs (Mereu *et al.*, 2015). L'utilisation d'antimicrobiens dans l'aliment peut avoir un effet anti-inflammatoire, donc un effet positif pendant des périodes critiques telles que le sevrage. L'objectif de cette étude est d'évaluer la relation entre l'intégrité intestinale et la réponse inflammatoire au niveau de l'intestin de porcelets nourris avec ou sans additifs antimicrobiens ajoutés dans leurs aliments.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Animaux

L'essai a été conduit à la ferme expérimentale de Lucta (Sant Aniol de Finestres, Espagne). Au total, 80 porcelets croisés (Landrace x Large White) x Piétrain non sexés, sevrés à 21 ± 2 jours de vie avec un poids vif (PV) moyen de $6,4 \pm 0,1$ kg, ont été utilisés.

1.2. Logement et programme alimentaire

Les porcelets ont été logés par groupe de cinq animaux par case ($0,6 \text{ m}^2$ / porcelet) du sevrage (jour zéro) à 42 jours après le sevrage et alimentés *ad libitum* selon le traitement. Deux

régimes ont été utilisés dans l'expérience, un aliment de premier âge (du sevrage jusqu'à 14 j post-sevrage) contenant 19,4 % de protéines brutes (PB) et 3525 kcal d'énergie métabolisable (EM) et un aliment de deuxième âge (de 15 j jusqu'à 42 j post-sevrage) contenant 18,5 % de PB et 3310 kcal d'EM. Le régime alimentaire a été formulé selon les besoins nutritionnels du porc (NRC 2012).

1.3. Traitements expérimentaux

Les porcelets ont été divisés en deux groupes expérimentaux: contrôle (C) et contrôle supplémenté avec des antimicrobiens (AMA: amoxicilline 300 ppm, sulfate de colistine 120 ppm et ZnO 2500 ppm) dans leur alimentation pendant toute la période expérimentale.

1.4. Mesures expérimentales

Les PV individuels et la consommation moyenne journalière ont été mesurés chaque semaine du sevrage jusqu'à 42 j post-sevrage. À la fin de l'essai, les porcelets ont été étourdis par cheville perforante et euthanasiés par exsanguination. Les segments de l'iléon moyen (à 50 cm de la valve iléo-caecale, quatre échantillons par porcelet) de huit porcelets par traitement ont été collectés pour des mesures de l'expression relative des ARNm codant pour des protéines de jonctions (Zonula Occludens-1 ou ZO-1-, E-Cadherine et Occludine; expression relative), des marqueurs d'inflammation

(IL-1 β , IL-8, iNOS, TNF- α et COX-2 ; expression relative) et des mesures de résistance électrique trans-épithéliales (TER; Ω cm²) et de courant de court-circuit (*I*_{sc}; μ A cm⁻²) dans des chambres d'Ussing. La muqueuse iléale grattée a été homogénéisée à l'aide d'un Tissuelyser II (Qiagen, Allemagne) après addition de Trizol (Life Technologies, USA). L'ARN total a été isolé à partir de tissus homogénéisés en utilisant une méthode à base d'affinité par colonne (GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit, Sigma-Aldrich, USA). La concentration d'ARN a été déterminée en mesurant l'absorbance à 260 nm sur un spectrophotomètre NanoDrop (Thermo Fischer Scientific, USA) et l'ARN total (deux μ g) a été transcrit dans un volume final de 20 μ l d'ADNc par des procédures standard, avec un kit ADNc Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA). La réaction en chaîne par polymérase en temps réel (qPCR) a été réalisée sur un système StepOne Plus (Life Technologies, États-Unis) en utilisant des paires d'amorces spécifiques (Isogen, Pays-Bas) avec le kit Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, États-Unis). Les concentrations d'ARNm des gènes cibles ont été normalisées pour les concentrations d'ARNm des gènes de ménage (TBP, RPL4, β -Actine et GAPDH) et l'expression relative comparée avec la méthode 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}.

Les échantillons de muqueuse intestinale à évaluer dans les chambres d'Ussing ont été décapés de la couche séreuse-musculaire dans un bullage de carbogène (95% O₂-5% CO₂) de solution Ringer (en mmol/l: 115 NaCl, 2,4 K₂HPO₄, 0,4 KH₂PO₄, 1,2 CaCl₂, 1,2 MgCl₂, 25 NaHCO₃, pH 7,4). Ensuite, cette muqueuse iléale a été montée dans une chambre d'Ussing avec 1 cm² de surface (Physiologic Instruments, San Diego, USA) en présence de 10 mL de solution Ringer. La solution utilisée du côté de la séreuse contenait 10 mM de glucose comme source d'énergie pour maintenir le tissu vivant, et celle utilisée du côté de la muqueuse contenait 10 mM de mannitol pour l'équilibre osmotique. Toutes les solutions utilisées ont été maintenues oxygénées à 37°C pendant tout l'essai. Après 30 minutes d'équilibration des solutions dans les chambres d'Ussing, des mesures de TER et *I*_{sc} ont été collectées à intervalles de 10 secondes pendant une heure pour obtenir la valeur moyenne de chaque animal.

Toutes les procédures expérimentales ont obtenu l'approbation du comité de protection et utilisation des animaux de l'Université Autonome de Barcelone.

1.5. Analyses statistiques

Les données de performances ont été soumises à une analyse de la variance de mesures répétées en utilisant un modèle mixte, avec un effet aléatoire du porc et des effets fixes du traitement, de la semaine et de leur interaction. Les données des chambres d'Ussing (TER et Delta *I*_{sc}) ont été soumises à une analyse de la variance en utilisant un modèle mixte avec

un effet aléatoire du porc et un effet fixe du traitement. Les données d'expression des gènes ont été comparées par un test *t* de Student. Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel SAS (v. 9.4., NC).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

En moyenne, les performances et la consommation des porcelets du groupe AMA n'ont pas été améliorées par rapport au groupe contrôle (21,3 vs. 20,9 \pm 0,5 kg PV final, *P* = 0,23). D'autre part, les valeurs de TER et la valeur d'*I*_{sc} n'ont pas été modifiées par le traitement assigné. Les résultats d'expression des gènes codant pour IL-8, iNOS et COX-2, montreraient une réduction du statut inflammatoire de l'intestin dans le groupe AMA (Tableau 1). Par contre, les valeurs de l'expression des gènes codant pour les protéines de jonctions n'étaient pas différentes entre les deux groupes. Les résultats suggèrent certains effets anti-inflammatoires au niveau intestinal lié à l'utilisation des additifs antimicrobiens (Niewold, 2007). Récemment, nous avons montré que les performances de porcelets nourris avec des aliments non-médicamenteux pouvaient être améliorées en empêchant le dysfonctionnement de la barrière intestinale induit par le sevrage (Mereu *et al.*, 2015). Une amélioration de la croissance par les AMA était en partie liée à l'amélioration de la fonction de la barrière intestinale (Mereu *et al.*, 2016). Dans cette expérience, les AMA ajoutés dans l'aliment porcelet ont seulement eu un certain effet anti-inflammatoire sans améliorer la fonction barrière intestinale et la croissance.

Tableau 1 – Comparaison des expressions de gènes des marqueurs inflammatoires du groupe des additifs antimicrobiens (AMA) relative au groupe contrôle (C).

Marqueurs inflammatoires	AMA	ETR ¹	<i>P</i> ²
IL-8	0,76	0,12	0,12
IL-1 β	1,34	0,31	0,55
iNOS	0,70	0,21	0,14
TNF- α	0,98	0,10	0,66
COX-2	0,77	0,08	0,03

¹ ETR: écart type résiduel.

² Les valeurs indiquées correspondent à la moyenne (n = 8)

CONCLUSION

En conclusion, si l'utilisation d'antimicrobiens peut avoir un effet anti-inflammatoire intestinal lorsqu'ils sont ajoutés à l'alimentation des porcelets, leur utilisation ne garantit pas une amélioration des performances et de l'intégrité intestinale dans des situations sans challenge.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Mereu A., Tedo G., Charve J., Moeser A., Ipharraguerre I.R., 2015. Réduire la perméabilité au sevrage améliore les performances des porcelets. Journées Rech. Porcine, 47, 131-132.
- Mereu A., Pastor J.J., Tedo G., Ipharraguerre I.R., 2016. La meilleure croissance des porcelets grâce aux additifs antimicrobiens est associée à l'amélioration de la fonction barrière intestinale. Journées Rech. Porcine, 48, 129-130.
- Niewold T.A., 2007. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. Poul. Sci. 86, 605-609.
- NRC, Nutrient requirements of swine, 2012, 11th rev.ed. The National Academies Press, Washington, D.C. USA, 210 p.