



Impacts du zinc et de l'arginine dans l'aliment du porcelet sevré sur le contrôle de la réaction inflammatoire et le potentiel antioxydant

Thèse

Nadia Bergeron

Doctorat en sciences animales
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

Impacts du zinc et de l'arginine dans l'aliment du porcelet sevré sur le contrôle de la réaction inflammatoire et le potentiel antioxydant

Thèse

Nadia Bergeron

Sous la direction de :

Frédéric Guay, Ph.D. directeur ou directrice de recherche
Claude Robert, Ph.D. codirecteur ou codirectrice de recherche

RESUMÉ

Les rations alimentaires riche en zinc (Zn) ou en arginine (Arg) sont connues pour améliorer la croissance des porcelets nouvellement sevrés mais les mécanismes d'actions ne sont pas encore bien connus. L'hypothèse à la base de ce doctorat est que le métabolisme oxydatif et la réponse anti-inflammatoire seraient impliqués dans cette réponse. Les effets de ces ajouts ont donc été évalués sur le statut antioxydant et la réponse inflammatoire des porcelets dans trois conditions différentes. Pour les trois essais, les rations étaient supplémentées ou non de Zn (2500 mg oxyde de Zn/kg) et d'Arg (1 %). Dans le premier essai, trente-deux porcelets sevrés de 20 jours ont été nourris pendant 12 jours avec l'une des quatre rations. Au jour 12, des prélèvements sanguins ont été effectués avant et 3 heures après une injection intrapéritonéale de lipopolysaccharide (LPS; 10 mg/kg) puis les porcelets ont été euthanasiés afin de prélever des échantillons de muqueuses intestinales. Les résultats ont indiqué que le Zn peut réduire l'oxydation systémique et améliorer l'état antioxydant dans les muqueuses intestinales. Par contre, les supplémentations en Zn et en Arg n'ont pas eu d'effet synergique positif sur l'état antioxydant ou l'inflammation chez les porcelets sevrés. Dans le deuxième essai, quarante-huit porcelets sevrés à l'âge de 20 jours ont reçu l'une des quatre mêmes rations pendant 7 ou 14 jours. Au jour 5, les porcelets (2 par parc) ont reçu une injection intramusculaire de LPS (100 µg/kg) et des échantillons de sang ont été prélevés avant l'injection et 6h, 24h et 48h après. Au jour 7, tout de suite après avoir prélevé le dernier échantillon de sang, 1 porcelet dans chacun des parcs a été euthanasié afin de prélever des échantillons de la muqueuse de l'iléon. Au jour 12, le porcelet restant a de nouveau reçu une injection de LPS et les mêmes échantillons de sang et de muqueuse ont été prélevés. Cet essai a montré que l'ajout d'une forte dose de Zn réduisait l'oxydation des lipides et l'inflammation pendant le sevrage et que l'ajout de Zn et Arg a des effets limités sur les statuts oxydatif et inflammatoire suivant l'injection de LPS. Dans le dernier essai en conditions commerciales, des porcelets âgés de 21 jours ont été alimentés avec l'une des mêmes quatre rations alimentaires. Les échantillons sanguins ont été prélevés sur les mêmes 2 porcelets dans chacun des parcs avant la distribution des aliments le matin des jours 8 et 15. Les données ont montré que la ration avec une dose élevée en Zn améliorait les performances de croissance des porcelets (ADG et ADFI) ainsi que le status oxydatif en diminuant l'oxydation des lipides. De son côté, l'ajout de Arg a eu un effet limité sur les performances de croissance et sur le status oxydatif durant l'élevage en conditions commerciales.

ABSTRACT

High level of dietary zinc (Zn) and arginine (Arg) supplementation are known to improve growth in weanling piglets but the mechanism of action is not yet well understood. We hypothesized that antioxidant metabolism and inflammatory responses were involved. The effects of high Zn supplement and Arg supplementation on the antioxidant status and inflammatory response of piglets after lipopolysaccharide (LPS) stimulation were evaluated. In a first study, thirty-two 20-day-old weanling piglets were fed diets supplemented or not with Zn (2,500 mg Zn oxide/kg) and Arg (1%) for 12 days. On day 12, blood samples were taken before and 3h after intra-peritoneal injection of LPS (10 µg/kg) and were euthanized just after the second blood sample, and samples of mucosae were taken. These results indicated that Zn may reduce systemic oxidation and improve antioxidant status in jejunal and ileal mucosae. However, Zn and Arg supplementation did not appear to act synergistically to enhance antioxidant status or reduce inflammation in weanling piglets. In a second study, forty-eight 20-days-old weanling piglets were placed for 7 or 14 days on diets supplemented or not with Zn (2,500 mg Zn oxide/kg) and Arg (1%). On day 5, piglets (two per pen) were injected with LPS injection (100 µg/kg) intramuscular and blood samples were taken just before and, 6, 24 and 48 h after. On day 7, shortly after obtaining the last post-LPS blood sample, one piglet per pen was euthanized and samples of mucosa were taken from the ileum. On day 12, remaining piglet was injected again with same LPS dose and blood and ileum samples were collected as for the piglet on day 7. This study showed that high Zn diet reduced lipid oxidation and inflammation during post-weaning period. However, Zn and Arg supplementations had limited effect on oxidative and inflammatory status following LPS challenge. In a last study, weanling piglets aged 21 d were fed for 15 days a diet supplemented or not with 2500 mg/kg of ZnO and 1% Arg under commercial breeding conditions. Blood was collected from the same two piglets in each pen before morning feeding on days 8 and 15. Under these commercial conditions, high level of Zn improved piglet growth performance (ADG and ADFI) and oxidative status by decreasing lipid oxidation however Arg supplementation had a limited effect on growth performance and oxidative status.

Table des matières

RESUMÉ	III
ABSTRACT	IV
Table des matières	V
Liste des figures	VIII
Liste des tableaux	IX
Liste des abréviations	XI
Remerciements	XV
Avant-propos	XVI
 INTRODUCTION : LA PRODUCTION PORCINE AU QUEBEC, AU CANADA ET DANS LE MONDE	 1
 CHAPITRE 1 - REVUE DE LITTÉRATURE	 6
1. Les impacts du stress au sevrage	6
1.1 <i>Stress psychologique</i>	6
1.2 <i>Stress physique</i>	6
2. Impact du sevrage sur le système digestif	7
2.1 <i>L'estomac</i>	7
2.2 <i>Intestin grêle</i>	9
a) Absorption des nutriments	9
b) La sécrétion des électrolytes et d'eau	10
c) La barrière physique	11
2.3 <i>Gros intestin</i>	13
3. L'impact du changement d'aliment	14
3.1 <i>Retrait du lait et passage à un aliment solide</i>	14
3.2 <i>Facteur antigénique de protéine végétale</i>	15
4. Présence de <i>Escherichia Coli</i> entérotoxigène	16
5. Développement du système immunitaire chez le porcelet	17
5.1 <i>Système immunitaire de la muqueuse intestinale</i>	19
6. Développement du statut antioxydant du porcelet	21
6.1 <i>Avant le sevrage</i>	21
6.2 <i>Après le sevrage</i>	22
7. Développement de la flore intestinale du porcelet	25
8. Stratégies pour réduire les effets du sevrage	26
8.1 <i>L'âge au sevrage</i>	26
8.2 <i>Formulation alimentaire</i>	28
8.3 <i>Farine de plasma</i>	29
8.4 <i>Antibiotiques</i>	29
8.5 <i>Probiotiques et prébiotiques</i>	30
9. Le zinc chez le porcelet sevré	33
9.1 <i>Performance de croissance</i>	34
9.2 <i>Métallothionéine et métabolisme du zinc</i>	34
9.3 <i>Altérations morphologiques et des fonctions de la muqueuse intestinale</i>	35
9.4 <i>Croissance bactérienne et activité digestive</i>	36
9.5 <i>Réponse immunitaire</i>	38

10. Zn et Métabolisme du stress oxydatif	39
11. NO dans le métabolisme du zinc	41
11.1 <i>Autres implications de NO</i>	44
12. L'arginine dans l'alimentation du porcelet.....	46
12.1 <i>Synthèse intestinal d'arginine</i>	46
12.2 <i>Rôle de l'arginine.....</i>	49
12.3 <i>Sevrage et métabolisme de l'arginine</i>	50
12.4 <i>L'arginine et l'immunité.....</i>	50
12.5 <i>Rôle de l'arginine dans la synthèse de NO</i>	52
13. Utilisation du LPS	52
13.1 <i>Utilisation du LPS chez le porc.....</i>	54
14. Résumé des éléments et hypothèses de recherche	54

CHAPITRE 2 - ANTIOXIDANT STATUS AND INFLAMMATORY RESPONSE IN WEANLING PIGLETS FED DIETS SUPPLEMENTED WITH ARGININE AND ZINC59

1. Résumé	60
2. Abstract.....	61
3. Introduction	62
4. Materials and methods.....	63
4.1 <i>Animals and housing</i>	63
4.2 <i>Experimental design and diets</i>	63
4.3 <i>Challenge with lipopolysaccharide</i>	65
4.4 <i>Tissue collection.....</i>	65
4.5 <i>Biochemical analysis.....</i>	66
4.6 <i>Analysis of MT1, TGFB2, TNF, IL10, IL12B and NOS2 mRNA expression.....</i>	67
4.7 <i>Feed analysis.....</i>	70
4.8 <i>Histological analysis</i>	70
4.9 <i>Statistical analysis.....</i>	70
5. Results	71
5.1 <i>Growth performance</i>	71
5.2 <i>Plasma antioxidant status and inflammatory response.....</i>	71
5.3 <i>Antioxidant and oxidative status in the jejunal and ileal mucosae</i>	71
5.4 <i>Jejunal and ileal morphology.....</i>	76
5.5 <i>Expression of MT1 TGFB2, TNF, IL10, IL12B and NOS2 mRNA.....</i>	76
6. Discussion.....	76
7. Acknowledgements.....	82
8. Bibliography	83

CHAPITRE 3 - FEED SUPPLEMENTATION WITH ARGININE AND ZINC ON ANTIOXIDANT STATUS AND INFLAMMATORY RESPONSE IN CHALLENGED WEANLING PIGLETS.....88

1. Résumé	89
2. Abstract.....	90
3. Introduction	91
4. Materials and methods.....	92
4.1 <i>Animals and housing</i>	92
4.2 <i>Experimental design and diets</i>	92
4.3 <i>Challenge with lipopolysaccharide.....</i>	94

4.4	<i>Tissue collection</i>	94
4.5	<i>Biochemical analysis</i>	94
4.6	<i>Analysis of MT1, TNF and NOS2 mRNA expression</i>	96
4.7	<i>Feed analysis</i>	98
4.8	<i>Statistical analysis</i>	98
5.	Results	99
5.1	<i>Growth performance</i>	99
5.2	<i>Effect of post-weaning days before LPS injection</i>	99
5.3	<i>Effect of LPS injection</i>	102
5.4	<i>Antioxidant and oxidative status and MT mRNA expression in the ileal mucosae</i> 107	
6.	Discussion	107
6.1	<i>Growth performance</i>	107
6.2	<i>Effect of post-weaning days before the LPS injection.</i>	109
6.3	<i>Effect of LPS injection</i>	110
7.	Conclusion	113
8.	Acknowledgment	113
9.	Bibliography	114

CHAPITRE 4 - IMPACT OF ZINC AND ARGININE ON ANTIOXIDANT STATUS IN WEANING PIGLETS RAISED UNDER COMMERCIAL CONDITIONS 119

1.	Résumé	120
2.	Abstract	121
3.	Introduction	122
4.	Material and methods	123
4.1	<i>Animals and housing</i>	123
4.2	<i>Experimental Design and Diets</i>	124
4.3	<i>Blood Samples</i>	124
4.4	<i>Biochemical Analysis</i>	124
4.5	<i>Feed analysis</i>	127
4.6	<i>Statistical Analysis</i>	127
5.	Results	127
5.1	<i>Growth Performance</i>	127
5.2	<i>Antioxidant and oxidative status</i>	128
6.	Discussion	132
6.1	<i>Growth performance</i>	132
6.2	<i>Antioxidant and oxidative status</i>	133
7.	Conclusion	135
8.	Acknowledgements	135
9.	Bibliography	136

CONCLUSION GÉNÉRALE..... 140

Bibliographie..... 142

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1 : Production et métabolisme des ROS et des RNS	42
Figure 1.2 : Mécanisme de la SOD	43
Figure 1.3: Réactions des peroxynitrites menant à l'apoptose ou à la mort cellulaire	43
Figure 1.4 : Activation du NFkB et voie de signalisation STAT.....	47
Figure 1.5: Voies empruntées par le NO pour la vasodilatation ou la vasoconstriction	47
Figure 1.6: Voie de synthèse de l'Arg.....	48
Figure 1.7 : Devenirs métaboliques de l'Arg dans les cellules de mammifères	50
Figure 1.8 : « Synthèse de NO »	52
Figure 1.9 : Structure d'un Lipopolysaccharide.....	53

Chapitre 3

Figure 3.1 Malondialdehyde (MDA), Total antioxidant capacity (TAC) and Total oxidant status (TOS) plasma concentrations and TAC_TOS ratio of piglets fed diets supplemented or not with Zn and Arg before (0h) and after LPS injection (6h, 24h and 48h).	104
Figure 3.2 Total, reduced, oxidised glutathione (GSH) plasma concentrations and oxidised_total GSH ratio of piglets fed diets supplemented or not with Zn and Arg before (0h) and after LPS injection (6h, 24h and 48h).	105
Figure 3.3 Haptoglobin (Hapto), tumor necrosis factor- α (TNF) and nitrite/nitrate (NOx) plasma concentrations of piglets fed diets supplemented or not with Zn and Arg before (0h) and after LPS injection (6h, 24h and 48h).....	106

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1.1 : Changement en post-sevrage de l'expression de cytokines dans les différentes parties du petit intestin de porcelets sevrés à 28 jours	20
Tableau 1.2: Sommaire des effets du ZnO chez le porcelet sevré.....	39
Tableau 1.3: Résumé d'essais d'inflammation in vivo avec du LPS d' <i>E. coli</i> chez le porc	56

Chapitre 2

Table 2.1: Composition of experimental diets (as-fed basis).....	64
Table 2.2 : Primers used for measurement of gene expression level by quantitative PCR.....	69
Table 2.3: Growth performance of piglets weanling on diets supplemented or not with Zn and Arg	72
Table 2.4: Plasma malondialdehyde (MDA) concentration, ferric-reducing ability (FRAP) and superoxide-dismutase (SOD) activity before and after LPS injection in weanling piglets fed diets supplemented or not with Zn and Arg.....	73
Table 2.5: Prostaglandin E ₂ metabolite (PGE ₂), Tumour necrosis factor- α (TNF) and nitrite/nitrates (NOx) in plasma of weanling piglets fed diets supplemented or not with Zn and Arg	74
Table 2.6: Malondialdehyde (MDA) concentration, total antioxidant capacity (TAC), and nitrate/nitrite (NOx) concentration in the jejunal and ileal mucosae of weanling piglets fed diets supplemented or not with Zn and Arg	75
Table 2.7: Crypt depth and villus height in jejunal and ileal mucosa of weanling piglets fed diets supplemented or not with Zn and Arg	77
Table 2.8: The mRNA expression of tumour necrosis factor- α , interleukin-10 (IL10), IL12B, transforming growth factor- β 2 (TGFB2), metallothionein-1 (MT1), and inducible-nitric oxide synthase (NOS2) in jejunal and ileal mucosae of weanling piglets fed diets supplemented or not with Zn and Arg (Arbitrary unit) ^{y,z}	78

Chapitre 3

Table 3.1: Composition of experimental diets (as-fed basis).....	93
Table 3.2: Primers used for measurement of gene expression level by quantitative PCR.....	97
Table 3.3:Growth performances (average daily gain (ADG), average daily feed intake (ADFI), feed efficiency (G:F)) of piglets weanling on diets supplemented or not with Zn and Arg	100
Table 3.4: Malondialdehyde (MDA), reduced, oxidised and total Glutathione (GSH), concentrations and oxidised_total GSH ratio (O_T GSH) in plasma before LPS injection on day 5 and 12 post-weaning from piglets fed diets supplemented or not with Zn and Arg	101
Table 3.5:Total antioxidant capacity (TAC), Total oxidant status (TOS), TAC_TOS ratio, Tumor necrosis factor- α (TNF), haptoglobine (Hapto) and nitrite/nitrate (NOx) concentrations in plasma before LPS injection on day 5 and 12 post-weaning of piglets fed diets supplemented or not with Zn and Arg	103
Table 3.6: Malondialdehyde (MDA) and Total antioxidant capacity (TAC) concentration and Metallothionein-1 (MT-1), Tumor necrosis factor- α (TNF) and inductable Nitric oxide synthase (iNOS) expressions in ileal mucosae 48h after LPS injection in weanling piglets fed diets supplemented or not with Zn and Arg	108

Chapitre 4

Table 4.1: Composition of experimental diets (as fed)	125
Table 4.1: Average daily gain (ADG), average daily feed intake (ADFI) and gain feed ratio (G:F) of weaning piglets fed a diet with or without zinc and /or arginine supplementation under commercial conditions.....	129
Table 4.3: Plasma malondyaldehyde, total antioxidant capacity (TAC), total oxidant capacity (TOS), TAC:TOS ratio and zinc concentration on days 8 and 15 in piglets fed diets with or without zinc and/or arginine supplementation	130
Table 4.4: Plasma reduced glutathione, total glutathione, oxidized glutathione and serum haptoglobin concentrations on days 8 and 15 post-weaning in piglets fed a diet with or without zinc and/or arginine supplementation.....	131

Liste des abréviations

ACTB: *actin beta*
ADFI: *average daily feed intake*
ADG: *average daily gain*
ADN: acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AMPc: adénosine monophosphate cyclique
AP-1: protéine d'activation-1
Arg: arginine
ARN: acide ribonucléique
ARNm: acide ribonucléique messenger
ATP: adenosine-triphosphate
BW: *body weight*
CAT: catalase
CD: cluster de différenciation
CEI : cellules épithéliales intestinales
Cl⁻ : anion chlore
CMQ: consommation moyenne quotidienne
COX-2: cyclo-oxygénase
CP: *crude protein*
Cu : cuivre
CV: coefficient de variation
dNTP : mélange des quatre désoxyribonucléotides : dATP (désoxy adénine tri-phosphate), dCTP (désoxy cytosine tri-phosphate), dGTP (désoxy guanine tri-phosphate), dTTP (désoxy thymine tri-phosphate).
Dr : docteur
E. coli : escherichia coli
EDTA: acide éthylène-diamine-tétraacétique
ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*
FAO : organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
FPPQ: fédération des producteurs de porcs du Québec
ETEC: bactérie E. coli entérotoxigène
FRAP: *ferric-reducing ability of plasma*
GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
G:F: *gain:feed ratio*
GMQ: gain moyen quotidien
GSH: glutation (forme réduite)
GSH-Px : glutathion peroxydase
GSSG: glutathione (forme oxydée)
Hapto: haptoglobine
HCl : acide chlorhydrique
HCO₃⁻ : bicarbonate
H₂O : eau ou oxide de dihydrogène
H₂O₂: peroxyde d'hydrogène
HPLC : *high pressure liquid chromatography*
ICAM-1: *interCellular Adhesion Molecule-1*
ICP-OES: spectrométrie à plasma à couplage inductif
IFN- γ : interféron gama

IGF-1: *insulin-like growth factor-1*
 I κ K: *inhibitor of κ B kinase*
 iNOS : oxyde nitrique synthase forme inducible
 Jak: janus kinase
 K⁺ : ion potassium
 kg: kilogramme
 LF: lactoferrine
 Ig : immunoglobuline
 IL : interleukin
 LPO: lactoperoxydase
 LPS: lipopolysaccharide
 MDA : malondyaldehyde
 ME: énergie métabolisable
 mg: milligramme
 MgCl₂: chlorure de magnésium
 mL : millilitre
 MOS : mannan oligosaccharide
 MT: métallothionéine
 Na⁺: ion sodium
 NaCl: chlorure de sodium
 NaOH: hydroxyde de sodium
 NF- κ B: *nuclear factor-kappa B*
 NLR : *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors*
 NO: nitric oxide
 NRC : *national research council*
 Nrf2 : facteur de transcription Nrf2
 NSERC: *natural Sciences and Engineering Research Council of Canada*
 O₂⁻ : dioxygène
 OMS: organisation mondiale de la Santé
 ONOO : peroxinitrite
 p53 : *tumor protein 53*
 p65: facteur de transcription p65
 PBS: *phosphate buffered saline*
 PCR : *polymerase chain reaction*
 PDE III: *phosphodiesterase III*
 PGC-1 α : *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*
 PGE₂: prostaglandine E₂
 PRRS : *porcine reproductive and respiratory syndrome*
 Qc: Québec
 RIN : *RNA integrity number*
 RNS: *reactive nitrogen species*
 ROS: *reactive oxygen species*
 RPL4 : *ribosomal protein L4*
 RT : *reverse transcription*
 SBM : soy bean meal
 SOD: *superoxyde dismutase*
 SPE : *solid-phase extraction*
 SRRP : syndrome reproducteur et respiratoire porcin
 STAT: *signal transducers and activators of transcription*
 TAC : *total antioxidant capacity*

TGF- β : *transforming growth factor beta*
Th : cellule T helper
TLR : *toll like receptors*
TNF: *tumor necrosis factor alpha*
TOS: *total oxidant capacity*
Ucp2: protéine découplante 2
 μ g: microgramme
UI: unité internationale
 μ m : micromol
USA : *United State of America*
VCAM-1: *vascular cell adhesion molecule-1*
Zn : zinc
ZnO: oxyde de zinc
ZO : *zonula occludens*

L'eau qui tombe constamment goutte à goutte finit par creuser la pierre.

Benjamin Franklin

Remerciements

La réalisation de ce doctorat, qui a pris presque 10 années, n'a pu se faire sans la participation, la présence et surtout, la patience de mon directeur de recherche, le Docteur **Frédéric Guay**. Un grand merci d'avoir eu confiance en moi dès le départ pour réaliser ce projet, et par la suite d'avoir continué de croire que je finirais par finir et ce, même lorsque j'ai quitté pour un emploi. Merci également au Docteur Claude Robert, mon codirecteur, qui nous a fourni les installations et le personnel nécessaire pour tout le côté expression des gènes de cette thèse, et également pour son temps et ses connaissances dans ce domaine.

Je ne peux passer à côté de mon conjoint, ma famille et mes amis, des personnes toujours présentes à mes côtés pour m'encourager. De ces personnes, mes deux amies **Fanny De Serres** et **Clotilde Maurice**, qui ont été un peu plus intenses dans leurs encouragements pour que je persévère dans l'écriture de cette thèse et ce, à leur risque et péril parfois car il n'est pas toujours agréable de se faire rappeler qu'on n'a pas fini quelque chose... Avec ces encouragements, j'ai pu réussir à garder le focus étape après étape. Merci également à tous mes collègues chez Agrinova de m'avoir encouragé à terminer et à mes directeurs d'avoir trouvé des moyens administratifs facilitant l'atteinte de mon objectif. Je l'apprécie énormément. Le résultat ne serait probablement pas le même sans cela.

Peu de temps après avoir quitté l'université pour le marché du travail, en apprenant que je n'avais pas retouché à ma thèse depuis quelques mois, une personne m'a dit, sans méchanceté bien sûr, que je ne finirai jamais. Cette phrase me sert de motivation depuis l'automne 2012 ! Cette personne avait raison... pour finir quelque chose qu'on a entrepris, il faut y travailler et ne pas arrêter trop longtemps. Terminer une thèse par les soirs et fins de semaine, ce n'est pas toujours facile, et même que ce ne l'est pas du tout.

Finalement, merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ces projets et de cette thèse. Certaines de ces personnes sont nommées dans la section Avant-Propos.

Avant-propos

Cette thèse est présentée avec insertion d'articles et comporte six chapitres. Le premier chapitre permet de faire un survol de la production de porc au Canada et au Québec, de comprendre le contexte de production dans lequel nous évoluons. L'objectif de cette introduction est d'établir des liens entre les connaissances que nous possédons de la production et les raisons qui ont motivées la réalisation de l'entièreté des projets de cette thèse.

Le second chapitre présente un résumé de l'état des connaissances du monde scientifique, jusqu'à ce jour, sur le statut du porcelet lors du sevrage soit de l'impact du stress au sevrage, l'impact du sevrage et la présence d'E. Coli entérotoxigène sur le système digestif et le développement du système immunitaire du porcelet puis les stratégies pour diminuer les impacts négatifs comme l'utilisation du zinc à des doses pharmacologiques et de l'ajout d'arginine. Et pour finir, une présentation du modèle de stimulation de l'inflammation avec du lipopolysaccharide qui a été utilisé lors des essais en station de recherche, a été insérée dans cette thèse.

Le troisième chapitre présente le premier article publié en janvier 2014 dans le Canadian Journal of Animal Science où je suis la première auteure. Le Dr. Frédéric Guay et le Dr. Claude Robert ont participé au design expérimental et à la rédaction de l'article. Mélanie Roy, Andrée-Anne Hudon Thibault et Catherine Gravel nous ont aidées lors de la réalisation de ce projet.

Bergeron, N., Robert, C. and Guay, F. 2014. Antioxidant status and inflammatory response in weanling piglets fed diets supplemented with arginine and zinc. Can. J. Anim. Sci. 94: 87-97.

Le quatrième chapitre présente le second article publié en septembre 2017 dans le journal Animal Nutrition où je suis la première auteure. Le Dr. Frédéric Guay et le Dr. Claude Robert ont participé au design expérimental et à la rédaction de l'article. Marie-Pierre Fortier et Richard Prince nous ont aidé lors de la réalisation de ce projet.

Bergeron, N., Robert, C. and Guay, F. 2014. Feed supplementation with arginine and zinc on antioxidant status and inflammatory response in challenged weanling piglets. Anim. Nutri. 3 : 236-246.

Le cinquième chapitre présente le troisième article dont nous avons terminé la rédaction et a été soumis au journal Animal Nutrition où je suis la première auteure. Le Dr. Frédéric Guay a participé au design expérimental et à la rédaction de l'article. Pour cet essai, nous avons utilisé les mêmes traitements alimentaires que le second article, avec sensiblement les mêmes prises de mesures mais sans les injections de LPS.

Bergeron, N. and Guay, F. Impact of zinc and arginine on antioxidant status in weaning piglets in commercial conditions. Soumis en novembre 2018.

Finalement, le sixième chapitre présente la discussion générale à propos de l'ensemble des résultats que nous avons obtenus lors des 3 projets.

INTRODUCTION : LA PRODUCTION PORCINE AU QUEBEC, AU CANADA ET DANS LE MONDE

En 2015, la production porcine québécoise était de 7,21 millions de porcs, une augmentation de 5 % par rapport à 2014 (Centre de développement du porc du Québec (CDPQ), 2016). Le volume de production a affiché une hausse entre 2006 et 2009 au Québec, passant de 7,1 millions de porcs à 7,85 millions en 2009, année où il a atteint son sommet (Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2013). Il se situe en ce moment (2018) à environ 7 millions de porcs produits (Les Éleveurs de porcs du Québec, 2018a,b).

Concernant la valeur des ventes en 2015, la production porcine québécoise a totalisé 1,32 milliard de dollars, soit une diminution de 284 millions de dollars (-18 %) par rapport à l'année précédente (CDPQ, 2016). La principale cause de la détérioration de la valeur des ventes est la baisse du prix de vente, combinée à la baisse du nombre de porcs mis en marché (Statistique Canada, 2016). Au Québec, les recettes monétaires provenant du secteur porcin québécois occupait en 2015 le second rang avec 25 % des ventes totales en productions animales, derrière la production laitière (42 %) (Statistique Canada, 2016). En ce qui concerne les exportations québécoises, la valeur de celles-ci a progressé en 2015 (+5,2 %), atteignant 1 44 millions de dollars (CDPQ, 2016). Les destinations les plus lucratives pour le Québec demeuraient en 2012 les États-Unis (373,1 millions \$), suivi de la Russie (345 millions \$) et du Japon (329,6 millions \$) (Statistique Canada, 2016).

En 2018 au Québec, on dénombre 1 800 entreprises spécialisées en production porcine (Les Éleveurs de porcs du Québec, 2018a, b); pour ces entreprises, au moins 51 % de leurs revenus provenaient de la production porcine (Statistique Canada, 2016). Le reste de la production est assuré par des entreprises spécialisées dans d'autres types de production, tels que le lait et les grandes cultures, qui exploitaient également une entreprise porcine (Statistique Canada, 2016).

En 2015, les entreprises porcines québécoises étaient réparties comme suit : type « naisseur-finiisseur » (43 %), type « finisseur » (35 %) et type « naisseur » (22 %), selon les données de La Financière agricole du Québec de 2016. Les entreprises de type « naisseur » comptaient,

en moyenne, 665 truies alors que les entreprises de type «finisseur» avaient produit en moyenne 7 243 porcs par an (La Financière agricole du Québec, 2016). En ce qui concerne les fermes moyennes de type «naisseur-finisseur», elles possédaient en moyenne 394 truies et avaient produit 9 585 porcs par an, en 2015 (La Financière agricole du Québec, 2016).

Au 1er janvier 2016, de toutes les provinces canadiennes, c'est au Québec où l'on dénombrait le plus de porcs dans les fermes, soit 324 300 animaux reproducteurs âgés de six mois et plus (verrats, truies et jeunes truies saillies) et 3,937 millions de porcelets et porcs d'engraissement (Statistique Canada, 2016). Au second rang se retrouvait l'Ontario, suivi du Manitoba, puis de l'Alberta. À l'échelle canadienne, le nombre de porcs en inventaire dans les fermes a atteint son sommet en 2005 pour ensuite connaître plusieurs années de recul, jusqu'en 2010 (Statistique Canada, 2016). Depuis ce temps, il a recommencé à croître, mais à un rythme modéré. Du côté québécois, le cheptel porcin a, lui aussi, affiché plusieurs années de décroissance à partir du milieu des années 2000, mais les derniers rapports d'inventaire indiquent une certaine stabilisation (Statistique Canada, 2016). Plus précisément, le troupeau reproducteur est en faible diminution, au Québec, alors que dans l'ensemble du Canada, la tendance est la même, mais moins prononcée (Statistique Canada, 2016).

Même si le Québec était la province où les inventaires porcins étaient les plus élevés au 1er janvier 2016, c'est au Manitoba où l'on a produit le plus de porcs en 2015; toutefois, près de la moitié (47 %) des porcs produits, principalement des porcelets, était exportée aux États-Unis (Statistique Canada, 2016). Ainsi, 3,56 millions de porcs vivants ont traversé la frontière canadienne en direction des États-Unis en 2015. Au total, le Manitoba a produit près de 8,09 millions de porcs en 2015, une augmentation de 4 % par rapport à l'année précédente (Statistique Canada, 2016). La hausse de la production manitobaine, quoique modeste, est attribuable à une augmentation du nombre de porcs élevés et abattus dans la province. Du côté des exportations de porcs vivants au sud de la frontière, depuis 2010, la situation est relativement stable (Statistique Canada, 2016).

Même si le Québec n'occupe pas la première position quant au nombre de porcs produits, la province se classe néanmoins au premier rang en ce qui concerne le nombre d'animaux

abattus (Statistique Canada, 2016). En 2012, il s'est abattu 7,99 millions de porcs au Québec, soit 43 % de plus que son concurrent canadien le plus proche, le Manitoba. Comparativement à 2011, ces abattages ont légèrement régressé en 2013 (-0,8 %) (Statistique Canada, 2016).

Dans le contexte actuel de production, les principaux défis avec lesquels le secteur porcin devra continuer de composer à court et à moyen terme sont (Statistique Canada, 2016) :

- le prix instable des grains;
- la valeur du dollar canadien;
- l'évolution des exigences de certains pays importateurs;
- le prix variable de la viande de porc en Amérique du Nord.

Au Canada, les sols, le climat et les grands espaces permettent la production d'une abondante variété de céréales fourragères de qualité, nécessaire à l'alimentation des porcs (Canada Porc International, 2013). L'élevage de porcs s'accapare de 35 % à 45 % des 28 millions de tonnes de céréales fourragères produites annuellement au pays (Canada Porc International, 2013). Les principales céréales consommées par les porcs sont le maïs (54 %), l'orge (29 %) et le blé fourrager (12 %) (Canada Porc International, 2013). L'alimentation des porcs représente aussi 1,4 million de tonnes de tourteaux de soya et de canola consommées par année (Canada Porc International, 2013).

Le Canada s'est taillé une solide réputation en génétique porcine, fondée sur ses exportations substantielles et sa sélection de races pures en place depuis plus de 100 ans (Canada Porc International, 2013). Les systèmes de classement canadiens, en place depuis plus de 30 ans, ont permis l'amélioration des caractéristiques de la qualité de la carcasse et de la viande, ce qui nous permet de produire des porcs uniformes et homogènes. Aujourd'hui, les objectifs visent davantage les caractéristiques de la viande comme la tendreté, la saveur et la couleur.

Le Canada se soucie également de l'utilisation qui est faite des antibiotiques dans la production porcine. Les enjeux associés à l'utilisation des antibiotiques en production porcine sont à la fois politiques, philosophiques et scientifiques (Klopfenstein, 2004).

L'utilisation des antibiotiques en production porcine n'est pas une nouveauté et elle est nécessaire pour prévenir et contrôler les maladies d'origine bactérienne. Les antibiotiques sont également utilisés à faibles doses pour favoriser l'absorption des nutriments (vitamines, minéraux, acides gras, glucose et calcium) et la rétention de l'énergie et de l'azote ainsi que pour améliorer la prise (Commission on Antimicrobial Feed Additives, 1997).

C'est cette dernière pratique qui est souvent pointée du doigt comme une pratique imprudente et injustifiée. Les antibiotiques sont des outils efficaces et nécessaires pour contrôler les maladies bactériennes des porcs. Cette ressource doit être utilisée prudemment et de façon responsable.

Depuis plusieurs années, on a vu l'apparition de cahiers de charges pour la production de viande de porc sans antibiotique. Ces cahiers cadrent la production et assurent aux consommateurs que la viande provient d'un animal élevé dans des conditions bien définies. Toutefois, la production sans antibiotique d'animaux destinés à la consommation humaine peut résulter en une augmentation de la présence de pathogènes dans l'environnement d'élevage et peut potentiellement contaminer les animaux et même la viande. Des alternatives ont donc été investiguées telle que l'ajout d'oxyde de Zn à des doses pharmacologiques, soit entre 2000 et 4000 mg/kg au lieu du 100-300 mg/kg recommandés par le National Research Council (NRC) (2012). L'augmentation de la quantité de Zn dans le tractus gastro-intestinal est corrélée avec une diminution de l'abondance de bactéries pathogènes et l'augmentation de la disponibilité des nutriments solubles (Vahjen et al., 2011; Pieper et al., 2012; Starke et al., 2013). Les effets positifs de cette alternative sont limités et ne s'observent que chez les porcelets récemment sevrés et ont une durée d'environ deux semaines suivant le sevrage (Brugger and Windisch, 2015).

L'ajout d'oxyde de ZnO à des doses pharmacologiques présente toutefois un problème environnemental (Brugger and Windisch, 2015). Les porcs ne rejettent pas moins de 92 à 96% de la quantité de Zn consommée (Bonazzi et al., 1994). Tout ce Zn se retrouve alors dans les fèces et les urines de l'animal (Windisch, 2002) et est par la suite épandu au champ. Le Zn fait partie des métaux lourds et s'accumule dans le sol suivant l'épandage du

purin au champ (Wuana and Okieimen, 2011). Une trop forte concentration en métaux lourds dans le sol tels que le Zn et le cuivre affecte le rendement des plantes (Rout and Das, 2003). Certaines études vont même jusqu'à dire que cela représenterait un danger pour l'eau et même, pour la santé humaine (Asada et al., 2010).

La section suivante mettra au fait des impacts de la gestion d'élevage sur la santé des porcelets lors du sevrage et dans les jours suivants. Différentes alternatives sont disponibles pour les éleveurs afin de permettre aux porcelets de passer au travers cette phase critique.

CHAPITRE 1 - REVUE DE LITTÉRATURE

1. Les impacts du stress au sevrage

Le sevrage est l'un des événements les plus stressants dans la vie d'un porc élevé en conditions commerciales. C'est à ce moment que le porcelet nouvellement sevré subit des stress psychologiques et physiques liés au processus de séparation, à son environnement et à l'interaction avec ses nouveaux congénères (Forbes, 1995; Whittemore et Green, 2006).

1.1 *Stress psychologique*

La manipulation et le changement d'environnement (nouveau) sont deux causes de stress psychologiques majeurs vécus par les porcelets au sevrage. Une étude de Pedersen et son équipe (1998) ont démontré qu'une expérience négative à la manipulation fera augmenter le cortisol sanguin, un indicateur du stress. L'étude a mesuré un taux de 6,1 nmol de cortisol/l de sang lors d'une manipulation minimal, 2,9 nmol/l lors d'une expérience positive et 7,4 nmol/l lors d'une expérience négative (Pedersen et al., 1998). Durant cette même étude, le gain de poids des porcs dont l'expérience de manipulation était positive a été 455 g/jour comparativement à 404 g/jour pour ceux avec une mauvaise expérience. Les manipulations positives et négatives consistaient en un trois minutes par jour soit de caresses et de tappotement, soit de poussées et de petits coups, et ce, lorsque l'animal approchait de la personne en face de leur stable.

C'est également à ce moment que le porcelet nouvellement sevré sera séparé de sa mère et du reste de la portée, subira un changement de son alimentation et changera d'environnement où il vivra l'établissement de la hiérarchie avec les nouveaux congénères (Forbes, 1995; Whittemore et Green, 2006).

1.2 *Stress physique*

Certains facteurs de stress psychologique, comme le changement d'alimentation et l'établissement de la hiérarchie, entraînent également un stress physique (Forbes, 1995; Whittemore et Green, 2006). Le sevrage a aussi des effets spécifiques sur certains tissus ou

organes. Certains auteurs rapportent des effets du sevrage sur les fonctions de la barrière intestinale (Spreeuwenberg et al., 2001; Boudry et al., 2004b). La barrière intestinale est composée d'une rangée simple de cellules épithéliales qui servent de première ligne de défense contre les attaques potentielles des micro-organismes et les antigènes résidents dans le lumen intestinal (Moore et al., 1989; Madara, 1990; Gewirtz et al., 2002). La diminution de l'efficacité de la barrière intestinale est caractérisée par l'augmentation de la perméabilité intestinale, qui permet le transfert des bactéries pathogènes du lumen intestinal à travers l'épithélium, résultant en une augmentation de l'inflammation, de la malabsorption, de la diarrhée et de maladies potentiellement systémiques (Livingston et al., 1995; Deitch et al., 1996; Berkes et al., 2003).

2. Impact du sevrage sur le système digestif

Le sevrage a un impact significatif sur tout le système digestif en commençant par l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin.

2.1 L'estomac

L'estomac comprend plusieurs fonctions telles que le mélange des aliments et la digestion partielle. Il sert aussi comme première barrière physique contre les pathogènes externes de l'environnement (Barrow et al., 1977; Zhang et Xu, 2003).

Snoeck et ses collaborateurs ont rapporté que le sevrage réduisait la mobilité gastrique (Snoeck et al. 2004). Compte tenu qu'en post-sevrage le pH gastrique est habituellement élevé, la stase gastrique pourrait donc être liée au développement de la diarrhée post-sevrage chez les porcelets en favorisant la prolifération des bactéries pathogènes (Snoeck et al. 2004). La stase gastrique a été documentée il y a déjà plusieurs années comme étant un facteur de la diarrhée post-sevrage chez les porcelets sevrés précocement (White et al., 1969; Barrow et al., 1977). De plus, il a été rapporté qu'un gène de stress, le récepteur 2 du facteur de libération de corticotrophine (CRFR2), est régulé à la hausse dans le jéjunum de porcelets sevrés (Moeser et al., 2007). L'activation de ce gène a déjà été identifiée comme impliquée dans l'inhibition de la motilité gastrique (Martinez et al., 2004b). Bien que le

CRFR2 reste encore à être identifié dans l'estomac des porcelets sevrés, Moeser et son équipe ont émis l'hypothèse que les changements dans la vidange gastrique pouvaient être modulés par rétroaction de l'intestin (Moeser et al., 2007). La prise alimentaire et la composition de l'alimentation sont également des facteurs qui peuvent être impliqués dans le taux de vidange gastrique (Rydning et al., 1985; Shi et al., 1997; Lalles et al., 2007). Il a été observé que des porcelets sevrés, qui ont été alimentés avec une ration à base d'un substitut de lait pendant cinq semaines, et qui sont passés brusquement à une ration à base de blé ou d'orge, ont eu une augmentation transitoire de la vidange gastrique (Boudry et al., 2004a).

Afin de pouvoir réaliser sa fonction de digestion, l'estomac est doté de cellules qui sécrètent de l'acide chlorhydrique (HCl), ce qui lui permet de conserver un pH faible qui se situe entre 3,0 et 4,0 (Yen, 2000). Un pH faible est requis pour la conversion des zymogènes gastriques en enzymes actives (Khan et al., 1999). Le pH optimum pour la digestion des protéines dans l'estomac est de 3,0 (Prohaszka et Baron, 1980). Plusieurs articles de la littérature rapportent des impacts du sevrage sur l'activité enzymatique de l'estomac. Hedemann et son équipe ont rapporté une baisse d'activité de la pepsine dans la muqueuse de l'estomac au moment du sevrage sans altérer l'activité de la lipase (Hedemann et al. 2004) tandis que d'autres études ont signalé une augmentation de l'activité de la pepsine et de la lipase de la muqueuse de l'estomac après le sevrage (Cranwell, 1985; Jensen et al., 1997).

De nombreuses bactéries, incluant *Escherichia Coli* (*E.coli*), ne peuvent tolérer une exposition à de faibles pH (entre 3,0 et 4,0) (Prohaszka et Baron, 1980; Modler et al., 1990; Yen, 2000). Dans ce cas, le maintien d'un pH gastrique faible est essentiel non seulement pour la digestion des nutriments, mais aussi pour une bonne santé intestinale puisque ce faible pH limite le passage des bactéries pathogènes vers l'intestin grêle. Comparativement à des porcelets élevés sous la mère, les porcelets sevrés ont un pH gastrique plus élevé (Manners, 1976; Efird et al, 1982). La diminution de l'ingestion de lactose baisse la production d'acide lactique par les bactéries lactiques, ce qui réduit le contenu total en acide de l'estomac. Le pH gastrique après le sevrage pourrait être, en partie, responsable de la sensibilité des porcelets aux infections provoquées par des pathogènes externes.

2.2 *Intestin grêle*

Au cours de la période suivant directement le sevrage des porcelets, d'importants changements surviennent dans la structure et la fonction de l'intestin grêle (Hopwood et Hampson, 2003). Ceux-ci sont corrélés dans le temps avec la croissance et les troubles intestinaux. Beaucoup de fonctions physiologiques sont effectuées par l'intestin grêle (Cranwell, 1995). Les principales sont l'absorption de nutriments (vitamines, minéraux, glucides, acides aminés, lipides), la sécrétion d'électrolytes et d'eau et le rôle de barrière physique afin de limiter l'entrée d'agents indésirables à travers l'épithélium.

a) Absorption des nutriments

La surface épithéliale de l'intestin grêle est parsemée de petits replis en forme de doigts appelés villosités. Celles-ci permettent d'augmenter la surface de contact avec les aliments pour maximiser le processus de digestion et d'absorption (Zhang et Xu, 2003). Ainsi, près de 90% de l'absorption des éléments nutritifs se déroule dans l'intestin grêle (Martini et al., 2009). De plus, entre chacune de ses villosités se trouve des glandes tubulaires que l'on appelle les cryptes. Les cryptes contiennent des cellules souches épithéliales nécessaires pour le remplacement des cellules épithéliales de la muqueuse (Zhang et Xu, 2003; Llyod et Gabe, 2008). Une muqueuse dont le fonctionnement sera optimal aura de hautes villosités et de courtes cryptes (Zhang et Xu, 2003).

Par contre, il y a une période après le sevrage où les villosités sont atrophiées et où les cryptes sont en conditions hyperplasiques (Hampson, 1986). Il est répertorié dans la littérature que le sevrage provoque des changements structurels considérables de l'intestin grêle des porcelets comme une diminution de la hauteur des villosités et une augmentation de la profondeur des cryptes (Hampson, 1986; Sharma et Schumacher, 1995). La hauteur des villosités est rapidement réduite de 25 à 35% dans les premières 24 h suivant le sevrage des porcelets âgés de 21 jours, et continue de diminuer jusqu'à cinq jours suivant le sevrage (Hampson, 1986). Toutefois, le sevrage est accompagné d'une augmentation temporaire du nombre de cellules à gobelet (Brown et al., 1988). Ces dernières sont responsables de la

production de mucine à la surface de l'épithélium intestinal. L'impact de la mucine comme barrière intestinale sera traité dans la section Les changements que l'on peut observer au niveau de l'absorption et de la sécrétion dans l'intestin grêle après le sevrage dépendent de la section de l'intestin grêle, soit le duodénum, jéjunum ou l'iléum (Pàcha, 2000; Xu, 2003). L'équipe de Boudry et al. (2004a) ont rapporté une augmentation de l'absorption du glucose dans le jéjunum mais la situation inverse a été observée dans l'iléon. Ils ont observé, malgré une atrophie des villosités et une diminution de l'activité enzymatique, une augmentation de la capacité d'absorption dans le jéjunum. L'augmentation de la capacité d'absorption du jéjunum pourrait avoir peu ou pas de signification au niveau biologique selon les auteurs. Par contre, la faible capacité d'absorption de l'iléum, peu après le sevrage, contribuerait aux diarrhées osmotiques chez les porcelets en augmentant la quantité de nutriments dans le gros intestin (Heo et al., 2012).

L'anorexie en post-sevrage a été suggérée comme la cause principale des changements de la hauteur des villosités et de la profondeur des cryptes car la consommation d'énergie après le sevrage est positivement liée à l'architecture de l'intestin grêle (Pluske et al., 1997). Dans le même sens, McCracken et son équipe rapportaient que l'anorexie suivant le sevrage était corrélée avec l'hypertrophie des cryptes et la réponse inflammatoire locale (McCracken et al., 1999). Il est évident que le maintien de la prise alimentaire et la réduction du stress au sevrage sont d'importants facteurs pour conserver l'intégrité de la structure de l'intestin grêle immédiatement après le sevrage (Pluske et al., 1996; van Beers-Schreurs et al., 1998; Moeser et al., 2007).

Finalement, l'équipe de Kelly et ses collaborateurs ont noté que, dans les trois premiers jours en post-sevrage et pour des porcelets nourris via une intubation gastrique, il y avait une réduction de la hauteur des villosités et une augmentation de la profondeur des cryptes (Kelly et al., 1991). Ils suggèrent que les changements morphologiques de l'architecture de l'intestin se produisent même si l'approvisionnement en éléments nutritifs est continu.

b) La sécrétion des électrolytes et d'eau

La sécrétion de fluides et d'électrolytes provenant des cellules des cryptes fait partie des fonctions principales de l'intestin grêle (Pàcha, 2000; Xu, 2003). Une petite quantité de

sécrétion intestinale est un phénomène physiologique naturel et essentiel pour la digestion et l'absorption des nutriments (Kaunitz et al., 1995; Pàcha, 2000; Wapnir et Teichberg, 2002). Toutefois, si le contenu en fluide et en électrolytes de l'intestin est supérieur à ce qui est absorbé par la muqueuse, cela peut être identifié comme un facteur prédisposant à une diarrhée sécrétoire (Pàcha, 2000; Wapnir et Teichberg, 2002). Le sevrage entraîne une réduction de l'absorption nette des fluides et des électrolytes ainsi qu'une mauvaise absorption des électrolytes dans l'intestin grêle des porcelets (Nabuurs et al., 1994; Miller et Skadhauge, 1997).

Une seule étude d'absorption intestinale *in vivo* en situation de sevrage semble disponible. Celle-ci indique une réduction de l'absorption nette des électrolytes (Nabuurs et al, 1996). Les études *in vitro* sont plus nombreuses. Elles permettent d'évaluer les caractéristiques électrolytiques, basales ou stimulées, d'une muqueuse, les propriétés d'absorption, de sécrétion et de perméabilité, ainsi que certains mécanismes (humoraux ou nerveux) impliqués. Les résultats plus anciens, comparant le jeune porcelet allaité au porcelet sevré depuis plusieurs semaines, indiquaient que les flux nets d'ions (Na^+ , Cl^- , HCO_3^- , etc.) à travers la muqueuse de l'intestin grêle diminuaient au cours du temps (Spreeuwenberg et al, 2001). L'analyse plus fine de la période post-sevrage a révélé un état hypersécrétoire transitoire de l'intestin grêle proximal et du côlon, deux à quatre jours après le sevrage (Spreeuwenberg et al, 2001). Cependant, la capacité sécrétoire des intestins, en réponse aux toxines endogènes diminue au fil du temps.

c) La barrière physique

La perméabilité para-cellulaire de l'épithélium (entre les cellules, au niveau des jonctions serrées), mesurée par des marqueurs comme interleukin- 1β (IL- 1β), IL-6 et tumor necrosis factor alpha (TNF α) ou évaluée par la résistance électrique du tissu, est transitoirement augmentée de deux à quatre jours après le sevrage dans le jejunum alors qu'elle diminue au niveau du côlon (Boudry et al., 2004b). Collectivement, ces résultats indiquent l'existence d'une période de perturbation dans la physiologie intestinale immédiatement après le sevrage, suivie par l'acquisition des propriétés anatomiques et fonctionnelles de type adulte. Les perturbations précoces sont probablement liées à l'anorexie en post-sevrage.

Les mécanismes intrinsèques de l'immunité proviennent de la présence d'une barrière physique formée par des cellules épithéliales spécialisées (Oswald, 2006). L'intégrité de l'épithélium est essentielle dans le maintien physique, bien que sélectif, de la barrière entre l'environnement interne et externe. La fonction de la barrière est maintenue par des structures intercellulaires bien organisées comprenant les jonctions serrées, les jonctions d'adhérence et les desmosomes, qui entourent la région apicale des cellules épithéliales (Gumbiner, 1993). Les jonctions serrées de cellules épithéliales consistent en une étroite structure en forme de ceinture dans la région apicale de la membrane plasmique latérale enveloppée autour de chaque cellule, rapprochant les cellules voisines pour être pratiquement collées les unes aux autres. L'adhésion en jonctions serrées du complexe cellule-cellule est obtenue par l'interaction de multiples protéines membranaires telles que *claudin* et *occludin*, protéines provenant du plasma membranaire des cellules épithéliales intestinales (CEI) adjacentes (Gumbiner, 1993).

D'autres protéines, comme *Zonula Occludens-1* (ZO-1), ZO-2 et la *cinguline* (CGN) sont également impliquées dans la régulation des jonctions serrées. L'adhérence consiste en des interactions régulées par l'adhésion hémophilique de protéines transmembranaires comme la *E-cadhérine* (Gumbiner, 1996) et les desmosomes au point où des filaments intra- et extra- cellulaires s'associent. Chez le porc, les jonctions serrées ont été très peu caractérisées dû à un manque de cellules épithéliales disponibles (Oswald, 2006). Des résultats ont indiqué que le sevrage induisait des changements dans la perméabilité de l'intestin aux macromolécules, ce qui pourrait en partie expliquer les diarrhées post-natales (Boudry et al., 2004b) mais également des modifications dans l'expression des protéines impliquées dans les jonctions serrées (Sun et al., 2008c). Une étude de Zhang et Guo (2009) a démontré que lors du sevrage, si on supplémente en Zn les porcelets, cela réduisait la perméabilité intestinale en augmentant l'expression des protéines *occludin* et ZO-1. Une autre étude est allée plus loin dans les résultats sur l'expression d'ARNm des protéines impliquées dans les jonctions serrées. Ils ont pu observer que comparativement au jour 0 c'est-à-dire la journée avant que les porcelets soient sevrés, il y avait une diminution de l'expression d'ARNm des protéines *occludin* et *claudin-1* au jour 3, 7 et 14 et une diminution au jour 3 et 7 de l'expression d'ARNm de ZO-1 (Hu et al., 2013).

Le mucus fait également partie des systèmes de protection développés par les cellules épithéliales intestinales. Il est composé de mucines associées à des protéines et des lipides. Il forme un gel continu dans lequel un fluide de bicarbonate riche est sécrété afin de maintenir un pH pour neutraliser la surface épithéliale. Les mucines sont synthétisées et produites par les cellules de Goblet par sécrétion et exocytose active (Perez-Vilar and Hill, 1999). L'adhésion serrée de mucine sur les surfaces apicales de l'épithélium est due à un complexe spécifique d'oligosaccharides-mucine et d'une liaison mucine-protéine sur le côté apical des cellules épithéliales. L'équilibre de la couche de mucus est géré de façon dynamique entre la synthèse et la sécrétion de mucine et l'érosion dans le lumen libérant la mucine dans la lumière intestinale (Perez Vilar and Hill, 1999; Desseyn et al., 2000).

2.3 *Gros intestin*

Le gros intestin est composé de trois sections : le caecum, le côlon et le rectum (Zhang et Xu, 2003). Les fonctions du gros intestin sont l'absorption des fluides et des électrolytes ainsi que la fermeture d'une barrière physique aux pathogènes microbiens (Williams et al., 2001; Zhang et Xu, 2003). Altérer l'une de ces fonctions pourrait donc jouer un rôle dans l'apparition de la diarrhée en post-sevrage. La surface de la muqueuse du gros intestin est formée de cryptes, mais il n'a pas de villosité. Un article de Castillon et de ses collaborateurs rapportait que le sevrage avait eu comme impact de diminuer la densité des cryptes et d'augmenter l'indice mitotique dans le caecum des porcelets (Castillon et al., 2007). Il a été démontré que les pertes excessives de fluides par l'intestin grêle résultent en une diarrhée post-sevrage lorsque la capacité d'absorption du gros intestin est atteinte (Boudry et al., 2004b). En fait, il semble qu'une combinaison entre l'altération de la structure et la fonction d'absorption du gros intestin contribuerait à l'augmentation de l'incidence de la diarrhée en post-sevrage (van Beers-Schreurs et al., 1992; Hopwood et Hampson, 2003). De son côté, Nabuurs (1998) rapportait que la réduction de la moitié de la capacité d'absorption du gros intestin augmentait les effets négatifs de l'activité de *E. coli* dans l'intestin grêle des porcelets.

3. L'impact du changement d'aliment

La diarrhée en post-sevrage chez le porcelet est le résultat de plusieurs facteurs. L'un des principaux facteurs est le stress provoqué par les changements dans l'environnement des porcelets, entre autres le passage de la forme liquide à la forme solide. Aussi, la quantité et la composition de la ration qui sera consommée durant les premiers jours suivant le sevrage est critique (Madec et al., 1998) pour une transition en post-sevrage réussie.

3.1 Retrait du lait et passage à un aliment solide

Le lait est un aliment liquide qui ne cause aucune blessure physique à la muqueuse intestinale. Toutefois, lors du sevrage, les jeunes porcelets commencent l'ingestion de moulée dont la forme solide provoque des effets négatifs à l'intestin (Forbes, 1995; Whittemore et Green, 2006). Il s'en suit donc des modifications physiologiques comme une diminution de la hauteur des villosités et de l'efficacité de la barrière intestinale contre les pathogènes (Forbes, 1995; Whittemore et Green, 2006).

L'équipe de Deprez (1987) avait investigué l'impact d'un changement de forme (liquide vers sèche) sur la hauteur des villosités. Un premier groupe de porcelets avaient alors été nourris avec une ration solide, ou sèche, pour porcelets. Pour le second groupe, de l'eau avaient été ajoutée à la ration solide dans un ratio 2 :1 afin de la rendre moins abrasive. Les résultats ont démontré qu'après huit jours, la hauteur des villosités était significativement plus petite dans le jéjunum et l'iléon lorsque les porcelets étaient nourris avec une ration sèche. Hampson (1986) avait observé ce même résultat mais cinq jours après le sevrage. Il est possible que l'ajout d'eau à la ration solide ait permis de réduire la déshydratation des porcelets et l'inflammation liée à l'effet abrasif des particules solides de l'aliment.

Chez le porcelet sevré dont la maturité du système digestif n'est pas atteinte, le lait et le colostrum fournis par la mère durant l'allaitement compense pour l'immaturité du système immunitaire intestinal (Telema et al., 1991; Miller et al., 1994). Le colostrum contient principalement des IgG et une faible concentration de IgA et IgM (Klobasa and Butler, 1987; Klobasa et al., 1987). Par la suite, le lait fourni par la truie contient aussi plusieurs facteurs de croissance et éléments qui favorisent la santé digestive des porcelets telles que

des cellules de défense (phagocytes, lymphocyte et cellules épithéliales) et des substances antimicrobiennes (lactoferrine, lysozyme) (Wagstrom et al., 2000). La lactoferrine a plusieurs effets de types antimicrobien, immunostimulateur et anti-inflammatoire en inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 β , IL-6, TNF- α et IL8 (Mattsbj-Baltzer et al., 1996; Haversen et al., 2000; Ellass et al., 2002). Également, le lait contient des polyamines qui ont une importance fondamentale dans la prolifération cellulaire et la différenciation (Johnson, 1988). Le lait contient également des glycoprotéines, des glycolipides, des mucines et des oligosaccharides (Newburg, 1999), des substances ayant une activité antimicrobienne mais qui agissent aussi comme facteur de croissance pour des bactéries bénéfiques au développement de l'immunité de l'intestin, les bifidobactéries (Kunz and Rudloff, 1993). Avec son retrait, le porcelet se retrouve sans ces éléments. Le moment du retrait du lait est donc très déterminant. Ce ne sont pas les mêmes enzymes qui digèrent les aliments solides et le lait. Il y a donc une période d'adaptation qui peut être parfois très difficile pour les porcelets (Opapeju et al., 2009; Kim et al., 2011; 2012).

3.2 *Facteur antigénique de protéine végétale*

Parmi les sources de protéines végétales, le tourteau de soya (SBM) est la principale source de protéines utilisée dans l'alimentation des porcs au Canada, aux États-Unis et dans plusieurs autres pays (Cromwell, 2000). Le profil en acides aminés du SBM se complémente bien à celui du maïs et d'autres céréales pour équilibrer les rations des porcs (Cromwell, 2000). Cependant, son inclusion dans les régimes alimentaires pour les porcs sevrés est limitée en raison de certains facteurs antinutritionnels (Chiba, 2001) et des propriétés antigéniques des protéines de soya provoquant une hypersensibilité à la muqueuse intestinale (Li et al., 1991; Bailey et al., 1993; Dreau et Lalles, 1999; Csaky et Fekete, 2004). Les effets néfastes provoqués par SBM chez les porcelets incluent une diminution du taux de croissance, de la digestibilité des nutriments et de la hauteur des villosités intestinales, ainsi qu'une réponse immunitaire supérieure aux protéines de soya (Li et al., 1991; Csaky et Fekete, 2004; Gu et Li, 2004; Sun et al., 2008a, b).

La sensibilisation des animaux aux protéines de soya peut être provoquée par plusieurs facteurs tels que la séquence d'acides aminés des allergènes, leurs propriétés structurales ou leur stabilité dans le tractus gastro-intestinal (Thomas et al., 2007; Fu et al., 2007; Zhao et al., 2008). Certaines protéines du SBM, la glycinine et la β -conglycinine, ont été identifiées comme provoquant une hypersensibilité chez les porcelets (Li et al., 1990). Fu et ses collaborateurs ont identifié et caractérisé la sous-unité β de la conglycinine comme étant un allergène potentiel pour les porcelets présentant des épitopes antigéniques sur la surface de la protéine (Fu et al. 2007). Chez l'homme, 34 protéines IgE réactives ont été identifiées et caractérisées pour le soya (Xiang et al., 2008) mais peu d'informations sont disponibles chez le porc sur la caractérisation des protéines immunogènes de soya.

Un traitement thermique appliqué au soya ou l'extrusion de la fève peut inactiver certains facteurs antinutritionnels (Danielson et Crenshaw, 1991). Cependant, ces processus peuvent aussi réduire la disponibilité des acides aminés, surtout quand le SBM est soumis à de trop hautes températures (Danielson et Crenshaw, 1991). La fermentation peut améliorer la valeur nutritionnelle du soya en augmentant la biodisponibilité des nutriments et en réduisant la présence de facteurs antinutritionnels (Egounlety et Aworh, 2003; Hotz et Gibson, 2007). Plusieurs études ont démontré que la fermentation des protéines de soya réduit sa réactivité immunitaire envers les IgEs chez l'humain, probablement en éliminant les épitopes présents dans la protéine d'origine (Song et al., 2008a, b). Le porcelet développe son immunité face aux protéines du soya durant les cinq premières semaines suivant le sevrage (Heppell et al., 1989). Sa tolérance est bien établie 12 semaines après le sevrage (Miller et al., 1994)

4. Présence de *Escherichia Coli* entérotoxigène

La bactérie *E. coli* entérotoxigène (ETEC) est l'une des six variantes pathogéniques de *E. coli* causant la diarrhée. Comme plusieurs autres bactéries, elle est recouverte de structures appelées fimbriae (Westerlund-Wikstrom et Korhonen, 2005). Ce sont de longues protéines de surfaces filamenteuses qui jouent un rôle clé dans la capacité d'infection (Westerlund-Wikstrom et Korhonen, 2005). Ces structures permettent aux bactéries d'adhérer

solidement aux cellules, de coloniser et ou d'envahir les cellules hôtes, et par la suite de survivre et de persister dans l'environnement pour causer la maladie (Krogfelt, 1991). Les fimbriae des bactéries Gram-positives sont composés entre autres de fibronectine, de collagène et de fibrinogène (Wang et al., 2003; Buckley et al., 2006) tandis que celles des Gram-négatives sont plutôt faites de glycoprotéines ou glycolipides et le site d'attachement est un résidu de saccharides (Van den Broeck et al., 2000; Sung et al., 2001; Van Gerven et al., 2008). L'article de Schroyen et de son équipe explique qu'il y a deux principaux types de fimbriae (pili) ETEC causant la diarrhée chez les porcelets. Ces deux types sont F4 et F18, les autres étant les F5, F6 et F41. Les fimbriae F18 sont généralement associés à la diarrhée chez les porcelets récemment sevrés, alors que les fimbriae F4 sont impliqués dans la diarrhée des porcelets nouveau-nés et récemment sevrés. Les antigènes F (fimbriales) ont été antérieurement décrits comme des antigènes K (kapsular), ce qui explique pourquoi la littérature se réfère à F4 comme étant K88. Pour provoquer la diarrhée, ETEC-F4 ou ETEC-F18 doit s'attacher, à l'aide de ses fimbriae, à un récepteur spécifique dans l'intestin grêle des porcelets. Toutefois, ce ne sont pas tous les porcelets qui expriment ces récepteurs à un même niveau. Le récepteur pour ETEC-F18 a été identifié comme étant le récepteur FUT1. Le récepteur F4 est plus complexe car il présente trois variantes : F4ab, F4ac et F4ad (Schroyen et al., 2012; Xia et al., 2015).

Le gène codant pour le récepteur F4 a été identifié en 2015 par l'équipe de Xia. Même s'il y a différentes variantes de F4 (F4ab, F4ac et F4ad), un seul récepteur est responsable de l'adhésion des fimbriae F4, le récepteur FaeG (Xia et al., 2015). Le fait d'identifier la mutation du gène sur le chromosome 13 peut être une occasion pour sélectionner les animaux contre ETEC-F4, et réduire les épisodes de diarrhée intense (Schroyen et al., 2012).

5. Développement du système immunitaire chez le porcelet

Le développement du système immunitaire des porcelets commence avec la prise de colostrum tout de suite après la naissance, puis certains facteurs de l'immunité sont consommés dans le lait pour finalement que le porcelet ait sa propre immunité.

Chez la truie, les immunoglobulines ne peuvent pas passer au travers le placenta. Aucune immunoglobuline n'a été détectée chez les porcelets dans les ganglions mésentériques, dans la moelle osseuse, dans le sang ombilical, dans les cellules sécrétrices d'immunoglobulines comme les cellules B ni dans les plaques de Peyer avant la naissance (Sinkora et al., 2002). Comme le nouveau-né est sans immunocompétence, leur survie dépend directement de l'immunité qu'ils acquerront du colostrum et du lait de leur mère. Leur système immunitaire intestinal est également immature et nécessite du temps pour se développer. Le colostrum et le lait de la truie contiennent des facteurs de croissance et des anticorps (IgG et IgA en majorité) qui jouent un rôle important dans la protection systémique et de la muqueuse intestinale contre les agents pathogènes dans les premières semaines de vie du porcelet mais surtout dans les premières 12 à 48 premières heures (Butler, 1974; De Diego et al., 1994). Les concentrations du colostrum en IgG et en IgA sont en moyenne de 105 et 14,5 mg/mL tandis que celles du lait, 24h après la naissance du premier porcelet, sont de 22 et 7 mg/mL (Guillou et al., 2012).

L'équipe de Nguyen (2007) a étudié les cytokines présentes dans le colostrum et le lait de la truie, de même que l'impact sur le porcelet. Durant les deux premiers jours de vie, le colostrum transfère aux porcelets toutes les cytokines nécessaires pour stimuler la production de cellules T helper (Th) (ou lymphocyte T) de tous les niveaux (Th1, Th2 et Th3), qui sont des intermédiaires de la réponse immunitaire. Les voici en ordre d'importance dans le colostrum chez la truie : $IL-4 > TGF-\beta 1 > IL-6 = IFN-\gamma > IL-12 > IL-10 = TNF\alpha$. Ces cytokines influencent le développement du système immunitaire du porcelet nouveau-né. Toutefois, dans le colostrum, les niveaux sont très variables d'une cytokine à l'autre (Nguyen et al., 2007) et plus le colostrum laisse place au lait, plus la concentration en cytokines diminue.

Bien que les cytokines aient plusieurs rôles, voici un résumé de certaines de leurs fonctions. L'interféron gamma (IFN- γ) et IL-12 sont produites par les Th1 et favorisent l'inflammation et la réponse de tous les lymphocytes T (Foussat et al., 2003). De son côté, IL-10 est produit par les Th2 et joue un rôle important dans la production d'anticorps et les réponses anti-inflammatoires. L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire importante car elle diminue l'inflammation médiée par les macrophages et par les lymphocytes T (Moore

et al., 2001). En effet, l'une de ses principales actions est la suppression des cellules Th1, qui produit des cytokines inflammatoires (Moore et al., 2001). Les IL-4 et IL-5 sont aussi produites par les Th2 et favorisent la réponse des cellules B. Le *transforming growth factor* beta (TGF- β) est pour sa part produit en grande partie par les Th3 qui ont une fonction immunorégulatrice (Foussat et al., 2003).

Le sevrage a un effet marqué sur la concentration sérique de cytokines chez le porcelet. Les concentrations d'IL-6, une cytokine pro-inflammatoire, et d'IL-12 sont augmentées par les changements de la microflore commensale (Nguyen et al., 2007). Toutefois, pour IFN- γ , IL-10, IL-4 et TGF- β 1, les concentrations ne semblent pas changer suite au sevrage.

Lors du sevrage, on place les porcelets de plusieurs portées ensemble, ce qui donne lieu à des blessures (Tan and Shackleton, 1990) et une élévation des niveaux d'hormones liées au stress (Moore et al., 1994). Il y a une libération de cortisol dans le sang et d'ACTH, une augmentation des battements cardiaques, une augmentation de la quantité de neutrophiles et une augmentation de la température corporelle (Moore et al., 1994). Le cortisol, un corticostéroïde, a la propriété d'inhiber la production d'IgA et d'IgM (Husband et al., 1973; Posey et al., 1978). De plus, le cortisol augmente la néoglucogenèse et inhibe la synthèse protéique, réduisant ainsi la déposition des acides aminés pour la croissance des muscles (Manchester, 1970). Toutefois, le cortisol augmente la quantité d'acides aminés libres dans le sérum (Manchester, 1970) qui au final peut résulter en une augmentation de la réaction inflammatoire (Taylor et al., 1997)

5.1 *Système immunitaire de la muqueuse intestinale*

Le développement de la réponse immunitaire dans la muqueuse intestinale du porcelet nécessite environ sept semaines pour atteindre le même niveau de maturité qu'un animal adulte (Stokes et al., 2004). Ce processus se divise en quatre étapes (Vega-Lopez et al., 1995; Stokes et al., 2004). À la naissance, on observe quelques groupes de lymphocytes mais aucun d'eux n'a de structure claire. Durant les premières deux semaines, l'intestin est rapidement colonisé par les cellules lymphoïdes mais celles-ci n'expriment pas significativement les récepteurs CD8 ou CD4 à leur surface (Stokes et al., 2004). Ces récepteurs sont associés à deux types de réponses immunitaires : innée et adaptative. Par

contre, c'est pendant ces deux semaines qu'il y a le plus d'expression de cytokines inflammatoires.

En fait, c'est à la première journée suivant le sevrage qu'on verra la plus grande augmentation de cytokines par rapport au jour 0 du sevrage (Pié et al., 2004; Tizard, 2004). Une analyse plus détaillée a démontré qu'entre le jour 0 et le jour 2 suivant le sevrage, il y a une augmentation de la concentration de l'ARNm de $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β et IL-6 (Stokes et al., 2004). Les cytokines IL-8, IL-12p40 et IL-18 connaîtront également des augmentations aux premiers jours post-sevrages mais moins importantes (Tizard, 2004). Toutefois, leur niveau descendra au jour 2 sous le niveau de référence du jour 0. Stokes et son équipe ont également démontré que les porcelets âgés de quatre à six semaines, soit habituellement les deux semaines suivant le sevrage, exprime des ARNm de cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-2, IFN- γ et IL12p40 et des cytokines anti-inflammatoires telles que IL-4, IL-5 et IL-10 dans toutes les parties de l'intestin (Stokes et al., 2004).

Le tableau 1.1 suivant est un résumé de l'expression de cytokines dans les différentes parties du petit intestin suivant le sevrage telle qu'observée par Pié et al. (2003).

Tableau 1.1 : Changement en post-sevrage de l'expression de cytokines dans les différentes parties du petit intestin de porcelets sevrés à 28 jours

Phase		Cytokines ¹					
	Site	IL-1 β	IL-6	$\text{TNF}\alpha$	IL-8	IL-12p40	IL-18
0 à 2 jours post-sevrage	Duodénum	+	+	0	0	0	0
	mi-Jéjunum	+	+	+	0	0	0
	Iléum	+	0	+	0	0	0
	Début colon	+	+	0	0	0	0
5 à 8 jours post-sevrage	Duodénum	0	0	-	0	-	0
	mi-Jéjunum	0	0	0	-	0	-
	Iléum	0	0	+	0	-	-
	Début colon	0	0	+	+	-	-

¹ + : augmentation; - : diminution; 0 : aucune changement (valeurs comparées à celles avant le sevrage)
Tiré de Pié et al., 2003

Par la suite, entre la deuxième et quatrième semaines, on peut observer des cellules lymphoïdes CD4 mais pas encore de CD8 (Stokes et al., 2004). Les cellules CD4 sont des lymphocytes T auxiliaires de type «helper», des intermédiaires de la réponse immunitaire, tandis que les CD8 sont des lymphocytes T cytotoxiques de type «killer» qui détruisent elles-mêmes les cellules infectées. De plus, un certain nombre de cellules B est présent et exprime des IgM (Stokes et al., 2004). Après la cinquième semaine, on voit les cellules lymphoïdes CD8 et une quantité significative d'IgA apparaître. À la fin de la septième semaine, la structure intestinale immunitaire du porcelet est comparable à celle d'un animal adulte.

Toutefois, ce développement du système immunitaire des porcelets peut être influencé par les diverses conditions du sevrage comme l'âge au sevrage, la forme et les ingrédients de la ration de même que la salubrité des bâtiments. Des porcelets sevrés dans des conditions conventionnelles présentent une muqueuse plus épaisse que des porcelets élevés et sevrés en conditions contrôlées (Stokes et al., 2004). Les cellules de ces derniers montrent des niveaux de marqueurs d'activation légèrement supérieurs.

6. Développement du statut antioxydant du porcelet

Le développement du statut antioxydant du porcelet évolue avec le temps en fonction de l'âge, de l'environnement et de l'alimentation du porcelet.

6.1 Avant le sevrage

Chez l'humain, des antioxydants tels que l'acide urique, la vitamine E et le bêta-carotène, se retrouvent dans le lait (Ostrea et al., 1986; Buescher et McIlheran, 1992). Les enfants qui sont nourris au lait artificiel doivent être supplémentés en vitamine E et en bêta-carotène pour atteindre la même concentration sanguine que ceux allaités (Ostrea et al., 1986). Chez la truie, il y a également des éléments essentiels aux porcelets pour le maintien de leur statut antioxydant. La lactoperoxydase (LPO) est une peroxydase qui est produite par des glandes sécrétrices exocrines dans des substances telles que le lait, la salive ou les larmes (Reiter and Härnultv, 1984; Shin et al., 2000). Cette enzyme est impliquée dans le système de défense naturelle contre les microorganismes envahisseurs. Il a été démontré, chez le

bovin que LPO avait des propriétés antioxydantes (Pruitt et al., 1990) car elle empêche l'accumulation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (El-Chemaly et al., 2003). Chez la truie, la concentration en LPO augmente significativement 6h après la parturition pour revenir à sa concentration initiale 12 h après la parturition (Albera and Kankofer, 2009). Vingt-quatre heures après parturition, la concentration augmente de nouveau pour atteindre la même qu'à 6 h après parturition et demeure stable jusqu'à 36 h.

Le lait des truies contient également de la lactoferrine (LF), une protéine liée à un ion de fer (Schanler 1989; Goldman et al. 1994). La LF possède des propriétés anti-inflammatoires et elle semble impliquée dans la phagocytose et la réponse immunitaire (Lonnerdal and Iyer, 1995). La concentration en LF du lait de la truie augmente après la parturition et atteint sa concentration maximale à 36 h suivant la naissance des porcelets (Albera and Kankofer, 2009).

6.2 Après le sevrage

Chez le porcelet, une étude a confirmé que le sevrage joue un rôle important dans le stress oxydatif et le métabolisme des radicaux libres en post-sevrage (Zhu et al., 2012). Le dommage oxydatif est généralement dû à une hausse des concentrations de ROS (reactive oxygen species), tandis que le niveau faible ou transitoire de ROS agit en activant la prolifération cellulaire ou les voies de signalisation de survie (Finkel, 2003; Buetler et al., 2004). Par exemple, les ROS sont utilisés par le système immunitaire pour attaquer et détruire les agents pathogènes (Segal et al., 2005) et peuvent induire la synthèse de la protéine activatrice 1, qui est un régulateur clé de la croissance et de la prolifération cellulaire (Kerr et al., 1992; Shaulian et al., 2002). Par contre, la surproduction de ROS et RNS (reactive-nitrogen species) peut entraîner un stress oxydatif (Valko et al., 2007) et des changements dans les systèmes de défense antioxydants, y compris l'activité d'enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GSH-Px) (Han et al., 2009b, 2011).

L'ajout d'antioxydants naturels, tels que la vitamine E (α -tocopherol) et la vitamine C est pratiquée pour réduire le stress oxydatif en élevage (Bonnette et al., 1990; Eicher et al., 2006; West et al., 2008; Deng et al., 2010). La concentration sérique en α -tocophérol

diminue dans les 14 premiers jours suivant le sevrage et ce, peu importe le type et la concentration ajoutée dans l'aliment (Ching et al., 2002). La vitamine A (rétinol ou caroténoïdes) a aussi une action antioxydante (Gerster, 1993). Toutefois, à haute concentration, la vitamine A aurait des effets négatifs sur l'absorption et la rétention de la vitamine E, affectant le statut antioxydant du jeune porcelet après le sevrage (Sklan et Donoghue, 1982; Blakely et al., 1991; Ching et al., 2002).

Une étude de Zhu et de ses collaborateurs évaluait l'ajout d'antioxydants (6,75 g/kg : 200 mg de vitamine C, 100mg de vitamine E, 450g de polyphenols de thé, 1 g d'acide lipoïque et 5g d'antioxydant microbien fermentés provenant de *Bacillus*, *Lactobacillus*, de bactéries photosynthétiques et de levures à bière) à la ration des porcelets lors du sevrage à différents âges (Zhu et al., 2012). Ils ont comparé trois groupes de porcelets : des témoins non sevrés, avec accès à volonté à la ration sèche à partir du jour 14; des porcelets sevrés à 21 jours, avec accès à la ration sèche à partir du jour 14 (ce qui s'approche beaucoup des pratiques commerciales au Québec); et des porcelets sevrés à 21 jours, avec accès à la ration sèche de base à 14 jours aussi mais enrichie d'antioxydants (sevrés avec antioxydants). Les résultats ont montré que le sevrage a entraîné une réduction de la hauteur et de la largeur des villosités ainsi qu'une diminution de l'activité des enzymes digestives pour les deux groupes sevrés. L'activité de la SOD a diminué et les concentrations de MDA, NO et H₂O₂ ont augmenté dans le sérum après le sevrage. Par rapport au groupe témoin, l'activité de la SOD dans le sérum a diminué au jour 28 et la teneur en MDA a augmenté au jour 35 dans le groupe sevré sans antioxydants. Toutefois, le régime avec un mélange d'antioxydants a réduit la concentration de MDA pour atteindre celle des porcelets non sevrés.

Dans cette même étude, l'expression des gènes liés aux enzymes antioxydantes et digestives, a été régulée à la baisse après le sevrage dans la muqueuse de l'intestin grêle des porcelets du groupe sevré. Toutefois, le groupe sevré avec antioxydants a plutôt vu l'expression des gènes de ces mêmes enzymes augmenter. La concentration de PGC-1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*), qui joue un rôle de protection contre le stress oxydatif, a été réduite dans la muqueuse des porcs sevrés et a augmenté dans la muqueuse des porcs sevrés avec antioxydants par rapport aux porcs témoins. Dans cette étude, le mélange d'antioxydants a démontré avoir le potentiel de

prévenir les dommages induits à la muqueuse intestinale par les radicaux libres et de moduler à la baisse le stress oxydatif de la muqueuse intestinale des gènes de PGC-1 α (Zhu et al., 2012).

En comparaison, l'équipe de Yin et al. (2014) a publié un article sur le sevrage précoce à 14 jours des porcelets et son impact sur l'activité des enzymes antioxydantes. Les résultats ont montré que le niveau de MDA plasmatique était significativement plus élevé trois jours après le sevrage et le niveau de carbonyles avait augmenté aux jours 1, 3, et 5 par rapport au jour 0 (le sevrage). Également, le sevrage précoce a supprimé l'activité de la SOD plasmatique au jour 1 après sevrage et a réduit l'activité de la GSHPx au jour 3 après sevrage. Les résultats de l'expression dans le jéjunum indiquent que l'expression des gènes liés à des enzymes antioxydantes a été régulée à la baisse aux jours 3 et 5 après le sevrage. La protéine découplante 2 (Ucp2), qui est considéré comme une régulatrice négative des ROS, a diminué dans l'iléon après le sevrage tandis que la p53 a augmenté dans le jéjunum après le sevrage. Pendant ce temps, le sevrage précoce a supprimé les signaux *p65* (aux jours 3, 5 et 7 après sevrage) et *Nrf2* (aux jours 5 et 7 après sevrage) dans le jéjunum, ce qui a régulé à la baisse l'expression de gènes d'enzymes antioxydantes et favoriser le développement du système antioxydant.

En résumé, les effets antioxydants dans la muqueuse des porcelets peuvent provenir de plusieurs sources comme l'activité d'enzymes antioxydantes ou des facteurs impliqués dans l'activités de ces enzymes (Yin et al., 2014). Avant le sevrage, la mère apportera par son lait les éléments nécessaires au maintien du statut antioxydant comme la lactoperoxydase et la lactoferrine. Ces enzymes ont des actions antioxydantes. Le lait apportera également des éléments comme la vitamine E et A qui sont impliqués dans la réaction d'oxydoréduction. Par la suite, après le sevrage, favoriser l'augmentation de l'expression des gènes d'enzymes antioxydantes telles que la GSH-Px, la catalase et la SOD et ajouter à l'alimentation des nutriments comme la vitamine E et C permettraient de maintenir les réactions antioxydantes et un statut oxydatif favorable (Yin et al., 2014). Finalement, la gestion d'élevage joue un rôle important sur le développement du système antioxydant des porcelets puisque le sevrage précoce pourrait affecter l'efficacité du système antioxydant en comparaison à un sevrage plus tardif.

7. Développement de la flore intestinale du porcelet

En plus du statut immunitaire et antioxydant, les bactéries qui colonisent la muqueuse intestinale, jouent, elles aussi un rôle important dans la défense contre les pathogènes. Entre autres, elles peuvent sécréter des substances antimicrobiennes qui inhibent la croissance des bactéries non désirables ou simplement, elles compétitionnent pour les mêmes nutriments (Cummings et al., 2004).

La flore est relativement spécifique à l'individu. Au moment du sevrage, des changements majeurs interviennent dans la composition de la flore du porcelet, sous l'influence de l'alimentation et de l'environnement (Akkermans et al., 2003; Jensen et al., 2003).

La succession de populations microbiennes dans le tube digestif pendant les premières semaines de vie est remarquablement similaire chez l'homme, le porc, le bovin et la volaille (Akkermans et al., 2003). Quelques jours après la naissance, les coliformes et les streptocoques dominent la flore digestive. Les bactéries anaérobies obligatoires apparaissent plus tard. Les clostridies et les lactobacilles sont aussi présents chez la plupart des hôtes pendant une courte période (Mackie et al., 1999). Chez le porc, le développement de la flore intestinale connaît une succession écologique rapide, de la naissance au sevrage. Ensuite, elle reste relativement stable en termes de composition d'espèces bactériennes et ceci tant que le porcelet consommera le lait maternel (Mathew et al., 1998). La différence de populations bactériennes entre un porcelet encore allaité et un porcelet sevré est marquée. L'introduction d'aliments solides à base de céréales, lesquelles modifient la disponibilité des éléments et les conditions du lumen intestinal (la fermentation des produits, le pH du lumen et la concentration en bile) (Opapeju et al., 2009; Kim et al., 2011; 2012), est probablement la cause principale associée à l'abondante augmentation de *Prevotella*, d'*Acetivibrio* (famille de clostridia), d'*Oribacterium*, de *Paraprevotella*, de *Roseburia* et de *Succinivibrio*. Dans cette situation, la très grande présence de *Prevotella*, soit à plus de 30%, pourrait être due à sa capacité de produire des enzymes telles que xylanase, mannanase, β -glucanase (Flint and Bayer, 2008) qui sont capables de dégrader les polysaccharides des céréales (Ivarsson et al., 2012).

Bien que le nombre et le type de bactéries du lumen intestinal puissent être nombreux on peut les classer en trois types de bactéries qui colonisent l'intestin (Konstantinov et al., 2003). Les bactéries pathogènes (p. ex. *E. coli* et *Salmonella*) ont la capacité de produire des toxines et ont un potentiel d'invasion très élevé. Les bactéries nocives (p. ex. *E. coli* et les *Bactéroides*) produisent des composés nocifs tels que de l'ammoniac, le scatol ou les phénols. Finalement, les bactéries favorables à l'intestin (p. ex. *Lactobacilles* et *Bifidobactéries*) entrent en compétition avec les autres types de bactéries afin de maintenir leurs niveaux bas et stimulent le système immunitaire.

Chez l'homme tout comme chez le porc, les premières bactéries colonisatrices sont *Escherichia coli* et *Clostridium spp.* (Favier et al., 2002). Après quelques jours, apparaissent les premières *Bifidobacterium spp.* Celles-ci restent dominantes pendant l'allaitement maternel. Après le sevrage, et surtout durant la première semaine suivant le sevrage, il se crée une homogénéité riche et stable dominée par les bactéries anaérobiques (Inoue et al., 2005; Thompson et al., 2008). Également, la flore devient plus complexe, avec l'apparition d'autres types bactériens, notamment *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Enterococcus* et *Enterobacter spp.* Avec l'âge, ces profils bactériens deviennent encore plus complexes et plus stables. Aussi, plusieurs études chez le porcelet ont démontré que les *Firmicutes* et les *Bactéroïdètes phyla* comptent pour plus de 90% des bactéries présentes dans l'iléum des porcelets sevrés (Poroyko et al., 2010; Kim et al., 2011; Schmidt et al., 2011; Buzoianu et al., 2012; Schokker et al., 2014).

8. Stratégies pour réduire les effets du sevrage

Les effets du sevrage sur le porcelet sont multiples, proviennent de plusieurs facteurs et ont souvent un impact négatif. Toutefois, plusieurs stratégies, tant alimentaire qu'au niveau de la gestion d'élevage, peuvent être utilisées afin de diminuer les effets négatifs du sevrage.

8.1 L'âge au sevrage

Dans les élevages porcins traditionnels, jusqu'au milieu des années 1990, le sevrage était préconisé vers l'âge de 21 à 28 jours; un sevrage avant l'âge de 21 jours n'était pas

recommandé, compte tenu des risques pour la santé des animaux et des conditions spécialisées d'élevage requises (Conseil de recherches agro-alimentaires du Canada et Conseil canadien du porc, 2003). Cependant, les stratégies de sevrage précoces se sont largement répandues depuis environ 20 ans. Le sevrage précoce signifie que les porcelets sont séparés de la truie entre l'âge de 14 et 20 jours, la moyenne étant de 17 jours (Conseil de recherches agro-alimentaires du Canada et Conseil canadien du porc, 2003). Toutefois, les pratiques actuelles sont plutôt un sevrage à 20-21 jours. Les porcelets sont retirés de la mère au moment où ils profitent encore de l'immunité passive offerte par le lait maternel, mais avant qu'ils ne soient infectés par des microorganismes pathogènes de l'environnement. Dans des conditions d'élevage adéquates, les porcelets sevrés précocement demeurent en santé et peuvent prendre du poids de manière constante (Conseil de recherches agro-alimentaires du Canada et Conseil canadien du porc, 2003).

Certains éléments se rapportant à l'âge ont déjà été traité dans les sections précédentes sur le développement du système immunitaire et sur le développement du statut antioxydant du porcelet.

Comme vu précédemment, plus le sevrage se fait tôt, moins les systèmes immunitaire, antioxydant et digestif ne sont suffisamment développés (Yin et al., 2014). L'âge au sevrage a donc un impact très important sur ces trois systèmes. Une étude réalisée par Yin et ses collaborateurs a mis à jour l'impact d'un sevrage précoce à 14 jours d'âge sur le statut antioxydant et le système immunitaire du porcelet. L'activité de la SOD au jour 1 après le sevrage a été supprimée, de même que l'activité de la GSH-Px au jour 3 après le sevrage et la concentration en MDA a triplé au jour 3 après le sevrage. Des porcelets sevrés entre 14 et 21 jours montrent quant à eux une diminution dans la prolifération des lymphocytes (Blecha et al., 1983).

L'équipe de Kick (2012) a réalisé une étude afin de comparer les impacts d'un sevrage à 14, 21 et 28 jours sur le développement de l'immunité des porcelets. Les résultats obtenus ne permettaient pas de faire la démonstration que l'impact le développement ultérieur du système immunitaire des porcelets sera affecté par un sevrage à 14 jours vs un sevrage à 21 ou 28 jours (Kick et al., 2012).

Le système digestif évolue également avec le temps et encore plus lorsque le sevrage survient. Les effets négatifs du sevrage sur la physiologie du système digestif sont importants. L'article de Marion et al. (2002) compare l'évolution de la physiologie du petit intestin chez des porcelets âgés de 7 à 21 jours, non sevrés et sevrés. Ils ont démontré que la hauteur des villosités diminuait de façon linéaire chez les porcelets non sevrés entre le jour 7 et 21, débutant à 975 et terminant à 581 μm tandis que chez les porcelets sevrés, il y avait une diminution abrupte lors du sevrage (de 975 à 403 μm) puis une amélioration linéaire jusqu'au jour 21 (661 μm) où il n'y avait plus de différence significative. Les porcelets non sevrés ont donc en général une meilleure assimilation des nutriments car la hauteur des villosités est en moyenne plus élevée entre le jour 7 et le jour 21 (Marion et al., 2002).

8.2 *Formulation alimentaire*

Au Québec, les rations alimentaires pour les porcs sont constituées d'environ 60% de céréales et 35% de matières grasses et de sources protéiques (Lafond, 2009). Le maïs est l'ingrédient de base du régime alimentaire des porcs car il est très riche en énergie et très digestible (Lafond, 2009). Le tourteau de soja est un excellent complément au maïs, principalement en raison de sa teneur élevée en protéines (43 à 49%) et en lysine (2,8%) (Lafond, 2009). Par contre, le porcelet sevré a une capacité limitée pour la digestion des ingrédients d'origine végétale, comme le tourteau de soja. Pour faciliter le sevrage, on utilise donc des coproduits laitiers riches en lactose et des protéines animales hautement digestibles, comme le plasma sanguin (Reese et al., 2000). La présence du soja dans les rations des porcelets engendre parfois des réactions négatives comme une diminution de la croissance (Reese et al., 2000). Pour ces raisons, l'intégration de ces sous-produits d'origine animale à l'alimentation des porcelets a été favorisée (Reese et al., 2000).

Le système digestif du porcelet est d'abord conçu pour digérer et absorber des constituants laitiers. Dans ce cas, un sevrage précoce suivi d'une ration solide sans période de transition peut engendrer un stress chez l'animal (Tokach et al., 2003). Les fabricants de moulées ont donc mis au point des mélanges d'aliments qui tiennent compte de ce passage forcé, en introduisant divers ingrédients d'origine animale comme la poudre de lait écrémé, le plasma sanguin ou des farines de poissons (Li et al., 2003).

Ce passage graduel vers des aliments d'origines végétales permet à l'animal de développer les enzymes nécessaires à la digestion de ce nouveau régime alimentaire et ainsi, réduire les pertes de poids liées à une anorexie post-sevrage (Reese et al., 2000).

8.3 Farine de plasma

Le plasma sanguin séché, qui contient entre 80 et 90% de protéines brutes et 7 à 9% de lysine, est le composé nutritionnel qui a suscité le plus d'intérêt pour l'alimentation du porcelet sevré au cours des années 1980-1990 (Tokach et al., 1997). Il peut être obtenu à partir du sang de porcs ou de bovins, la source porcine étant jugée meilleure d'abord pour son goût (Ermer et al., 1994) mais surtout pour son contenu en facteurs de croissance comme le *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) (van Dijk et al., 2001). Bien que le plasma soit coûteux, son emploi dans l'alimentation du porcelet nouvellement sevré (à une concentration variant de 5 à 7 %) entraîne un accroissement linéaire du gain de poids quotidien (Hansen et al., 1993; van Dijk et al., 2001). La principale caractéristique du plasma est de favoriser et d'accroître l'appétence de la ration pour le porcelet (Pierce et al., 1995; van Dijk et al., 2001). Une étude de Bosi et de ses collaborateurs (2001) a démontré que le plasma exerçait aussi une action protectrice contre certaines bactéries pathogènes intestinales, comme *E. coli*. Ce sous-produit est donc rapidement devenu une source nutritive importante pour le porcelet sevré (Tokach et al., 1997).

8.4 Antibiotiques

Depuis plus de 50 ans, la suppression des maladies entériques ou respiratoires et la promotion de la croissance ont été obtenues par l'inclusion de divers antibiotiques (Mroz, 2005) tels que Streptomycine et la famille des Tétracyclines (Institut national de la santé publique du Québec, 2013). La Vancomycine est surtout connue à cause de la bactérie *Enterococcus spp.* dont certaines souches ont développé une résistance à son égard, surtout en milieu hospitalier (Institut national de la santé publique du Québec, 2013) et agents chimio thérapeutiques à des doses sous-thérapeutiques dans le régime alimentaire pour porc (Mroz, 2005). En fait, ces molécules sont employées dans de nombreux domaines comme principal moyen de lutte contre les infections bactériennes ou simplement pour contrôler la croissance de certains types de bactéries. Comme chez l'humain, les antibiotiques sont

utilisés dans les élevages afin de traiter certaines maladies qui nuisent à la santé des animaux. Les avantages économiques estimés de l'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance variaient de 3,3 à 8,8 % en termes de croissance améliorées et de 2,5 à 7,0% chez le porcelet sevré pour l'efficacité alimentaire (Viaene et Verbeke, 1999).

Toutefois, les antibiotiques ont été consommés à l'excès dans les dernières décennies, étant utilisés sans même l'apparition de symptômes de maladies. Cette pratique mène à l'apparition d'antibiorésistance. Cette dernière est le résultat d'une mutation des gènes des bactéries qui lui donne la capacité de résister à l'action des antibiotiques : « Une bactérie est résistante à un antibiotique lorsqu'elle supporte des concentrations inhibitrices de cet antibiotique supérieures aux concentrations que l'on peut obtenir dans l'organisme sans atteindre les doses toxiques » (Ferron, 1994). De nombreuses molécules antibiotiques ont vu leur spectre théorique d'activité se restreindre avec l'émergence d'un grand nombre de souches bactériennes résistantes (Andremont et al., 1997).

8.5 Probiotiques et prébiotiques

L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) et l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) ont donné, en 2001, une définition officielle des probiotiques qui est : « les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels ». Par exemple, une étude publiée par Abe et ses collaborateurs (1995) rapporte que chez le porcelet élevé sans antibiotique, l'ingestion orale de *Lactobacillus* et de *Bifidobacterium* a diminué significativement la fréquence des diarrhées et la mortalité et a fait améliorer significativement le gain de poids et la conversion alimentaire comparativement au groupe témoin. Également, un article paru récemment, présentait les résultats de l'effet de *Lactobacillus reuteri* I5007 chez le porcelet nouveau-né élevé en conditions commerciales (Yang et al., 2015). Ils ont rapporté que *Lactobacillus reuteri* I5007, lorsqu'administré oralement à une dose de 6×10^9 CFU de façon quotidienne pendant 14 jours, a fait augmenter significativement l'expression des protéines épithéliales de l'intestin soit *claudin-1*, *occludin* et *ZO-1* chez le porcelet nouveau-né. Comme discuté précédemment, ces protéines sont impliquées dans le mécanisme des jonctions serrées de

l'intestin et jouent un grand rôle dans la protection contre les pathogènes par la barrière intestinale. Alors en augmentant l'expression de ses protéines, on améliore la capacité de la barrière intestinale à protéger l'hôte contre les agents pathogènes. Une autre partie de l'étude de Yang et de ses collaborateurs (2015) était en culture *in vitro*, avec des cellules soumises à un traitement avec du LPS (1 µg/ml) pendant 1, 4, 8, 12 et 24 h, ce qui a provoqué une augmentation de l'expression de TNFα et d'IL-6 puis une diminution des protéines impliquées dans les jonctions serrées. Puis, ces mêmes cellules ont été traitées avec *Lactobacillus reuteri* I5007 pendant 2 h. Ce dernier traitement a permis de renverser les effets du LPS, soit de rétablir l'expression des protéines *claudin-1*, *occludin* et *ZO-1*.

Il est connu que les différentes souches de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* agissent comme suppresseurs ou inhibiteurs de bactéries pathogènes (Servin, 2004), probablement en raison de la production de peptides antimicrobiens et des acides organiques (Liévin-Le Moal and Servin, 2014). Il a été également démontré que d'inoculer des porcs avec des inoculums d'intestin ou d'excréments d'autres porcs qui contiennent des lactobacilles et des bifidobactéries, provoquait une augmentation de ces dernières. Et cela aurait pour effet d'augmenter la production d'acides organiques provenant de la fermentation bactérienne et aiderait à lutter contre les bactéries pathogènes provoquant la diarrhée (Wang et al., 2004b; Moura et al., 2008; Kim et al., 2010; Li et al., 2012b). Comme mentionné précédemment à la section 7 (Développement de la flore intestinale du porcelet), ces deux familles de bactéries sont des bactéries favorables au bon fonctionnement de la flore intestinale.

Les prébiotiques, quant à eux, sont plutôt des nutriments qui induisent une croissance ou améliorent l'activité des microorganismes de l'intestin (bactéries et levures) (Roberfroid, 2007). Ce sont généralement des oligosaccharides ou des polysaccharides à courte chaîne formés de deux à vingt unités de sucre. Ils échappent à la digestion dans l'intestin grêle et sont des substrats potentiels pour l'hydrolyse et la fermentation par les bactéries intestinales. En agissant comme substrat, il stimule la croissance de certaines bactéries en particuliers (Roberfroid, 2007). Les prébiotiques ont aussi la capacité de diminuer la présence de certaines bactéries. Par exemple, les proanthocyanidines contenu dans la canneberge sont connus pour se fixer à la bactérie *E. coli*, l'empêchant de se fixer à l'épithélium intestinal, et l'expulse hors du système digestif (Turner et al., 2005).

Chez l'homme, il est bien établi que les fibres prébiotiques par exemple, qui sont des fibres non digestibles fermentées par le microbiote intestinal, telles que les polymères de fructose ou le galactose, peuvent entraîner une augmentation de la croissance des bactéries bénéfiques recrutées dans le microbiote commensal (Roberfroid et al., 2010). Il est permis de croire que l'utilisation de prébiotiques diminuerait l'incidence des infections chez le porcelet en inhibant les bactéries pathogènes ou en améliorant l'état de santé général. Les études chez les animaux n'ont cependant pas été concluantes pour établir le même effet chez les porcelets au sevrage (Houdijk et al., 2002; Mikkelsen and al., 2003; Mikkelsen and Jensen, 2004; Shim et al., 2005; Mountzouris et al., 2006), peut-être en raison des difficultés à observer l'impact sur l'incidence de la diarrhée chez un animal en bonne santé. En revanche, les études utilisant des infections expérimentales avec des interventions prébiotiques montrent généralement un effet protecteur contre la diarrhée en post-sevrage (Molbak et al., 2007; Thomsen et al., 2007; Jensen et al., 2011).

Sur le marché d'élevage, le mannan oligosaccharides (MOS) est le plus utilisé et est presque exclusivement dérivé de *S. cerevisiae* (Spring, 1999). Le MOS, qui a été étudié depuis plus de 20 ans, aurait des effets potentiels sur la flore intestinale, la morphologie du système digestif, la digestibilité des nutriments et sur la réponse immunitaire des animaux de la ferme (Halas et Nochta, 2012).

Dans la littérature chez le porcelet, il est rapporté que les bactéries entériques pathogènes comme *E. coli* et *Salmonella*, s'attachent aux mannans dans le lumen intestinal et sont par la suite excrétées (Spring, 1999). Une supplémentation en MOS a aussi comme impact d'augmenter la production d'acide lactique dans le système digestif (Poeikhampha and Bunchasak, 2011), ce qui fait diminuer le pH intestinal. Comme vu précédemment, un pH gastrique faible est requis pour conserver une bonne santé intestinale car il limite le passage des bactéries pathogènes vers l'intestin grêle. Également, l'étude de Nochta et de ses collaborateurs a démontré que pour les porcelets sevrés, l'ajout de mannan à la ration augmentait la digestibilité iléale apparente des nutriments tels que des acides aminés essentiels (lysine, méthionine, méthionine+cystéine, thréonine), du calcium et du phosphore (Notchta et al. 2010). Plus précisément, lorsque les porcelets recevaient du MOS, la digestibilité iléale apparente était similaire à celle des porcelets dont l'alimentation

contenait des antibiotiques comme promoteur de croissance (Notchta et al. 2010). Le MOS a aussi un effet bénéfique sur les porcelets de 21 jours inoculés avec le SRRP en augmentant rapidement le nombre de leukocytes, de lymphocytes et de neutrophiles (Che et al., 2011). Toutefois, les effets du MOS sur les performances de croissance sont discutables. Certaines études rapportent des effets positifs significatifs (Davis et al., 2002; Castillo et al., 2008; Le Mieux et al., 2010) tandis que d'autres n'ont observé aucun effet (White et al., 2001; Hancock et al., 2003; Van der Peet-Schwering et al., 2007). Miguel et ses collaborateurs ont quant à eux fait la démonstration qu'une supplémentation en MOS augmentait le taux de croissance mais principalement chez les porcelets, durant les deux premières semaines après le sevrage (Miguel et al., 2004).

9. Le zinc chez le porcelet sevré

Le Zn est un oligo-élément essentiel pour les porcs. Il a un impact important sur les performances zootechniques des animaux (Case and Carlson, 2002; Hu et al., 2012a, b, 2013; Martin et al., 2013b), de même qu'un rôle dans plusieurs voies métaboliques (Case and Carlson, 2002; Martin et al., 2013a,b). Il est également nécessaire à l'intégrité de la muqueuse (Hu et al., 2012a,b) et joue un rôle d'antimicrobien (Katouli et al., 1999; Hojberg et al., 2005; Broom et al., 2006; Hu et al., 2013; Starke et al., 2013) ainsi que de co-facteur de la thymuline un peptide activant la division des lymphocytes T cytotoxiques pour le système immunitaire (Broom et al., 2006; Hu et al., 2012a,b; 2013). Il joue un rôle crucial dans le métabolisme lipidique, protéique et glucidique (Li et al., 2006). Il est également impliqué dans la composition de plusieurs métalloenzymes telles que les ADN et ARN synthétases, les transférases et de nombreuses enzymes digestives et il est associé à l'action effective de l'insuline. Une carence de ce micronutriment provoque chez le porc un retard de croissance et une réduction de l'activité enzymatique globale dans les tissus, bien que la carence est parfois difficile à diagnostiquer (Prasad et al., 1969; Prasad et Oberleas, 1971). Chez le porc, les principaux signes cliniques d'une carence en zinc sont la perte d'appétit, la diarrhée, le retard de croissance et la parakératose (Scott, 1972). Même si le niveau recommandé de Zn dans la ration des porcelets sevrés est de 100 mg/kg (NRC,

2012), des niveaux pharmacologiques (jusqu'à 3 000 mg/kg) ont déjà été utilisés comme antimicrobien pour aider à prévenir la diarrhée et comme facteur de croissance en période post-sevrage (Roy et al., 1992; Katouli et al., 1999; Carlson et al., 1999; Hojberg et al., 2005; Feng et al., 2006; Hu et al., 2012a,b).

9.1 Performance de croissance

Le Zn utilisé en large dose a un impact marqué sur les performances de croissance des porcelets sevrés. Il permet de diminuer l'incidence des diarrhées (Hu et al., 2012a, b; Hu et al., 2013; Martin et al., 2013b) et d'augmenter le gain de poids et la prise alimentaire (Case and Carlson, 2002; Hu et al., 2012a,b; Hu et al., 2013; Martin et al., 2013b). L'amélioration des performances de croissance des porcelets sevrés est également due aux effets antimicrobiens du Zn sur les bactéries pathogènes, sur le système immunitaire et sur l'intégrité de la muqueuse intestinale. Les sections suivantes permettront de mieux comprendre ces impacts.

9.2 Métallothionéine et métabolisme du zinc

Le métabolisme du Zn est régulé, en partie, par des métalloprotéines que l'on appelle Métallothionéine (MT). La MT est une petite métalloprotéine intracellulaire (St-Croix et al., 2005). Il y a quatre iso-formes de MT. Les MT-1 et MT-2 se retrouvent principalement dans les tissus tels que le pancréas, le foie, l'intestin et les reins tandis que MT-3 et MT4 se retrouvent principalement dans le cerveau et la peau (Kägi et Nordberg, 1979; Kägi et Kojima, 1987). La MT-1 est impliquée dans l'homéostasie du Zn. Donc, plus il y a de Zn en circulation, plus il y a de MT-1 produite (Martin et al., 2013a). Ajouter dans l'alimentation à raison de 2000-3000 mg de Zn/kg, le ZnO augmente les niveaux d'ARNm de la MT-1 et l'expression des protéines dans les muqueuses intestinales et dans le plasma chez des porcelets sevrés (Martinez et al., 2004, 2005). Elle joue plusieurs rôles importants dans l'organisme dont la protection contre les métaux toxiques et l'homéostasie de ceux-ci ainsi qu'une fonction d'antioxydant. La libération de Zn^{2+} des protéines MT (et des autres protéines) serait due en partie à la modification oxydative des protéines contenant du Zn^{2+} . En présence d'oxyde nitrique (NO), MT-1 subit un changement de conformation qui libère Zn^{2+} (Pearce and al., 2000; St-Croix et al., 2002; Spahl et al., 2003).

Dans l'étude de Wisemann (2007), on a étudié le rôle potentiel des altérations dans l'homéostasie du Zn^{2+} chez les cellules endothéliales exposées de façon aiguë au peroxyde. On a rapporté que l'augmentation intracellulaire de Zn^{2+} est un événement clé associé à la perturbation de la fonction mitochondriale et de l'induction de la voie signalétique de l'apoptose par le stress oxydatif aiguë régulé par H_2O_2 dans les cellules endothéliales pulmonaires de l'artère.

Le Zn est également un cofacteur de l'enzyme CuZn-superoxyde-dismutase (CuZn-SOD). Cette dernière catalyse la dismutation de l'anion superoxyde O_2^- en du H_2O_2 , et sa concentration est augmentée au cours de périodes de stress oxydatif (Fukai et Ushio-Fukai, 2011).

9.3 *Altérations morphologiques et des fonctions de la muqueuse intestinale*

Que ce soit positivement par l'ajout de Zn ou négativement lors d'une carence, le Zn a un impact sur la morphologie de la muqueuse intestinale du porcelet. L'ajout de ZnO à raison de 3 000 mg/kg dans la première ration pour porcelets améliore la prolifération cellulaire, ce qui a pour conséquence l'augmentation de la profondeur des cryptes, de l'épaisseur de la muqueuse, de la hauteur des villosités et du ratio hauteur de villosité : profondeur des cryptes (Li et al., 2001; Hu et al., 2012a,b). Des niveaux élevés de ZnO (2 500 mg/kg) donnés à des porcelets modifient la composition chimique des mucines avec une plus grande quantité de mucines neutres, acides et sulfatés dans le caecum et le côlon (Hedemann et al., 2006). Une diminution du pH des mucines de l'intestin permet de diminuer la présence de certaines bactéries pathogènes car de nombreuses bactéries, incluant *E. coli*, ne peuvent tolérer une exposition à de faibles pH (entre 3,0 et 4,0) (Prohaszka et Baron, 1980; Modler et al., 1990; Yen, 2000).

Chez le jeune enfant, la diarrhée peut être associée à une carence en Zn (Bhandari et al., 1996; Bahl et al., 1998). La carence en Zn peut provoquer la diarrhée due à une carence en éléments nutritifs et à une dysfonction des cellules, incluant une diminution de l'activité Na^+/K^+ ATPase et une diminution de l'absorption du sodium et de l'eau. Le Zn a des effets de régulation et de contrôle sur la diarrhée du porcelet nouvellement sevré (Li et al., 2001; Case et Carlson, 2002). Le traitement de Zn (2000-3 000 mg/kg) réduit également la

réponse à la sérotonine et affecte la sécrétion de peptides intestinaux vasoactifs dans la muqueuse intestinale (Wapnir, 2000; Carlson et al., 2008). Cela peut mener à une diminution de la sécrétion d'électrolytes et donc de la diarrhée des porcelets en post-sevrage (Feng et al., 2006).

Chez le rat, une carence en Zn dans les aliments cause une dépréciation de l'architecture de l'intestin et des organelles de celui-ci, comme de plus courtes et plus étroites villosités au niveau du jéjunum, une surface d'absorption réduite, un nombre de mitochondries diminué, un réticulum endoplasmique gonflé et un appareil de Golgi atrophié, accompagnée d'une augmentation de la perméabilité membranaire et une diminution de la mobilité cellulaire (Southon et al., 1986). Chez le mouton, la carence en Zn diminue le nombre de cellules caliciformes (ou cellules de Gobelet) qui produisent le mucus intestinal (Quarterman et al., 1976). Cette diminution permet la pénétration de la couche de mucus par des micro-organismes pathogènes et finalement, les maladies infectieuses (Quarterman et al., 1976).

9.4 Croissance bactérienne et activité digestive

L'iléon des porcs abrite un écosystème bactérien très diversifié, et ces communautés bactériennes sont en contact intime avec les tissus de l'hôte induisant différentes réactions par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes différents (Willing and Van Kessel, 2010). Des doses pharmacologiques de Zn (2 000-3 000 mg/kg) agissent dans ce cas comme un agent de contrôle de la microflore (Hahn et Baker, 1993; Poulsen, 1995; Hill et al, 2000, 2001; Case et Carlson, 2002; Hoque et Binder, 2006; Yin et al., 2008; Sales, 2013). Les effets rapportés comprennent l'augmentation de l'expression du gène des peptides antimicrobiens dans l'intestin grêle (Wang et al., 2004a), des effets positifs sur la stabilité et la diversité de la flore microbienne (Katouli et al., 1999), et des effets bactéricides (Jensen-Waern et al., 1998).

L'équipe de Hedemann (2006) ont constaté des changements dans certaines enzymes pancréatiques chez des porcelets nourris avec 2 500 mg/kg, mais ils n'ont pu conclure sur les effets clairs qu'exercent une dose pharmacologique de Zn sur l'amélioration de la croissance ou la réduction de la diarrhée.

De leur côté, Hojberg et son équipe (2005), en utilisant 2 500 mg/kg de ZnO, ont pu démontrer une activité bactérienne réduite dans le digesta du tractus gastro-intestinal, comparativement aux porcelets nourris avec la quantité recommandée par le NRC (1998), soit 100 mg/kg. Le nombre de lactobacilles et des autres bactéries productrices d'acide lactique avait été réduit, tandis que les coliformes et les bactéries entérocoques avaient été augmentés chez les porcelets recevant un niveau élevé de ZnO. Ils ont émis l'hypothèse que l'influence de ZnO sur la flore du tractus gastro-intestinal ressemblait au mécanisme suggéré pour certains antibiotiques promoteurs de croissance, c'est-à-dire la suppression des bactéries commensales Gram-positive plutôt que les organismes pathogènes potentiels, les bactéries Gram-négative comme *E. coli*.

Selon l'étude de Pieper et al. (2012), le Zn en dose pharmacologique a fait augmenter le nombre d'entérobactéries et la diversité bactérienne générale, alors que d'autres groupes comme les *Clostridium* ont été réduites. Ils ont aussi observé que les lactobacilles, un des groupes prédominants dans l'intestin grêle des porcs (Pieper et al., 2008) n'ont pas été influencés, ce qui contraste avec d'autres résultats antérieurs (Hojberg et al., 2005). Toutefois, une autre équipe a obtenu des données suggérant des changements au sein du groupe de *Lactobacillus* (Vahjen et al., 2011), ce qui peut expliquer l'absence de différence dans le nombre de *Lactobacillus*. Vahjen et al. (2010) ont pour leur part démontré que les *Lactobacillus spp.* ont été réduites à des doses pharmacologiques de ZnO, de même que la quantité d'acide lactique produite. Une étude plus récente de Starke et al. (2014) révélait que le Zn en dose pharmacologique (2 425 mg/kg) faisait diminuer les entérobactéries au fur et à mesure que l'âge avançait, mais qu'il n'y avait aucun impact sur les espèces de *Lactobacilles*. Les bifidobactéries, les entérocoques et les streptocoques n'ont pas été influencés par la forte dose de Zn alimentaire de cette étude (Starke et al., 2014).

En résumé, les effets antimicrobiens de ZnO permettraient également d'augmenter la diversité de la flore microbienne intestinale (Katouli et al., 1999; Hojberg et al., 2005) en diminuant la présence des bactéries *E. coli* (Hu et al., 2013), des coliformes et des enterococcidies (Hojberg et al., 2005; Broom et al., 2006; Starke et al., 2013) et en augmentant les lactobacilles (Hojberg et al., 2005; Broom et al., 2006; Starke et al., 2013). Finalement, le niveau élevé de ZnO alimentaire réduirait la translocation bactérienne chez

les porcelets (Huang et al., 1999; Katouli et al., 1999; Hojberg et al., 2005; Broom et al., 2006).

9.5 Réponse immunitaire

Dans des études récentes, les taux d'ARNm de TNF α , IL-6 et d'IFN- γ ont diminué dans le jéjunum de porcelets nourris avec des apports élevés en Zn (2 500 et 2 250 mg/kg respectivement) (Hu et al., 2012a, b; Hu et al., 2013). De plus, les taux d'ARNm de TGF- β et IL-10, deux cytokines anti-inflammatoires, ont été augmentés avec un haut niveau d'oxyde de Zn dans la muqueuse du jéjunum des porcelets sevrés (Hu et al., 2013).

Le Zn pourrait également avoir un impact sur la stimulation de la production de TNF α en utilisant le *Toll like receptor 4* (TLR4), un récepteur essentiel pour la réponse immunitaire en présence de LPS (Hoshino et al., 1999). Les TLR sont des protéines ancrées dans la membrane qui sont exprimées soit à la surface des cellules ou associées à des organites intracellulaires (Magalhaes et al., 2007). Treize différents TLR ont été découverts chez les mammifères jusqu'à présent. Ils activent la voie de signalisation du NF- κ B et stimulent les cellules immunitaires pour produire des cytokines inflammatoires telles qu'IL1 β et IL10 (Foster et Samman, 2012). Les récepteurs TLR sont activés lorsque la présence de bactéries pathogènes devient trop importante, ce qui conduit à une réponse immunitaire innée amplifiée et caractérisée par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires avec l'élimination des agents pathogènes et une diminution de l'épaisseur de la muqueuse intestinale (Moncada et al., 2003).

Le tableau 1.2 de la page suivante résume les effets de l'utilisation de haut niveau de ZnO chez le porcelet sevré.

Tableau 1.2: Sommaire des effets du ZnO chez le porcelet sevré

	Effets	Auteurs
Performance de croissance	↓ de l'incidence des diarrhées ↑ du taux de croissance, du gain de poids et de la prise alimentaire	Hu et al., 2012a,b; Hu et al., 2013; Martin et al., 2013b. Case and Carlson, 2002; Hu et al., 2012a,b; Hu et al., 2013; Martin et al., 2013b.
Absorption du Zn	↑ concentration plasmique en Zn ↑ expression et de l'abondance de protéine MT	Case and Carlson, 2002; Martin et al., 2013b. Martin et al., 2013a
Altérations morphologiques	↓ profondeur des cryptes; ↑ épaisseur de la muqueuse, de la hauteur des villosités et du ratio hauteur de villosité : profondeur des cryptes.	Li et al., 2001; Hu et al., 2012a,b.
Croissance bactérienne	↓ compte de <i>E. coli</i> ↑ microflore intestinale et de la diversité ↑ bactéries lactique et des lactobacilles; ↓ coliformes et enterococcidies ↓ translocation bactérienne vers l'intestin grêle)	Hu et al., 2013 Katouli et al., 1999; Hojberg et al., 2005 Hojberg et al., 2005; Broom et al., 2006; Starke et al., 2013 Huang et al., 1999
Réponse immunitaire	↑ concentration d'IgA intestinale ↓ taux de ARNm de TNF, IL-6 et IFN-γ ↑ dans le jéjunum de TGF-β et IL-10	Broom et al., 2006 Hu et al., 2012a,b; Hu et al., 2013 Hu et al., 2013

10. Zn et Métabolisme du stress oxydatif

Dans des conditions physiologiques normales, l'exposition à des ROS est une conséquence inévitable du métabolisme aérobie (Wisemann et al., 2007). Les ROS sont le résultat de la réduction partielle des molécules d'oxygène, c'est-à-dire que les anions superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), les radicaux hydroxyles ($\bullet OH$) et le peroxyde (H_2O_2), entre autres, sont plus hautement réactifs que l'oxygène moléculaire. Les ROS peuvent être générés à partir de

plusieurs situations physiologiques et représentent environ 2 à 4 % de l'oxygène moléculaire total consommé dans le métabolisme aérobie normal (Rojkind et al., 2002).

Les ROS peuvent aussi agir comme messagers secondaires dans plusieurs voies signalétiques (Jones and Morice, 2000; Reth, 2002; Stone and Collins, 2002) et sur les défenses non spécifiques dans les réponses immunitaires (Gresham et al., 1990; Forman and Torres, 2002). Certains types de cellules ont démontré une capacité de produire du $O_2^{\bullet-}$ et du H_2O_2 en réponse à des stimuli extracellulaires (Rhee et al., 2003). Les concentrations de H_2O_2 dans les tissus et fluides varient largement (Halliwell et al., 2000) et la sensibilité des différentes cellules varie également en fonction de la teneur en fer intracellulaire ou de la présence d'enzymes telles que des catalases et les glutathion peroxydases (Chance et al., 1979).

Le Zn est considéré comme ayant des propriétés antioxydantes car il est entre autres directement impliqué dans la synthèse de MT. Les MT sont caractérisées par une haute concentration en cystéine et en groupements thiol (Formigari et al. 2007). Ces groupements sont connus pour séquestrer les ROS et les RNS (*reactive nitrogen species*) (Fubini and Hubbard, 2003). Les MT agissent donc comme antioxydants en captant les radicaux libres (OH et NO) et en stabilisant la forme oxydée du glutathion (GSSG) (Davis and Cousins, 2000; Formigari et al. 2007). Wang et ses collaborateurs ont démontré que l'ajout de Zn (à raison de 3 000 mg/kg) a conduit à une réduction du glutathion oxydé et du rapport glutathion oxydé/glutathion total dans la muqueuse jéjunale de porcelets sevrés, suggérant l'amélioration du statut antioxydant (Wang et al., 2009).

Le Zn est un cofacteur important des enzymes de la famille des Superoxide Dismutase (SOD) (Fukai and Ushio-Fukai, 2011). Les SOD sont le principal système antioxydant de défense contre les anions superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). Il y a trois formes de SOD chez les mammifères : la Cu/ZnSOD cytoplasmique (SOD1), la MnSOD mitochondrial (SOD2) et la Cu/ZnSOD extracellulaire (SOD3). Les SOD jouent un rôle critique afin de prévenir la formation de peroxynitrite (Fukai and Ushio-Fukai, 2011). L'anion superoxyde est dismuté par la SOD en H_2O_2 qui est par la suite catalysé en H_2O par la catalase ou la glutathion peroxydase (figure 1.1 et 1.2).

Les anions superoxyde $O_2^{\bullet-}$ doivent être captés rapidement car s'ils réagissent avec le NO, ceux-ci formeront un très fort oxydant, le peroxynitrite ($ONOO^-$) (Fang et al., 2002; Guzik and Harrison, 2006) (figure 1.1). Le NO et le $ONOO_2$ oxydent des biomolécules telles que des protéines, des acides aminés, des lipides et de l'ADN, ce qui conduit à une lésion cellulaire et finalement la mort (Fukai and Ushio-Fukai, 2011).

Ainsi, de grandes quantités de NO produites par la *inducible Nitric oxide synthase* (iNOS) peuvent exercer un effet nuisible sur les cellules de mammifères et servir de médiateur pour la pathogenèse de nombreuses maladies, y compris la destruction auto-immune des cellules B pancréatiques pour le diabète de type 1 et les maladies intestinales inflammatoires (figure 1.3) (Flynn et al., 2002).

La forme CuZn-SOD (SOD3) est celle que l'on retrouve le plus dans le plasma (Fukai and Ushio-Fukai 2011). L'équipe de Carlson en 1999 a observé une diminution de l'activité de la CuZn-SOD dans les érythrocytes des porcelets récemment sevrés et supplémentés avec 3 000 mg Zn/kg (Carlson et al, 1999). Ils avaient alors émis l'hypothèse que cette diminution de l'activité était due à une diminution de la disponibilité du Cu dans le plasma, laquelle a pu être causée par l'augmentation en Zn dans la ration. Elle pouvait également être due à une séquestration du Zn dans les tissus intestinaux et hépatiques via l'augmentation de l'expression de MTs (Martinez et al. 2004; 2005). La diminution de l'activité de la CuZn-SOD pourrait aussi être expliquée par l'amélioration du statut antioxydant car il est connu que l'expression de la CuZn-SOD diminue avec la diminution du stress oxydatif (Fukai et Ushio-Kukai, 2011). Toutefois, en situation de stress oxydatif élevé où sa synthèse ne comblerait pas assez son utilisation, il serait également possible d'observer une diminution dans l'activité plasmique de la CuZn-SOD.

11. NO dans le métabolisme du zinc

Le Zn seul est un agent réducteur inerte et n'interagit pas avec NO. La MT-1, une protéine liée à un métal lourd et riche en cystéine (30%), est nécessaire à l'homéostasie

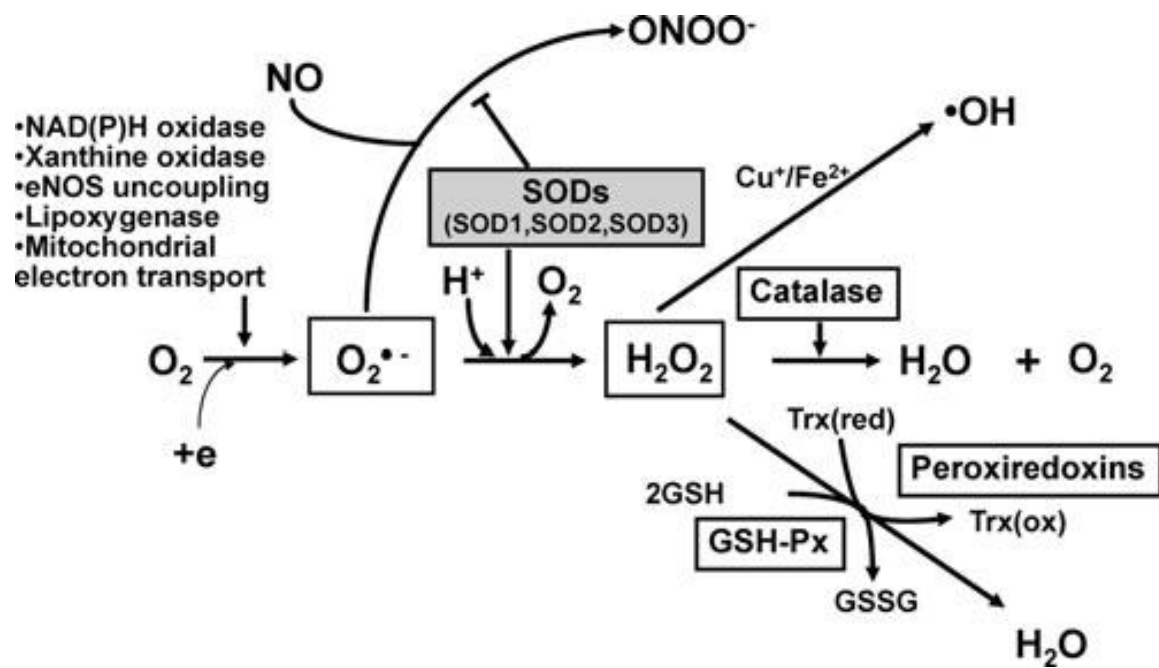


Figure 1.1 : Production et métabolisme des ROS et des RNS
(tiré de Fukai and Ushio-Kukai, 2011)

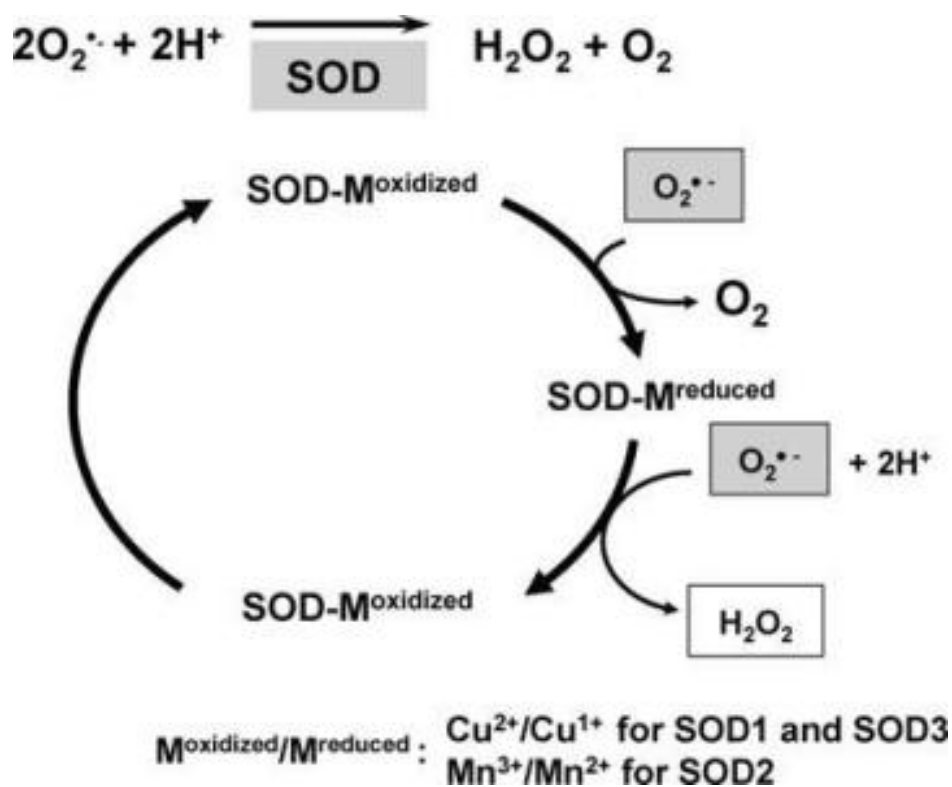


Figure 1.2 : Mécanisme de la SOD
(tirée de Fukai and Ushio-Kukai, 2011).

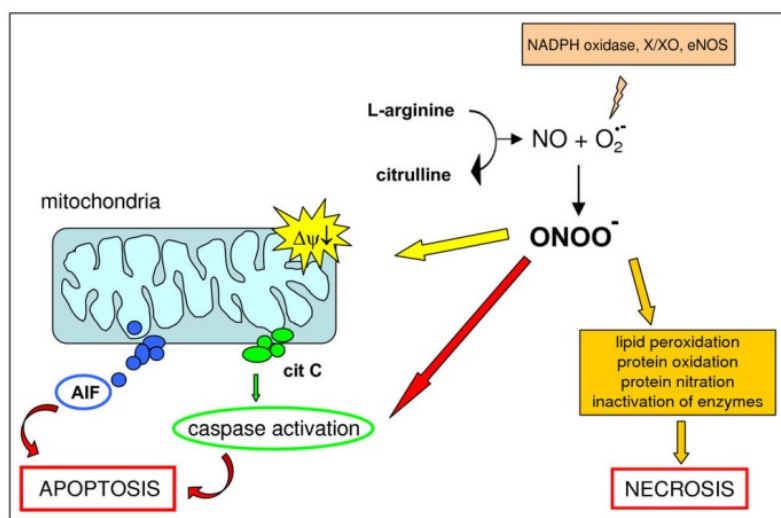


Figure 1.3: Réactions des peroxynitrites menant à l'apoptose ou à la mort cellulaire
(tirée de Novo and Parola, 2008)

intracellulaire du Zn (Zn^{2+}) car chaque molécule de MT-1 peut lier jusqu'à 7 atomes de Zn. Le NO est donc directement impliqué dans le métabolisme du Zn (Wiseman et al. 2006; Li et al. 2010). En fait, NO agit comme libérateur des ions Zn^{2+} liés à MT-1. En libérant les ions Zn^{2+} , la concentration sanguine en Zn augmente, ce qui provoque une augmentation de l'expression de MT-1 dans les cellules endothéliales afin de stocker les ions libérés et d'éviter l'intoxication (Maret and Vallee, 1999).

Le Zn peut de son côté, réguler la production de NO en inhibant l'expression de iNOS (Yamaoka et al., 2000). Chez des rats stimulés au LPS, un traitement avec 150- μM de Zn^{2+} a permis d'inhiber l'activité de iNOS (Abou-Mohamed et al., 1998). Dans certains cas, l'inhibition de iNOS peut être bénéfique pour le traitement de maladies inflammatoires (Kröncke et al., 1998; Bogdan, 2001; Aktan et al., 2003). Le fait d'augmenter la concentration en Zn pour diminuer la production de NO est en accord avec l'activité anti-inflammatoire du Zn et également en accord avec l'effet négatif que peut avoir une carence en Zn sur l'efficacité du système immunitaire.

11.1 Autres implications de NO

Le NO est une importante molécule de signalisation intra et inter cellulaire impliquée dans la régulation de divers mécanismes physiologiques et physiopathologiques dans les systèmes cardiovasculaire, nerveux et immunologique (St-Croix et al., 2002). Le NO a toutefois des rôles contraires dans les organismes vivants. Il agit comme un médiateur biologique similaire à des neurotransmetteurs dans le système neuronal, peut réguler la fermeté des vaisseaux sanguins dans les systèmes vasculaires et est un élément important dans le système immunitaire pour la défense de l'hôte. D'un autre côté, il est un radical libre et peut agir comme un agent cytotoxique dans les processus pathologiques, en particulier dans les troubles inflammatoires (Moncada et Higgs, 1991; Alderton et al., 2001; Bogdan, 2001; Dawn et Bolli, 2002).

La biosynthèse de NO dans l'organisme est faite à partir de L-Arginine (L-Arg) et d'oxygène moléculaire. La réaction globale est constituée d'une conversion en deux étapes

de la L-Arg en NO + L-citrulline (Stuehr et al., 1991; Mayer et Hemmens, 1997; Alderton et al., 2001) par une famille d'enzymes appelée oxyde nitrique synthase (NOS). Jusqu'à maintenant, au moins trois isoformes distinctes de NOS ont été isolées: eNOS (NOS endothéliale, NOS1), iNOS (NOS inductible, NOS2) et nNOS (NOS neuronale, NOS3). La NOS inductible (iNOS) n'est pas présente dans les cellules au repos, mais peut être induite par des cytokines immunostimulantes telles que TNF α , l'IL-1 β , et l'IFN γ ou des produits liés à une infection bactérienne dans un certains nombres de cellules, y compris l'endothélium, les hépatocytes, les monocytes, les mastocytes, les macrophages et les cellules musculaires lisses (Mayer et Hemmens, 1997; Alderton et al., 2001).

L'activité de iNOS dans les macrophages est d'abord régulée et modulée par des récepteurs cellulaires à molécules tels que les récepteurs de type TLR et CD14. Le CD14 est le récepteur pour le lipopolysaccharide (LPS) et joue un rôle essentiel dans les réponses pro-inflammatoires chez les monocytes et les macrophages via l'activation de la voie NF-kB (Schroder et al., 2000). Le CD14 a deux formes distinctes ; mCD14 (*GPI-anchored forme*) et sCD14 (CD14 soluble). Le mCD14 est censé effectuer une simulation directe sur LPS via l'interaction avec les TLR4 (Du et Low, 2001). L'IFN- γ induit iNOS par la voie de signalisation Jak-STAT (Aktan, 2003). La voie de signalisation Jak-STAT activé augmente l'induction de iNOS et la production de NO (Rao, 2000) (voir figure 1.4).

Les facteurs de transcription comme NF-kB (facteur nucléaire kappa B) et AP-1 (protéine d'activation-1) régulent l'expression de l'iNOS et d'autres gènes inductibles tels que la COX-2 (cyclo-oxygénase-2), VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1), ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1) pour les réponses immunitaires et inflammatoires (Xia et al., 2001). Le NF-kB est présent dans le cytosol en tant que complexe inactif I κ B-NF-kB (Xia et al., 2001).

Le complexe I κ B-NF-kB est phosphorylée par I κ B kinase (IKK) à travers l'activation par un stimulateurs comme un inducteur potentiel exogène (p. ex. LPS), des inducteurs endogènes (cytokines, IFN γ et TNF α), ce qui facilite la translocation de NF-kB libre du cytosol vers le noyau et l'induction de l'expression du gène iNOS (Huang et al., 1998;

Marks-Konczalik et al., 1998; Obermeier et al., 1999). Une combinaison cytokines + LPS induit de façon synergétique l'expression de iNOS (Rao, 2000).

Le NO peut réguler sa propre production. Il a des effets bi phasiques sur la synthèse de NO en modulant l'expression d'ARNm de iNOS (Connelly et al., 2001). Le contrôle de la rétroaction positive de l'expression de iNOS dans les cellules mésangiales du rein et les cellules endothéliales des vaisseaux des muscles lisses passe indirectement par l'augmentation des taux d'AMPc intracellulaires via l'inhibition de la PDE III (phosphodiesterase III) (Perez- Sala et al., 2001). Le contrôle de la rétroaction négative de l'expression de iNOS par NO dans les macrophages et les hépatocytes passe par l'inhibition de l'activation de NF-kB. Weissmann (2008) a proposé une illustration pour les voies empruntées par NO pour la vasodilatation et la vasoconstriction (voir figure 1.5).

12. L'arginine dans l'alimentation du porcelet

12.1 Synthèse intestinale d'arginine

Chez le porcelet sevré, l'arginine est considérée comme un acide aminé limitant pour la croissance (Wu et al. 2009). L'arginine est synthétisée à partir de glutamine/glutamate et de proline via l'axe intestin-rein (Wu, 1997; Hu et al., 2008; Marini et al., 2014) (figure 1.6). La glutamine et le glutamate entérique, de même que la glutamine

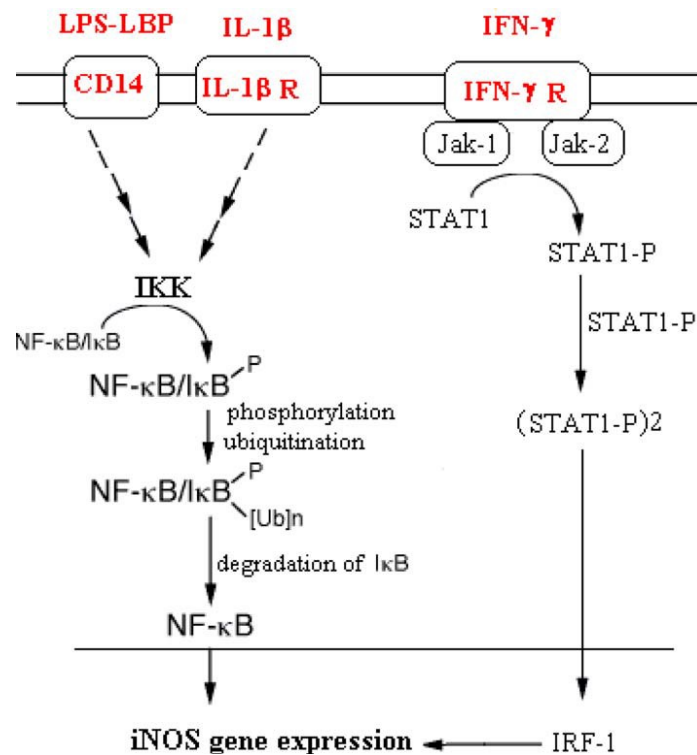


Figure 1.4 : Activation du NFκB et voie de signalisation STAT
(tirée de Aktan, 2003)

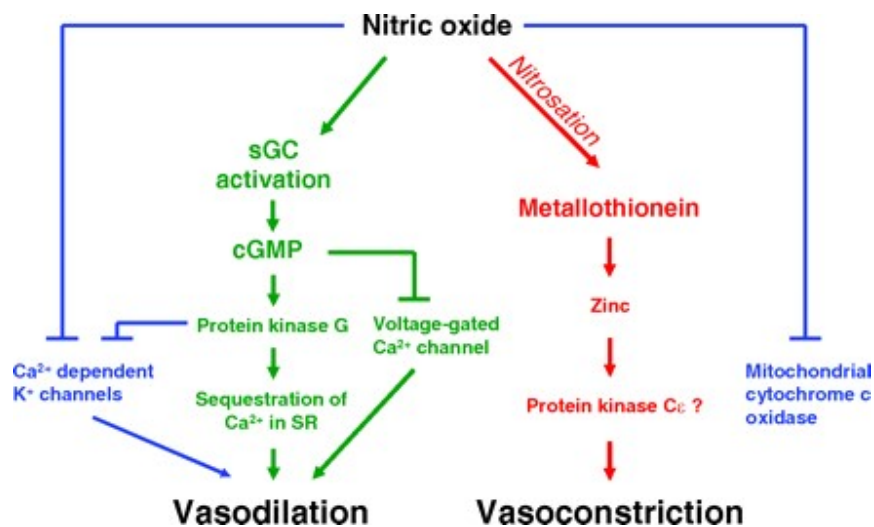


Figure 1.5: Voies empruntées par le NO pour la vasodilatation ou la vasoconstriction
(Tirée de Weissmann, 2008)

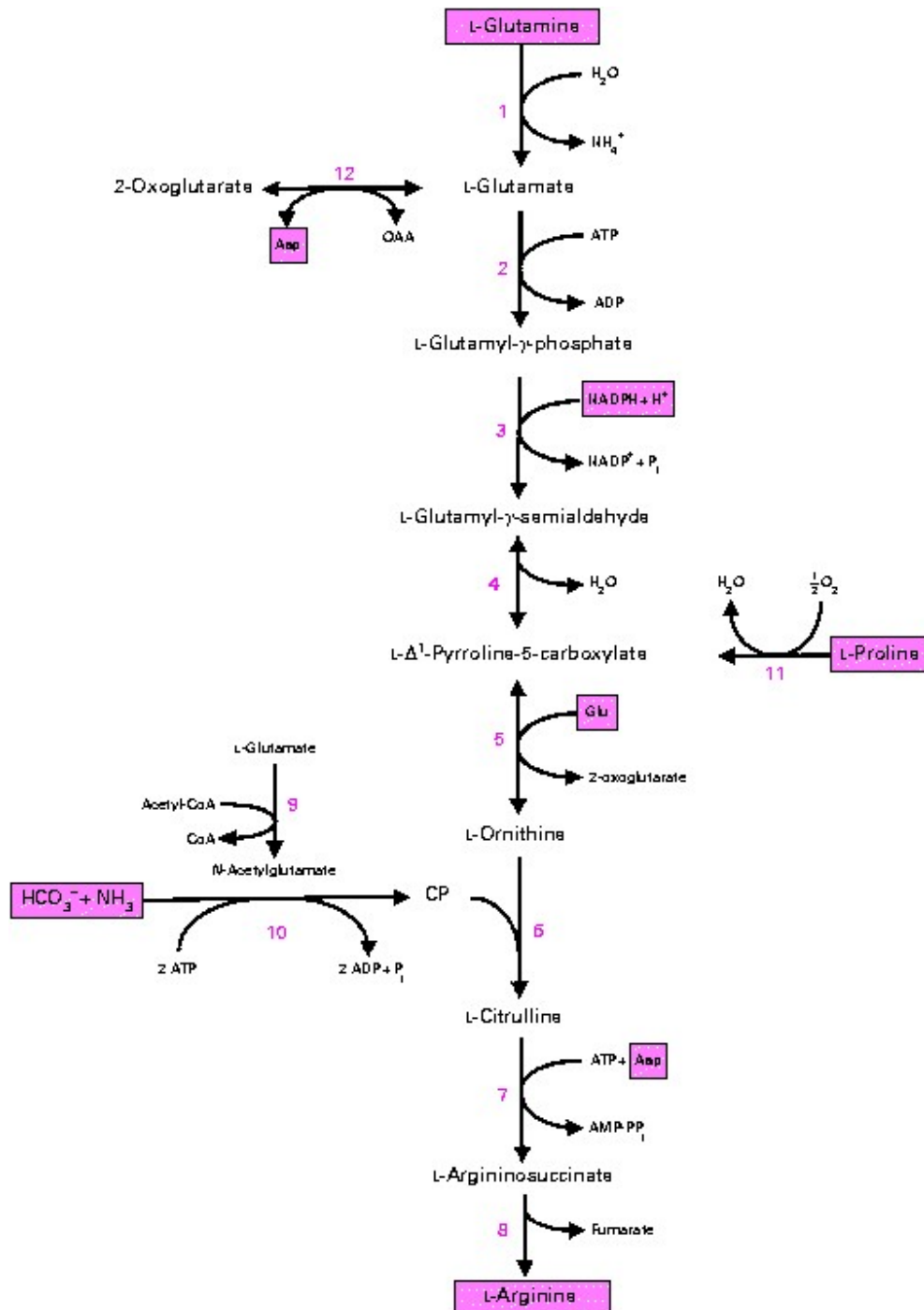


Figure 1.6: Voie de synthèse de l'Arg

(Tirée de Wu et Morris, 1998)

plasmique, sont énormément métabolisés par l'intestin grêle et servent de précurseurs majeurs pour la synthèse intestinale de l'Arg ou de la citrulline (Wu, 1998). L'entérocyte est le type de cellulaire responsable de la synthèse intestinale de l'Arg et de la citrulline à partir de la glutamine et du glutamate (Wu et al., 1994a; Wu and Knabe, 1995). Le porc est la seule espèce dont l'intestin grêle libère de l'Arg, qui est synthétisé par les entérocytes du système veineux (Wu et al., 1994b; Stoll et al., 1998), ce qui résulte en un équilibre entre la synthèse et le catabolisme de l'Arg par la muqueuse intestinale. À la naissance, l'intestin grêle est le site majeur de la synthèse nette de l'Arg (Blachier et al., 1993) mais graduellement, il devient le site majeur de la production nette de citrulline, et l'expression de l'arginase intestinal augmente par le fait même (De Jonge et al., 1998).

12.2 Rôle de l'arginine

L'arginine est un acide aminé essentiel pour le porcelet nouveau-né (Kim and Wu, 2004) chez lequel il stimule la sécrétion d'hormone de croissance, d'insuline (qui agit positivement sur la réponse immunitaire) (Evoy et al., 1998; Flynn et al., 2002), de prolactine et d'IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) (Newsholme et al., 2005). Plusieurs études ont démontré que les apports en Arg provenant d'une alimentation à base de laitet de la synthèse endogène sont inadéquats pour soutenir la croissance maximale d'un porcelet entre les jours 7 à 21 jours (Wu et al. 2004; Frank et al. 2007; Yao et al. 2008).

L'arginine est aussi impliquée dans la synthèse de plusieurs composés métaboliques (Wu et Morris, 1998) (figure 1.7). C'est en 1987 que l'Arg a été découvert comme précurseur pour la synthèse des nitrite/nitrate chez les mammifères (Hibbs et al., 1987) et du NO comme vasodilatateur (Palmer et al., 1987; Ignarro et al., 1987).

12.3 Sevrage et métabolisme de l'arginine

Durant la période entourant le sevrage, le problème d'une faible prise alimentaire des porcelets est amplifié par de fortes concentrations de cortisol (Wu et al., 2000b). Cette hormone de stress induit l'expression de l'arginase dans plusieurs organes (incluant l'intestin grêle) ce qui favoriserait l'hydrolyse de l'Arg (Flynn et al., 1999; Morris, 2002). Le résultat est une carence en Arg, telle qu'indiquée par les niveaux élevés d'ammoniac et les niveaux réduits de l'Arg dans le plasma (Wu et al., 1996).

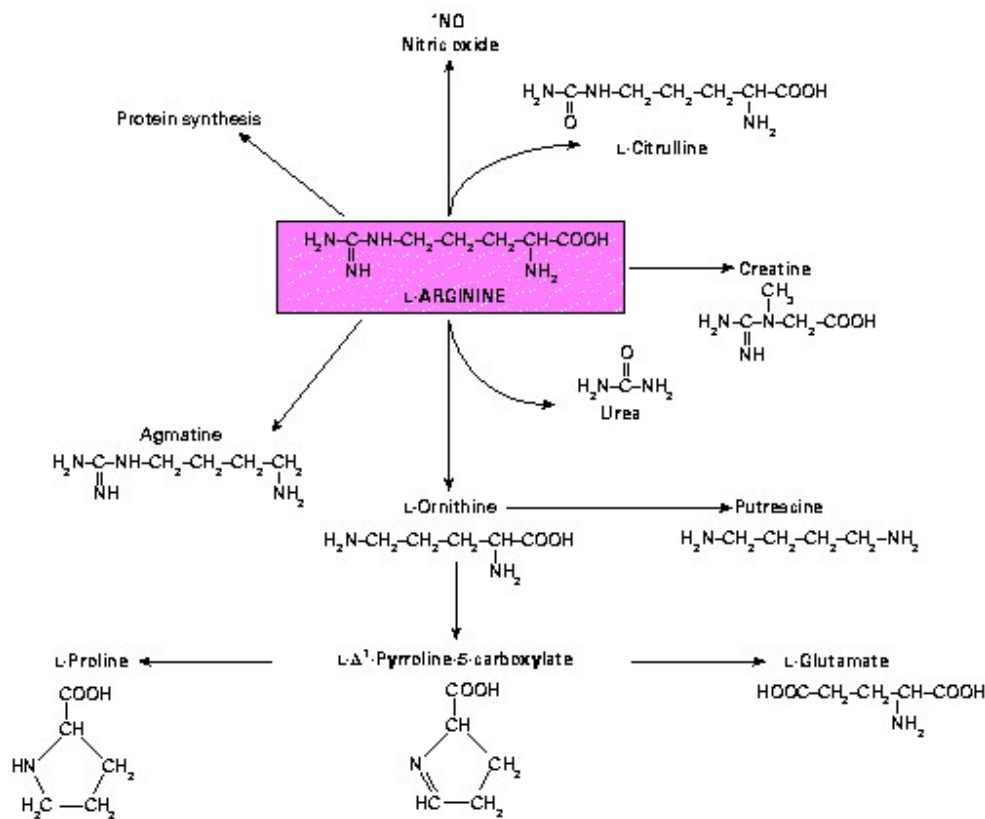


Figure 1.7 : Devenirs métaboliques de l'Arg dans les cellules de mammifères (Tirée de Wu et Morris, 1998)

12.4 L'arginine et l'immunité

L'arginine régule la production d'anticorps par les lymphocytes B, ainsi que l'expression du récepteur des lymphocytes T et le développement des lymphocytes B (De Jonge et al.,

2002). Il joue donc un rôle important dans l'immunité innée et acquise. Les données disponibles montrent que l'Arg est nécessaire, entre autres, chez les mammifères pour la protection contre les virus, les bactéries et les parasites (Li et al., 2007). Un article résumé de Li et son équipe (2007) rapportaient qu'un supplément adéquat en Arg chez le porcelet nouvellement sevré est nécessaire pour la prolifération et le développement des lymphocytes, et que l'ajout à la ration de l'Arg améliore les réponses immunitaires de plusieurs modèles avec des problèmes immunitaires (Li et al., 2007). D'ailleurs, une ration supplémentée avec 1 ou 2 % d'Arg (environ une ou deux fois la teneur en Arg d'une alimentation régulière) entraîne une augmentation du nombre de lymphocytes T et de la cytotoxicité des cellules à action spécifique chez les porcelets (lymphocytes T, les macrophages et les cellules NK) (Li et al., 2007).

Spécifiquement chez le porc, l'ajout de la ration de 1% d'Arg-HCl augmente le statut immunitaire des truies gestantes et des porcelets, réduisant la morbidité et la mortalité à la naissance en réponse à des agents pathogènes infectieux (Li et al. 2007; Han et al. 2009a; Tan et al. 2009).

De l'autre côté, Tan et ses collaborateurs (2009) ont observé qu'un supplément entre 0,2 et 0,8 % d'Arg augmentait le poids relatif de la rate des porcelets. Également, il a été observé qu'avec un supplément de 0,6%, le poids relatif du thymus, qui est le site de différenciation et de sélection des cellules T, avait également augmenté durant la première semaine suivant le sevrage, la période la plus critique pour la survie du porcelet (Dong and Pluske, 2007). Deux équipes ont conclu qu'un supplément d'Arg à la ration alimentaire modifie l'immunité du porcelet sevré précocement en augmentant le poids relatif de la rate à 7 jour d'âge, en réduisant le nombre de globules blancs et de lymphocytes et en augmentant la taille du thymus et le nombre de granulocytes à 14 jours d'âge (Evoy et al. 1998; Tan et al., 2009). L'Arg a également fait augmenter la concentration sérique d'IgM aux jours 7 et 14, et d'IgG, TNF et IL-1 β au jour 14 (Evoy et al. 1998). De plus, un supplément de 0,8% d'Arg a fait diminuer la concentration sérique d'IL-8 aux jours 7 et 14 (Evoy et al. 1998). Finalement, un supplément entre 0,4 à 0,8% d'Arg n'a pas affecté la prise alimentaire mais a amélioré de façon marquée la performance de croissance des jeunes porcelets (Tan et al., 1990; Evoy et al., 1998).

12.5 Rôle de l'arginine dans la synthèse de NO

Comme mentionné dans la section 11.1, l'Arg est important dans les fonctions métaboliques car elle est le précurseur de NO (figure 1.8). Un apport en Arg insuffisant dans la ration alimentaire compromet la synthèse de NO à la fois par iNOS et eNOS chez les mammifères (Wu et Meininger, 2002), ce qui indique qu'il est important d'avoir un apport adéquat en Arg pour la fonction immunitaire. Comme l'arginase et iNOS sont en concurrence pour leur substrat commun, l'Arg, la modulation de l'expression et de l'activité de l'arginase joue un rôle essentiel dans la production de NO par les leucocytes (Kepka-Lenhart et al., 2000).

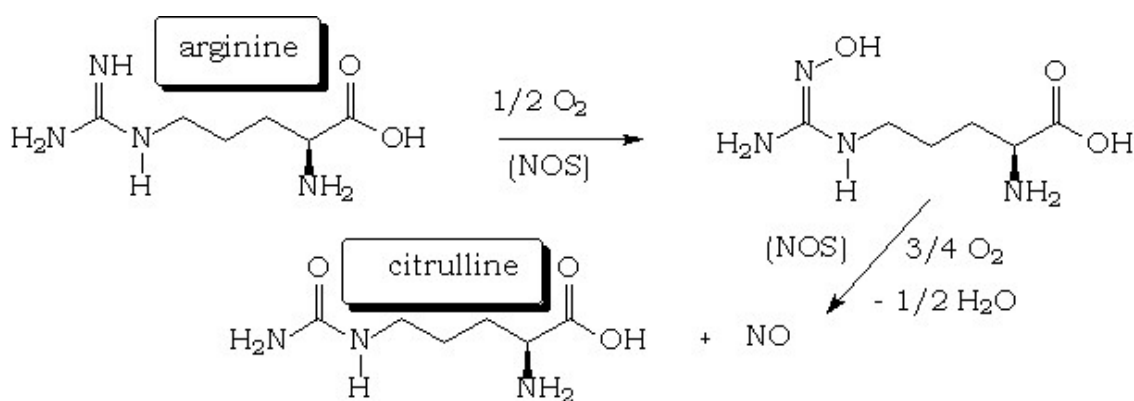


Figure 1.8 : « Synthèse de NO »

par The original uploader was Jengi sur Wikipedia français — Transféré de fr.wikipedia à Commons par Bloody-libu utilisant CommonsHelper.. Sous licence CC BY-SA 3.0 via Wikimedia Commons - http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Synthese_NO.png#/media/File:Synthese_NO.png »

13. Utilisation du LPS

Pour simuler une inflammation en conditions expérimentales, les équipes de recherche ont souvent recours à l'injection de LPS car elle est une méthode reconnue et efficace. Le LPS est en fait le composé majeur de la membrane externe des bactéries Gram-négative telle qu'*E coli*. Ces LPS membranaires de la bactérie protègent contre l'action des sels biliaries

et des antibiotiques lipophiles (Mayer et al., 1985) et sont des endotoxines stables à la chaleur qui sont reconnues depuis longtemps comme un facteur clé dans le choc septique (septicémie) chez les humains (Rietschel et al., 1994; Schletter et al., 1995). Le LPS possède trois sections distinctes (figure 1.9). La première section est hydrophobique, constituée essentiellement de lipides et appelée *Lipid A* (Galanos et al, 1985). Elle est responsable des propriétés toxiques de la molécule et a été identifié comme critique pour l'activité de l'endotoxine du LPS (Galanos et al, 1985). La deuxième et la troisième section sont hydrophiles et sont faites de chaînes de polysaccharides (Rietschel et al., 1994). Toutefois, la troisième section possède une unité appelée *O-antigen*, c'est la partie active de la molécule (Rietschel et al., 1994). Elle se répète entre 4 à 40 fois et ce nombre varie selon la spécificité du sérotype bactérien (Rietschel et al., 1994). Cette unité agit comme un récepteur d'antigène.

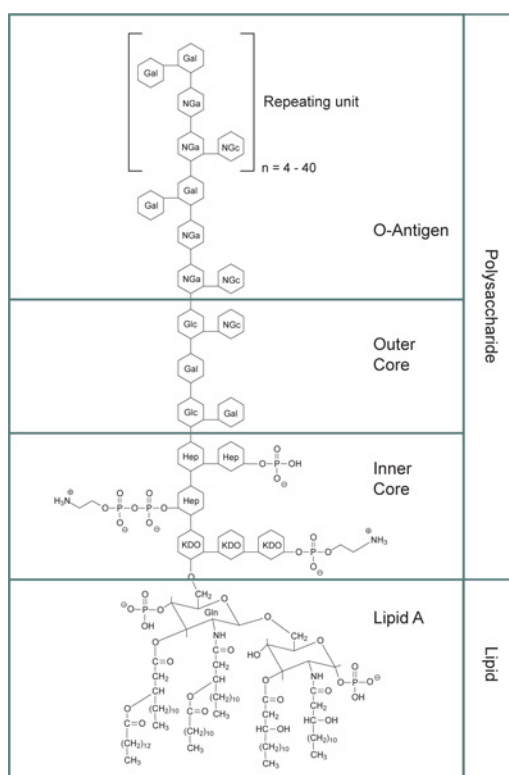


Figure 1.9 : Structure d'un Lipopolysaccharide
(Tirée de Sigma-Aldrich <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/glycobiology/lipopolysaccharides.html>)

Lorsqu'il est activé, il favorise la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α et l'IL-1 β (Palsson-McDermott et al, 2004).

13.1 Utilisation du LPS chez le porc

Dans le cas de ce présent projet, nous avons également utilisé le LPS afin de simuler une condition d'infection ou de challenge immunitaire et oxydatif. Dans la littérature, différentes concentrations de LPS, différents sites d'injection, différentes races de porcs et de différents âges ont été utilisés pour rapporter les effets du LPS chez le porc (Wyns et al., 2015). Le tableau 1.3 fait un résumé d'articles pertinents sur le sujet. Plusieurs modèles ont été utilisés dans ce projet afin de reproduire des contextes d'étude différents mais voici les deux principaux (Webel et al., 1997; Rakhshandeh and de Lange. 2012).

Lors du premier essai, le modèle de Webel (Webel et al., 1997) a été retenu pour l'utilisation du LPS afin de simuler une condition aiguë d'inflammation et de stress oxydatif. Ce modèle a fait ses preuves et a été utilisé dans plusieurs autres essais. Webel et son équipe (1997) avait utilisé des porcs d'environ 11,5 kg. Trois doses de LPS provenant de *E. coli* K-235 avaient été testées : 0, 0,5 et 5 μ g/kg. L'injection s'a été faite par voie intrapéritonéale, dans la région basse de l'abdomen et les prises de sang à 0, 2, 4, 8, 12 et 24 h après l'injection. La dose de 0,5 μ g/kg n'a eu aucun impact mais la dose de 5 μ g/kg a fait augmenter le TNF α (2 h après l'injection), le cortisol et IL-6 (4 h après l'injection) et l'azote urique (entre 8 et 12 h après l'injection).

Le second essai nécessitait une inflammation chronique. Le modèle retenu a été celui de Rakhshandeh and De Lange (2012). Leurs essais ont démontré que l'injection répétée de LPS dans le temps permettait d'imiter une stimulation du système immunitaire suite à l'ingestion de mycotoxines, soit une inflammation chronique de l'intestin.

14. Résumé des éléments et hypothèses de recherche

Le sevrage est une période critique dans la vie d'un porcelet, caractérisé par des changements dans la morphologie et la fonction de la muqueuse intestinale. Il implique

normalement une réduction progressive de la consommation de lait et une augmentation de la prise d'aliment solide. Dans des conditions naturelles, le sevrage commence à environ 10 jours d'âge jusqu'à quatre ou cinq mois (Jensen et Recén, 1989; Jensen et Stangel, 1992). La séparation de la mère et les changements dans l'alimentation ainsi que de l'environnement physique et social représentent des événements traumatisants (Wijtten et al., 2011; Heo et al., 2013). Le sevrage abrupt et le changement de forme d'alimentation (du lait à une ration solide à base de céréales) augmente l'inflammation systémique et intestinale. Dans le tissu intestinal, cette inflammation est caractérisée par une surexpression de cytokines pro-inflammatoires comme le facteur $\text{TNF}\alpha$ ou l' $\text{IL-1}\beta$ (McCracken et al., 1999; Pié et al., 2004). L'haptoglobine, une protéine de la réaction inflammatoire, augmente également dans le sérum après le sevrage des porcelets (Petersen et al., 2004; Sauerwein et al., 2005).

Tableau 1.3: Résumé d'essais d'inflammation in vivo avec du LPS d'*E. coli* chez le porc

Équipe	LPS				Mesures	Résultats
	Source	Âge ou poids	Site d'injection	Dose (µg/kg)		
Webel et al. (1997)	<i>E. coli</i> K-235	11,5kg	I.P.	0, 0,5 et 5	Prises de sang à 0, 2, 4, 8, 12 et 24 h post injection	À 5 µg/kg : augmenter le TNF (2 h post injection), du cortisol et IL-6 (4 h post injection) et azote urique (8 - 12 h post injection)
Rakhshandeh and De Lange (2012)	<i>E. coli</i> 0.55 :B5	24,76 ± 0,40 kg	I.M.	60 +12%/48 h	Prises de sang 1/jour	- Diminution de la CMQ - Augmentation de IL-1β
Myers et al. (2003)	<i>E. coli</i> O55 :B5	3 à 4 mois (25 à 35 kg)	I.V.	2	Prises de sang à 0, 1, 3, 6, 9 et 24 h post injection	- Maximum pour TNF et IL10 1 h post injection - Maximum de IL-6 3 h post injection - Maximum de NOx 24 h post injection
Dritz et al. (1996)	<i>E. coli</i> 0.55 :B5	14 jours (4 kg)	I.M.	150	Injections au jour 5, 8, 11 et 14 après le sevrage	- Diminution du GMQ et de la CMQ mais pas de la CA - Augmentation de la concentration en Haptoglobine
Wright et al. (2000)	<i>E. coli</i> 055:B5	porcelet récemment sevrés	I.P.	100	Prises de sang à 2, 4, 6, 8 h, ensuite aux 4h jusqu'à 72h post injection	- Élévation maximale du cortisol 2 h post injection - Maximum pour TNF entre 2 et 4 h post injection - Suppression de IGF-1 2 h post injection - Maximum de PGE2 à 2 h post injection
Frank et al. (2005)	LPS 0111:B4 L2630	21,3kg, mâles et femelles	I.M.	0, 25 et 50	Prises de sang à 0 et 48 h post injection, CMQ	Diminution de la CMQ
Han et al. (2014)	<i>E. coli</i> 055 :B5	28 jours d'âge pesant environ 7,25 kg	I.P.	100	CMQ, GMQ, Prise de sang 3 h post injection	- Augmentation de IL-1β, IL-6 et TNF - Diminution du GMQ et CMQ (entre jour 1 et 21 post sevrage)
Li et al. (2012a)	<i>E. coli</i> 055 :B5	porcelet récemment sevrés	I.P.	100	LPS+0,5% L-Arg, Prise de sang 4 h post injection, échantillons de foie	Augmentation du MDA et SOD dans le foie 4 h post injection
Poeze et al. (2011)	<i>E. coli</i> 055 :B5	20-25 kg	I.V.	3	L-Arg perfusée (5,3 umol/kg) 12 h avant l'injection du LPS et pour pendant les 24 h suivantes	Augmentation du flux sanguin de la veine portale lors d'une septicémie, permet une meilleure oxygénation du foie
Sætre (2001)		15-24 kg	I.V.	1,7	Prises de sang 1x/h pendant 6 h	Diminution du flux sanguin au foie de 40%

Ces augmentations de la sécrétion de facteurs inflammatoires pourraient être associées à la dégradation de la muqueuse digestive et une diminution de la capacité digestive (McCracken et al., 1999; Pié et al., 2004). Des équipes de recherche ont également noté l'augmentation des concentrations plasmatiques de GSH et des ROS ainsi qu'une diminution de la concentration plasmatique de composés antioxydants (vitamine C, α -tocophérol, γ -tocophérol, sélénium) chez les porcelets sevrés, ce qui suggère la mobilisation de ces métabolites en réponse au stress oxydatif systémique (Sauerwein et al., 2005; Robert et al., 2009). D'autres équipes ont observé une dysfonction du système antioxydant de la muqueuse intestinale et un stress oxydatif accru dans le tissu jéjunale chez les porcelets sevrés (Wang et al., 2008; Zhu et al., 2012).

Le Zn est un cofacteur essentiel pour le fonctionnement d'environ 300 enzymes connues (Prasad, 1998), y compris la CuZn-superoxyde-dismutase (CuZn-SOD), qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde O_2^- en du H_2O_2 , et est stimulée au cours de périodes de stress oxydatif (Fukai et Ushio-Fukai, 2011). Chez le porcelet sevré, les doses pharmacologiques d'oxyde de Zn sont reconnues pour améliorer la croissance (Hahn et Baker, 1993; Hoque et Binder, 2006; Yin et al., 2008; Sales, 2013) et diminuer la diarrhée (Roy et al., 1992; Carlson et al., 1999; Feng et al., 2006; Hu et al., 2012a, b). Ajouter dans l'alimentation à raison de 2 000-3 000 mg de Zn/kg, l'oxyde de Zn augmente les niveaux d'ARNm de la MT-1 et l'expression des protéines de la famille MT dans les muqueuses intestinales et le plasma chez des porcelets sevrés (Martinez et al., 2004, 2005). La MT-1 est une sulfo-protéine contenant du Zn qui est impliquée dans l'homéostasie du Zn et qui a une fonction antioxydante très importante (Formigari et al., 2007). Wang et al. (2009) ont démontré que l'ajout de Zn (à raison de 3000 mg/kg) a conduit à une réduction du glutathion oxydé et du rapport glutathion oxydé/glutathion total dans la muqueuse jéjunale de porcelets sevrés, suggérant l'amélioration du statut antioxydant. La supplémentation en Zn peut également réduire le niveau d'inflammation dans la muqueuse intestinale des porcelets sevrés (Sargeant et al., 2010; Hu et al., 2012a, b).

Chez les porcelets non sevrés, l'Arg est considérée comme un acide aminé limitant la croissance (Wu et al., 2009). Chez le porcelet sevré, l'ajout d'Arg (0,5-1%) à l'aliment permet d'améliorer la croissance et l'efficacité alimentaire (Tan et al., 2009; Wu et al., 2010; Yao et al., 2011). L'Arg est connue comme un précurseur essentiel de la synthèse

de NO (Alderton et al., 2001), un médiateur clé dans de nombreuses fonctions physiologiques. Une augmentation de la production et de la concentration en NO est connue pour causer une libération de Zn provenant de protéines MT-1 et pour augmenter l'expression de MT-1 dans les cellules endothéliales (Wiseman et al., 2006; Li et al., 2010). Il a été suggéré que la supplémentation en Arg diminue l'inflammation de l'intestin chez les porcelets sevrés (Liu et al., 2008) et améliore le statut antioxydant dans le tissu hépatique en réponse à une stimulation au LPS (Li et al., 2012a).

Puisque le métabolisme de l'Arg peut interagir avec le métabolisme du Zn, les deux suppléments peuvent agir en synergie sur le statut antioxydant et la réponse inflammatoire chez les porcelets sevrés. Bien que d'autres fonctions de MT-1 puissent être impliquées, nous croyons que la séquestration du Zn^{2+} libre intracellulaire peut représenter une cible thérapeutique potentielle pour l'atténuation du stress oxydatif aigu lié au sevrage précoce des porcelets.

L'hypothèse générale de ce projet est que les suppléments de Zn et Arg permettraient d'améliorer le statut antioxydant et de réduire l'inflammation systémique et intestinale des porcelets sevrés soumis à un challenge de LPS ou encore à des conditions d'élevage commercial.

Les objectifs spécifiques du chapitre 3 étaient de déterminer l'effet d'une supplémentation en Zn et en Arg sur le statut antioxydant et la réponse inflammatoire chez les porcelets sevrés, soumis à un challenge aigu d'inflammation suite à l'administration péritonéale de LPS.

Les objectifs spécifiques du chapitre 4 étaient de déterminer l'effet d'une supplémentation en Zn et en Arg sur le statut antioxydant et la réponse inflammatoire chez les porcelets sevrés soumis à un challenge chronique d'inflammation suite à l'administration musculaire de LPS.

L'objectif du chapitre 5 était de déterminer l'impact de l'Arg et du Zn sur le statut antioxydant et la réponse inflammatoire chez les porcelets sevrés élevés dans des installations commerciales de production

CHAPITRE 2 - ANTIOXIDANT STATUS AND INFLAMMATORY RESPONSE IN WEANLING PIGLETS FED DIETS SUPPLEMENTED WITH ARGININE AND ZINC

Nadia Bergeron, Claude Robert, and Frédéric Guay

Department of Animal Science, Université Laval, Québec, Québec, Canada G1V 0A6.

Canadian Journal of Animal Science, 2014 (94): 87-97.

Key words: Antioxidant, inflammation, zinc, arginine, piglet, weaning

1. Résumé

Les suppléments de ZnO et Arg sont reconnus pour améliorer la croissance des porcelets sevrés. Le mécanisme d'action n'est pas encore bien compris, mais des effets sur les statuts antioxydant et inflammatoire pourraient être en cause. Cette étude avait pour but d'évaluer les effets de suppléments en Zn et en Arg sur le statut antioxydant et la réponse inflammatoire de porcelets sevrés. Trente-deux porcelets sevrés de 20 jours ont été nourris pendant 12 jours avec des rations supplémentées ou non de Zn (2 500 mg oxyde de Zn/kg) et d'Arg (1 %), et désignés ZN0ARG0, ZN2500ARG0, ZN0ARG1 et ZN2500ARG1. Au jour 12, des prélèvements sanguins ont été effectués avant et 3 heures après une injection intrapéritonéale de lipopolysaccharide (LPS; 10 mg/kg). Les porcelets ont été euthanasiés immédiatement après le deuxième prélèvement sanguin et des échantillons de muqueuses ont été prélevés du jéjunum et de l'iléon pour détermination de l'expression d'ARNm et l'évaluation de la morphologie intestinale. Le supplément en Zn a réduit le malondialdéhyde plasmatique mesuré avant l'injection de LPS ($P < 0,05$). La supplémentation à l'Arg a augmenté le pouvoir de réduction des ions ferriques du plasma (un indicateur de l'état antioxydant) mesuré après l'injection de LPS ($P < 0,05$). Les porcelets nourris d'une ration supplémentée en Zn avaient une moins grande activité superoxyde dismutase (SOD) plasmatique totale ($P < 0,05$), mais un plus haut taux de facteur de nécrose tumorale α (TNF α) ($P < 0,05$) plasmatique après l'injection de LPS. La ration supplémentée au Zn augmentait l'expression de la métallothionéine-1 et la capacité antioxydante totale dans l'iléon et le jéjunum ($P < 0,05$) et réduisait l'expression de l'interleukine-10 ($P < 0,05$) dans l'iléon. Dans le jéjunum, la supplémentation combinée au Zn et à l'Arg a augmenté la hauteur des villosités (Arg x Zn, $P < 0,05$). Ces résultats indiquent que le Zn peut réduire l'oxydation systémique et améliorer le statut antioxydant dans les muqueuses du jéjunum et de l'iléon. Par contre, la supplémentation en Zn et en Arg semble avoir un effet synergique limité pour améliorer l'état antioxydant ou réduire l'inflammation chez les porcelets sevrés.

2. Abstract

Dietary supplementation with ZnO and Arg is known to improve growth in weanling piglets. The mechanism of action is not yet well understood, although antioxidant effects and inflammatory responses may be involved. This experiment was conducted to evaluate the effects of Zn and Arg supplementation on the antioxidant status and inflammatory response of piglets. Thirty-two 20-day-old weanling piglets were placed for 12 days on diets supplemented or not with Zn (2,500 mg Zn oxide kg⁻¹) and Arg (1%), designated ZN0ARG0, ZN2500ARG0, ZN0ARG1 and ZN2500ARG1. On day 12, blood samples were taken before and 3h after intra-peritoneal injection of lipopolysaccharide (LPS; 10 µg/kg). The piglets were euthanized just after the second blood sample, and samples of mucosae were taken from the jejunum and ileum for determination of mRNA expression and morphological observation. Zn supplementation decreased plasma malondialdehyde measured before LPS injection ($P < 0.05$). Arg supplementation increased the ferric-reducing ability of plasma (indicator of antioxidant status) measured after LPS injection ($P < 0.05$). Piglets fed Zn supplemented diets had lower total plasma superoxide-dismutase (SOD) activity ($P < 0.05$) but higher plasma tumour necrosis factor- α ($P < 0.05$) after LPS injection. Zn-supplemented diets increased metallothionein-1 expression and total antioxidant capacity in the ileum and jejunum ($P < 0.05$) and decreased interleukin-10 expression ($P < 0.05$) in the ileum. In the jejunum, the combination of Zn and Arg supplementation increased villus height (Arg x Zn, $P < 0.05$). These results indicate that Zn may reduce systemic oxidation and improve the antioxidant status in the jejunal and ileal mucosae. However, Zn and Arg supplementation did not appear to act synergistically to enhance antioxidant status or reduce inflammation in weanling piglets.

3. Introduction

Weaning is a critical period in the life of a piglet, characterized by changes in morphology and intestinal mucosal function. Separation from the mother and the sudden change in diet as well as physical and social environment represent traumatic events (Wijtten et al. 2011; Heo et al. 2012). Immune system activation and high levels of mucosal expression of tumor necrosis factor- α (TNF) and interleukin-1 β have been reported in weanling piglets and could be associated with digestive mucosae degradation and decreased digestive capacity (McCracken et al. 1999; Pié et al. 2004). Sauerwein et al. (2005) and Robert et al. (2009) also noted increased plasma concentrations of oxidized glutathione, haptoglobin and reactive oxygen species, and decreased plasma concentration of antioxidant compounds (vitamin C, α -tocopherol, γ -tocopherol, selenium) in weanling piglets, suggesting mobilization of these metabolites in response to systemic oxidative stress. Wang et al. (2008) and Zhu et al. (2012) observed dysfunction of the intestinal antioxidant system and increased oxidative stress in the jejunal tissue in weanling piglets.

Zinc is an essential cofactor for the function of about 300 known enzymes (Prasad 1998), including CuZn-superoxide-dismutase (SOD), which catalyzes the dismutation of superoxide anion $^{\bullet}\text{O}_2^-$ to H_2O_2 , and is stimulated during periods of oxidative stress (Fukai and Ushio-Fukai 2011). Pharmacological doses of Zn oxide are recognized to improve growth (reviewed by Sales 2013) and to decrease diarrhoea (Carlson et al. 1999; Hu et al. 2012) in weanling piglets. Provided in feed at 2,000–3,000 mg Zn kg^{-1} , Zn oxide increases metallothionein-1 (MT1) mRNA and protein expression levels in intestinal mucosae and in plasma in weanling piglets (Martinez et al. 2004; 2005). MT1 is a Zn-containing sulpho-protein involved in Zn homeostasis and has a significant antioxidant function (Formigari et al. 2007). Wang et al. (2009) showed that dietary Zn supplementation (3,000 mg kg^{-1}) led to a reduction of oxidized glutathione and oxidized/total glutathione ratio in the jejunal mucosa of weanling piglets, suggesting improved antioxidant status. Zinc supplement may also reduce the level of inflammation in the intestinal mucosae of weanling piglets (Sargeant et al. 2010; Hu et al. 2012).

In suckling piglets, Arg is considered as a growth-limiting amino acid (Wu et al. 2009). Arg supplementation (0.5–1%) has been shown to improve growth and feed efficiency in weanling piglets (Wu et al. 2010; Yao et al. 2011). Arg is known as an essential precursor for NO synthesis (Alderton et al. 2001), a key mediator in several physiological functions. Increased production and concentration of NO is known to cause Zn release from MT1 protein and to increase MT1 expression in endothelial cells (Wiseman et al. 2006; Li et al. 2010). It has been suggested that Arg supplementation decreases intestinal inflammation in weanling piglets (Liu et al. 2008) and improves antioxidant status in the liver tissue in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge (Li et al. 2012).

Since Arg metabolism may interact with Zn metabolism, both supplements may act in synergy on the antioxidant status and inflammatory response in weanling piglets. The hypothesis of this project was that Zn and Arg supplements would improve the antioxidant status and reduce the systemic and intestinal inflammation of weanling piglets. The objective of the present study was to determine the effect of Zn and Arg dietary supplementations on antioxidant status and inflammatory response in weanling piglets challenged with inflammation by LPS administration.

4. Materials and methods

4.1 Animals and housing

Thirty-six 20-day-old (± 1 day) castrated piglets (Yorkshire x Landrace, Coopérative Fédérée, Qc, Canada) were moved from the farrowing room of commercial farm to a controlled environment room for a period of 12 days. The piglets were kept in individual pens (1 m x 2 m) equipped with a feeder and watering nipple. The temperature was set at 32°C for their arrival, decreased until day 7 to 26°C and maintained at this temperature on a 12h/12h light/dark photoperiod until the end of the experiment. All animal procedures were conducted according to the guidelines set by the Canadian Council on Animal Care (2009).

4.2 Experimental design and diets

Four diets (Table 2.1) were formulated to meet or exceed recommendations suggested by the NRC (1998) for piglets. Dietary treatments were begun just after weaning. The

Table 2.1: Composition of experimental diets (as-fed basis)

	ZN0-ARG0	ZN2500-ARG0	ZN0ARG1	ZN2500-ARG1
Ingredients (% of total diet)				
Ground corn	31.5	31.5	31.5	31.5
Soybean meal	22.5	22.5	22.5	22.5
Whey powder	20.0	20.0	20.0	20.0
Hamlet Protein 300	9.5	9.5	9.5	9.5
Choice fat	5.0	5.0	5.0	5.0
Spray-dried animal plasma	3.5	3.5	3.5	3.5
Blood meal	2.5	2.5	2.5	2.5
Limestone	1.1	1.1	1.1	1.1
Di-calcium phosphate	1.0	1.0	1.0	1.0
Salt	0.3	0.3	0.3	0.3
Vitamins ^z	0.25	0.25	0.25	0.25
Minerals ^y	0.25	0.25	0.25	0.25
Lysine HCL	0.25	0.25	0.25	0.25
DL-methionine	0.15	0.15	0.15	0.15
L-threonine	0.10	0.10	0.10	0.10
Corn starch	0.40	---	1.1	0.70
Zinc oxide	---	0.40	---	0.40
L-arginine-HCl	---	---	1.00	1.00
L-alanine	1.70	1.70	---	---
<i>Analyzed nutrient composition</i>				
Gross energy, kcal kg ⁻¹	4,463	4,474	4464	4,467
CP, %	25.18	24.49	24.77	24.81
Calcium, %	0.78	0.78	0.73	0.77
Phosphorus, %	0.58	0.61	0.53	0.57
Zinc, mg kg ⁻¹	134	2,224	123	2,342
Total lysine, %	1.69	1.65	1.67	1.67
Total arginine, %	1.52	1.49	2.30	2.31
<i>Calculated nutrient composition ^x</i>				
Digestible lysine, %	1.52	1.52	1.52	1.52
Digestible arginine, %	1.37	1.37	2.17	2.17

^zProvided per kilogram of diet: vitamin A palmitate 5,000 IU; vitamin D₃ 1,000 IU; vitamin E acetate

22.5 IU; menadione sodium bisulphite 3.75 mg; thiamine HCl 1.0 mg; riboflavin 4.5 mg; niacin 20.0 mg; calcium pantothenate 25.0 mg; pyridoxine HCl 1.5 mg; biotin 0.2 mg ; choline bitartrate 375 mg ; vitamin B₁₂ 25.0 µg

^yProvided per kilogram of diet: Zn (as zinc carbonate) 100 mg; Fe (as ferric citrate) 100 mg; Cu (as cupric carbonate) 25 mg; I (as potassium iodate) 0.28 mg; Mn (as manganous carbonate) 46 mg; Se (as sodium selenite) 0.30 mg.

^xValues for nutritional composition were calculated according to Sauvant et al. (2004)

diets were designated as follows: **ZN0ARG0** or control (n = 9), **ZN2500ARG0** (containing 2,500 mg Zn kg⁻¹; n = 8), **ZN0ARG1** (containing 1% Arg; n = 8) and **ZN2500ARG1** (containing 2,500 mg Zn kg⁻¹ and 1% Arg; n = 7). Piglets were distributed according to their initial body weight (BW) among the four treatments in a randomized complete block design, initially with nine piglets per treatment. Two piglets from the ZN2500ARG1 group, one from the ZN2500 group and one from the ARG1 group were excluded from the experiment because of poor feed intake (< 100 g 7 day⁻¹) and health status after 7 days on the diet and were euthanized as recommended by the veterinarian. They were not included in the statistical analysis. Feed was provided daily in three equal installments for the 12-day period. Feeding level was at 100 g d⁻¹ on day 0 and was adjusted daily by increasing the previous day's intake by 20%. Piglets had *ad libitum* access to water. They were weighed on day 0 and before euthanasia on day 12.

4.3 Challenge with lipopolysaccharide

Lipopolysaccharide (*Escherichia coli* LPS, K-235 Sigma Aldrich, St-Louis, MO, USA) was administered by intra-peritoneal injection (10 µg kg⁻¹ BW) as a model of gut inflammation (Mercer et al. 1996) and acute oxidative stress (Webel et al. 1997). Blood samples were collected by jugular venipuncture into two tubes (containing EDTA and heparin) on day 1 (baseline level) and day 12, just before and 3 h after LPS injection. The time for sampling after LPS injection and the doses used were chosen on the basis of the maximal peak obtained for the concentrations of several indicators of inflammation such as tumour necrosis factor-α (TNF), interleukin 6 (IL6), and cortisol (Webel et al. 1997). All samples were placed on ice and then centrifuged at 2000 *x g* for 15 min at 4°C. Plasma was stored at -80°C for further analysis.

4.4 Tissue collection

Shortly after obtaining the post-LPS blood sample on day 12, piglets were first sedated with intramuscular injection of Romifidine (Sedivet, Boehringer Ingelheim, Ontario, Canada) and Acepromazine (Atravet, Boehringer Ingelheim) at doses of 0.08 mg kg⁻¹ and 0.1 mg kg⁻¹ respectively. After sedation, the piglets were euthanized with an intravenous injection of pentobarbital (Euthanyl, Vétoquinol Canada Inc., Lavaltrie, Québec, Canada) at a dose of 120 mg kg⁻¹. The entire intestine was removed and freed from the mesentery. The segment ending 50 cm caudal from the pyloric antrum was

considered duodenum, the segment ending 50 cm cranial from the cecum was considered ileum, and the segment in between was considered jejunum (Yen 2001). For jejunum and ileum, 5 cm from the middle portion was removed for histological analysis, and the adjacent 20 cm was used for biochemical analyses and determination of mRNA expression levels of MT1, TNF, interleukin-12B (IL12B), interleukin-10 (IL10), inducible nitric oxide synthase (NOS2) and transforming growth factor- β_2 (TGFB2). The jejunal and ileal 20 cm segments were rinsed with ice-cold saline solution (0.9% NaCl), opened lengthwise and blotted dry. The mucosae was scraped from the underlying tissue using a glass slide, immediately transferred into liquid nitrogen, and then stored at -80°C until analysis.

4.5 *Biochemical analysis*

Malondialdehyde (MDA) generation in samples of plasma, jejunum and ileum was measured according to the method of Jain et al. (1989) as an index of lipid peroxidation and oxidative status (Michel et al. 2008). Phosphate-buffered saline (800 μ L, pH 7.4) and butylated hydroxytoluene solution (25 μ L, 0.88%) were added to 200 μ L of plasma and mixed thoroughly. Trichloroacetic acid (500 μ L, 30%) was added and the samples were placed on ice for 2 h. After 15 min of centrifugation at 2000 $\times$ g, 1 mL of supernatant was mixed with 75 μ L of 0.1M EDTA and 250 μ L of 1% thiobarbituric acid in 0.05 N NaOH. The samples were then placed in boiling water (100°C) for 15 min, followed by cooling to room temperature. Absorbance was measured at 532 nm. Intra- and inter-assay CV values were 6.0 and 5.5%, respectively. For samples of jejunum and ileum, 0.5 g of tissue was homogenized directly (Ultra-Turrax T18, IKA-Labortechnik, Stenfer, Germany) with 5 mL of ice-cold PBS pH 7.4 and then centrifuged at 2000 $\times$ g for 15 min. The supernatant (100 μ L) was used for the assay as previously described for plasma. Intra- and inter-assay CV values were 7.0 and 6.0%, respectively.

Prostaglandin E2 metabolite (PGE2) concentrations were determined in plasma using an immunoassay kit (# 514531.1, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA) with intra- and inter-assay CV values of 3.1 and 6.3%, respectively. Plasma sample (50 μ L) was used to compare with a standard curve using PGE2 standard after extraction on a SPE column according to the manufacturer's instructions. The TNF concentrations were determined in plasma using an ELISA kit (# KSC3012/KSC3011, Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) with intra- and inter-assay CV values of 6.0 and 7.2%,

respectively. Plasma sample (50 μ L) was used to compare with a standard curve using porcine TNF standards. The ferric-reducing ability of plasma (FRAP) was assayed according to the method described by Benzie and Strain (1996) with intra- and inter CV values of 1.5 and 3.0%, respectively. FRAP assay measures the concentration of antioxidants including vitamin C, vitamin E, uric acid and protein thiol groups (Benzie and Strain 1996). Ten μ L of plasma was used for the assay, which was calibrated with $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ to establish a standard curve.

Plasma superoxide dismutase (SOD) activity was determined using Fluka Analytical kit 19160 (Sigma-Aldrich Chemicals GmbH, Bushs, Switzerland). The plasma total SOD activity (20 μ L) was compared with a standard curve using the Cu-Zn SOD enzyme from bovine erythrocytes (Sigma Aldrich, Oakville, Ontario, Canada). Intra- and inter-assay CV values were 3.2 and 4.0%, respectively.

Total antioxidant capacity (TAC) of the jejunal and ileal mucosae was assayed according to the method of Erel (2004) and Maurice et al. (2007) with intra- and inter-CV values of 2.5 and 3.0%, respectively. TAC assay measures the concentration of antioxidants including vitamin C, vitamin E, glutathione, polyphenol compounds and protein thiol groups (Erel 2004). Tissue (0.5 g) was homogenized (Ultra-Turrax T18, IKA-Labortechnik) in 5 mL of ice-cold PBS pH 7.4 and centrifuged at 2000 x g for 15 min. The supernatant (80 μ L) was used as described for the plasma assay. The sample concentration was compared with a standard curve using the Trolox standard equivalent.

The plasma nitrite + nitrate (NO_x) concentration was assayed using fluorometric kit 780051 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA). The plasma sample volume was 20 μ L and a standard curve of nitrate was used to determine concentration. Intra- and inter-assay CV values were 2.5 and 3.5%, respectively.

4.6 Analysis of *MT1*, *TGFB2*, *TNF*, *IL10*, *IL12B* and *NOS2* mRNA expression

Total RNA was extracted from 170 mg of tissue homogenized (Ultra-Turrax T18, IKA-Labortechnik) in 1 mL of TRIzol reagent (Invitrogene, Ontario, Canada). RNA extracts were purified on RNeasy Mini Spin Columns including the RNase-free DNase step (Qiagen, Ontario, Canada) and quantified with a Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies). RNA quality of every sample was analyzed on the Agilent 2100

Bioanalyzer with the Agilent RNA 6000 Nano Assay Protocol (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Samples with a RNA integrity number (RIN) over 6.5 were kept for further analysis. Samples with a RIN under 6.5 were re-extracted.

RT procedure was performed with the Sensiscript® reverse transcription kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Before RT reaction, RNA was denatured (secondary structures disrupted) using the following procedure: 72°C for 2 min then placed immediately on ice until the addition of the enzyme; this procedure increases primer annealing, which in turn increases RT reaction output. After this procedure, two micrograms of denatured RNA were mixed with random decamer solution (10 µM, Ambion), held for five minutes at 65°C and then placed on ice. Four units of Sensiscript reverse transcriptase (Qiagen) in of 1X RT buffer with 0.5 mM dNTP and 10U RNase inhibitor (Promega) were added and the reaction mixture was held for 10 minutes at 25°C to allow priming of the random decamers, followed by one hour at 37°C.

The resulting cDNA (2 µL) was then amplified on the Roche LightCycler by real-time PCR in buffer containing 0.25 mM of each primer, 3 mM MgCl₂ in 1X SYBR green, dNTPs and FastStart Taq DNA polymerase enzyme (Roche) in total volume of 20 µL. Primer sequences are shown in Table 2.2. The PCR conditions used for all genes were as follows: denaturing cycle of 10 minutes at 95°C, 45 PCR cycles (denaturing at 95°C for 5 seconds; 5 seconds at the annealing temperature in Table 2.2; extension at 72°C for 20 seconds), followed by a melting cycle. DNA was quantified using LightCycler Software Version 3.5 and comparison with the standard curve.

The standard curve consisted of five dilutions of purified amplicon (diluted from 0.1 pg to 0.1 fg). Quantitative PCR was performed using a LightCycler apparatus with SYBR green incorporation (Roche Diagnostics, Laval, Qc, Canada). Amplicon specificity was confirmed by analysis of the melting curve given by the Lightcycler software. Amplicons were then separated by electrophoresis on 1% agarose gel and sequenced to confirm that the proper sequence was amplified. Expression of mRNA was normalized using the geometric means of three housekeeping genes (ACTB, GAPDH and RPL4) and GeNorm version 3.5. These housekeeping genes are usually used (Nygard et al. 2007) for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR.

Table 2.2 : Primers used for measurement of gene expression level by quantitative PCR

Gene Description	Gene Symbol	Primer sequences	qPCR efficiency (%)	Amplicon size (bp)	Annealing Temperature (°C)	Fluorescence acquisition temp. (°C)	GeneCards identifiers
Actin, beta	ACTB	Up 5' -CACGCCATCCTGCGTCTGGA- 3' Low 5' -AGCACCGTGTGGCGTAGAG- 3'	93	452	58.7	72	GC07M005566
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	Up 5' -ACACTCACTCTTCTACCTTTG- 3' Low 5' -CAAATTCATTGTCGTACCAG- 3'	95	90	49.3	81	GC12P006643
Ribosomal protein L4	RPL4	Up 5' -CAAGAGTAACTACAACCTTC- 3' Low 5' -GAACTCTACGATGAATCTTC- 3'	94	635	60.0	72	GC15M066790
Metallothionein	MT1	Up 5'-TTGCTCTCTGCTTGGTCTCACCT-3' Low 5'-GGGATGTAGCATGAAGTCAGTGCATGTG-3'	98	378	60.3	72	NM 001001266
Tumour necrosis factor- α	TNF	Up 5' -GCCCCAGTTGTAGCCAATGTCAAA- 3' Low 5' -TTGTCTTTTACGCTTCACGCCGTTG- 3'	99	98	58.0	72	GC06P031543
Interleukin-10	IL10	Up 5' -TCTCTGCTGGAGGACTTTAAGGGT- 3' Low 5' -GCTTGCTAAAGGCACTCTTCACCT- 3'	92	241	59.0	72	GC01M206940
Interleukin-12B	IL12B	Up 5' -ACATCATCAAACCAGACCCTCCCA- 3' Low 5' -TTGGCATCCTTGTGGCATGTAACC- 3'	95	223	59.0	72	GC05M158741
Transforming growth factor β 2	TGFB2	Up 5' -CACCAAGAACCTGCTTTCGGCTTT- 3' Low 5' -TTTGTCTCCTACCATGAACACCCTC- 3'	94	198	60.0	72	GC01P218519
Nitric oxide synthase 2, inducible	NOS2	Up 5' -TCCAGAAGCAGAACGTGACCATCA- 3' Low 5' -GAGCACGGCTTTGACCAAGACTTT- 3'	93	293	58.0	72	GC17M026083

4.7 *Feed analysis*

Feed samples were finely ground using a sample mill (Cyloctec 1093, Foss Tecator, Sweden). Energy analysis in feed were done with a calorimetric bomb (Parr Instruments Co., Moline, IL, USA). Nitrogen was determined in feed samples by the combustion method using the Leco Nitrogen Determinator (model TruSpec v1.10, Leco, MI, USA). The minerals analysis (P, Ca, and Zn) in feeds were done according to AOAC (2005) (procedures 985.01). Samples were then analysed with an ICP-OES (Optima 430DV, Perkin Elmer, MA, USA). Lysine and Arg were determined by HPLC (Water HPLC system, Water Corporation, MA, USA) as described by Guay et al. (2006).

4.8 *Histological analysis*

Jejunal and ileal samples embedded in paraffin, sliced to 6- μ m thickness and stained with eosin and hematoxylin were examined at 33X magnification using a microscope (Nikon Eclipse E2000, Nikon Instruments Inc., Melville, N.Y., USA) provided with an ocular micrometer. An observer unaware of the treatment regimens measured villus height and crypt depth, which were reported as the mean of 10 properly oriented and representative villi and crypts per piglet (Houle et al. 1997).

4.9 *Statistical analysis*

Data were analyzed using the MIXED procedure of SAS (SAS inst. Inc. Cary, NC) according to a 2 x 2 factorial arrangement in a randomized complete block design (initial body mass) with Zn and Arg supplementation as the two main independent variables. Each individual piglet was considered as an experimental unit. Treatment means and interactions were calculated for growth parameters (i.e. average daily weight gain [ADG], average daily feed intake [ADFI], and growth-to-feed ratio [G:F]), blood parameters (i.e. MDA concentration, FRAP, TAC, SOD activity, PGE2, TNF and NOx concentrations), jejunal and ileal morphology (i.e. crypt depth and villus height), mucosal mRNA expression (TGFB2, TNF, IL10, IL12B and NOS2 expression) and mucosal antioxidant and oxidative status (MDA, NOx and TAC concentration). The model was: $Y_{ij} = \mu + B_i + F_j + (B_i + F_j) + e_{ij}$, where Y_{ij} = dependent variable, B_i = Zn factor, F_j = Arg factor and e_{ij} = residual error.

Differences between means were considered significant at $P < 0.05$. For parameters measured in plasma, the baseline value (at day 1) was added as a covariate in the statistical model.

5. Results

5.1 *Growth performance*

The initial and final weights of piglets were not affected by dietary supplements of Zn and Arg (Table 2.3). The Zn and Arg supplements had no significant impact on ADFI, ADG, or G:F ratio. There was no interaction between the two factors in terms of growth performance.

5.2 *Plasma antioxidant status and inflammatory response*

The piglets fed Zn-supplemented diets had reduced plasma MDA concentration before LPS injection ($P < 0.001$, Table 2.4) compared to those fed the ZN0 diet. Neither Arg nor Zn, nor the combined supplementation had any effect on FRAP or on SOD activity measured before LPS injection. Zinc supplementation had no effect on MDA or FRAP measured after LPS injection, while Arg supplementation increased FRAP ($P < 0.03$). Total SOD activity measured after LPS injection was reduced in piglets fed Zn-supplemented diets compared to those fed the ZN0 diet ($P < 0.03$).

As shown in Table 2.5, the Zn supplement produced a higher plasma TNF concentration after LPS injection ($P < 0.02$). Finally, neither Zn nor Arg supplementation, nor the combination had any significant impact on PGE2 or NOx concentration in plasma, either before or after LPS challenge.

5.3 *Antioxidant and oxidative status in the jejunal and ileal mucosae*

Neither the MDA concentration nor the NOx concentration measured in the mucosae of the jejunum and ileum was affected significantly by the dietary supplements (Table 2.6). The TAC concentration was increased in the case of piglets fed Zn-supplemented diets ($P < 0.001$) compared to those fed the ZN0 diet.

Table 2.3: Growth performance of piglets weanling on diets supplemented or not with Zn and Arg					
Treatment ^z	Initial BW (kg)	Final BW (kg)	ADG (g d ⁻¹)	ADFI (g d ⁻¹)	G:F
ZN0-ARG0	6.19	9.93	313.0	333.7	0.933
ZN2500-ARG0	6.55	9.96	285.9	320.2	0.892
ZN0-ARG1	6.75	10.56	323.9	330.5	0.993
ZN2500-ARG1	6.22	9.99	313.1	338.5	0.924
SEM	0.54	0.50	13.2	12.7	0.027
Zn	NS	NS	NS	NS	NS
Arg	NS	NS	NS	NS	NS
ZnXArg	NS	NS	NS	NS	NS

^z ZN2500-ARG1: control diet + 2500 mg of Zn (ZnO) + 1% Arg (n = 7); ZN2500-ARG0: control diet + 2500 mg of Zn (ZnO) (n = 8); ZN0-ARG1: control diet + 1% Arg (n = 8); ZN0-ARG0: control diet (n = 9)

Table 2.4: Plasma malondialdehyde (MDA) concentration, ferric-reducing ability (FRAP) and superoxide-dismutase (SOD) activity before and after LPS injection in weanling piglets fed diets supplemented or not with Zn and Arg

Treatment ^z	MDA ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		FRAP ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		SOD (U mL^{-1})	
	Before LPS	After LPS	Before LPS	After LPS	Before LPS	After LPS
ZN0-ARG0	4.453	3.675	167.01	188.04	3.024	2.695
ZN2500-ARG0	2.989	3.657	187.17	179.91	3.247	2.489
ZN0-ARG1	4.600	4.212	171.72	202.96	3.045	3.820
ZN2500-ARG1	3.379	4.048	178.73	271.03	2.304	1.853
SEM	0.388	0.426	20.55	23.64	0.645	0.521
Zn	0.001	NS	NS	NS	NS	0.028
Arg	NS	NS	NS	0.034	NS	NS
ZnXArg	NS	NS	NS	NS	NS	NS

^z ZN2500-ARG1: control diet + 2500 mg of Zn (ZnO) + 1% Arg (n = 7); ZN2500-ARG0: control diet + 2500 mg of Zn (ZnO) (n = 8); ZN0-ARG1: control diet + 1% Arg (n = 8); ZN0-ARG0: control diet (n = 9)

Table 2.5: Prostaglandin E₂ metabolite (PGE₂), Tumour necrosis factor- α (TNF) and nitrite/nitrates (NO_x) in plasma of weanling piglets fed diets supplemented or not with Zn and Arg

Treatments ^z	PGE ₂ (pg ml ⁻¹)		TNF (pg ml ⁻¹)		NO _x (pmole ml ⁻¹)	
	Before LPS	After LPS	Before LPS	After LPS	Before LPS	After LPS
ZN0-ARG0	86.0	629.4	291.0	2058.9	203.5	166.4
ZN2500-ARG0	70.8	601.7	498.4	11249.0	218.6	138.5
ZN0-ARG1	58.5	757.0	706.1	5165.5	78.6	227.0
ZN2500-ARG1	73.4	1575.2	466.1	9060.3	121.5	228.4
SEM	16.3	321.2	157.9	2732.1	86.3	132.1
Zn	NS	NS	NS	0.020	NS	NS
Arg	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ZnXArg	NS	NS	NS	NS	NS	NS

^z ZN2500-ARG1: control diet + 2500 mg of Zn (ZnO) + 1% Arg (n = 7); ZN2500-ARG0: control diet + 2500 mg of Zn (ZnO) (n = 8); ZN0-ARG1: control diet + 1% Arg (n = 8); ZN0-ARG0: control diet (n = 9)

Table 2.6: Malondialdehyde (MDA) concentration, total antioxidant capacity (TAC), and nitrate/nitrite (NOx) concentration in the jejunal and ileal mucosae of weanling piglets fed diets supplemented or not with Zn and Arg

Treatment ^z	MDA ($\mu\text{mol g}^{-1}$)		TAC (mmol g^{-1})		NOx ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	
	Jejunum	Ileum	Jejunum	Ileum	Jejunum	Ileum
ZN0-ARG0	133.8	143.5	1.30	1.86	1.05	1.00
ZN2500-ARG0	159.7	151.8	4.09	5.14	1.17	1.10
ZN0ARG1	147.8	144.2	1.37	1.03	2.05	1.73
ZN2500-ARG1	121.0	165.8	6.30	6.54	1.13	1.12
SEM	18.9	7.5	0.83	0.70	0.83	0.65
Zn	NS	NS	0.001	0.001	NS	NS
Arg	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ZnXArg	NS	NS	NS	NS	NS	NS

^z ZN2500-ARG1: control diet + 2500 mg of Zn (ZnO) + 1% Arg (n = 7); ZN2500-ARG0: control diet + 2500 mg of Zn (ZnO) (n = 8); ZN0-ARG1: control diet + 1% Arg (n = 8); ZN0-ARG0: control diet (n = 9)

5.4 *Jejunal and ileal morphology*

The villus height in the jejunum was increased significantly when the Zn and Arg supplementations were combined (Zn X Arg interaction, $P < 0.05$, Table 2.7) compared to the three other treatments. Crypt depth in the jejunum and ileum was not affected by the supplements.

5.5 *Expression of MT1, TGFB2, TNF, IL10, IL12B and NOS2 mRNA*

Expression of MT1 mRNA was increased significantly ($P < 0.001$) in piglets fed Zn-supplemented diets (Table 2.8) compared to those fed the ZN0 diet. In the jejunum and ileum, MT1 expression was respectively 32 and 26 times higher in these cases. Zn and Arg supplementation did not have any significant impact on the expression of TNF, IL12B, and NOS2 expression. However, piglets fed Zn-supplemented diets had higher IL10 expression in the ileum ($P < 0.04$) than those fed the ZN0 diet.

6. Discussion

We investigated the synergic effect of Zn and Arg dietary supplements on antioxidant status and on systemic, jejunal and ileal inflammation induced in weanling piglets by LPS injection. The LPS injection did not increase MDA or NOx concentrations or modify SOD activity or FRAP value in plasma, suggesting that the oxidative stress induced in this model of inflammation was limited. Li et al. (2012) noted increased MDA and SOD activity in the liver of weanling piglets 4 hours after LPS injection. However, the dose of LPS used was 10 times higher (100 µg/kg) than what we used. In addition, Myers et al. (2003) showed that injecting 2 µg/kg LPS led to an increase in plasma NOx, but only 24 h after the injection. In our experiment, three hours might have been insufficient to observe a significant increase in systemic reactive oxygen species production and lipid oxidation, although maximal concentrations of inflammatory factors (TNF, PGE, IL1) have been obtained in pigs within three hours (Webel et al. 1997; Myers et al. 2003). We nevertheless observed increased plasma concentrations of TNF and PGE2 three hours after LPS injection.

We observed that dietary Zn supplementation reduced the plasma MDA concentration measured before LPS injection and increased the TAC value in the jejunal and ileal mucosae after LPS injection. Weaning is well known to decrease antioxidant status and

Table 2.7: Crypt depth and villus height in jejunal and ileal mucosa of weanling piglets fed diets supplemented or not with Zn and Arg

Treatment ^z	Crypt depth (μm)		Villus height (μm)	
	Jejunum	Ileum	Jejunum	Ileum
ZN0-ARG0	410.8	459.6	653.0	594.7
ZN2500-ARG0	433.0	439.7	615.3	618.9
ZN0-ARG1	446.0	453.6	627.3	671.8
ZN2500-ARG1	405.4	459.5	706.4	641.3
SEM	26.9	29.0	30.1	40.6
Zn	NS	NS	NS	NS
Arg	NS	NS	NS	NS
ZnXArg	NS	NS	0.046	NS

^z ZN2500-ARG1: control diet + 2500 mg of Zn (ZnO) + 1% Arg (n = 7); ZN2500-ARG0: control diet + 2500 mg of Zn (ZnO) (n = 8); ZN0-ARG1: control diet + 1% Arg (n = 8); ZN0-ARG0: control diet (n = 9)

Table 2.8: The mRNA expression of tumour necrosis factor- α , interleukin-10 (IL10), IL12B, transforming growth factor- β 2 (TGFB2), metallothionein-1 (MT1), and inducible-nitric oxide synthase (NOS2) in jejunal and ileal mucosae of weanling piglets fed diets supplemented or not with Zn and Arg (Arbitrary unit)^{y,z}

Treatments ^x	TNF		IL10		IL12B		TGFB2		NOS2		MT1	
	Jejunum	Ileum	Jejunum	Ileum	Jejunum	Ileum	Jejunum	Ileum	Jejunum	Ileum	Jejunum	Ileum
ZN0-ARG0	0.411	0.0055	0.0009	0.0010	0.00041	0.00029	0.0101	0.0239	0.0506	0.0147	0.370	0.182
ZN2500-ARG0	0.472	0.0051	0.0016	0.0026	0.00057	0.0013	0.0237	0.0399	0.0398	0.0225	27.628	7.409
ZN0-ARG1	0.401	0.0050	0.0011	0.0023	0.00035	0.00081	0.0209	0.0382	0.0291	0.0114	1.104	0.414
ZN2500-ARG1	0.405	0.0046	0.0012	0.0041	0.00036	0.00086	0.0252	0.0640	0.0441	0.0123	20.716	7.974
SEM	0.046	0.0005	0.0003	0.0008	0.00013	0.00037	0.0045	0.0125	0.0159	0.0078	5.628	1.742
Zn	NS	NS	NS	0.036	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.001	0.001
Arg	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ZnXArg	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

^zThe mRNA expression level was measured by Q-PCR

^y Expression of mRNA was normalized using the geometric means of three housekeeping genes (ACTB, GAPDH and RPL4) and GeNorm version 3.5.

^x ZN2500-ARG1: control diet + 2500 mg of Zn (ZnO) + 1% Arg (n = 7); ZN2500-ARG0: control diet + 2500 mg of Zn (ZnO) (n = 8); ZN0-ARG1: control diet + 1% Arg (n = 8); ZN0-ARG0: control diet (n = 9)

increase oxidative stress in plasma and in the jejunal mucosae, as described by Wang et al. (2008), Robert et al. (2009) and Zhu et al. (2012). Wang et al. (2009) observed that a Zn-supplemented diet (3,000 mg kg⁻¹) decreased oxidized glutathione in the jejunal mucosa of weanling piglets, suggesting reduced oxidative stress.

Zn supplementation (2,000-3,000 mg kg⁻¹) is known to increase MT1 mRNA and protein expression in the liver and duodenal and jejunal mucosae of weaned piglets (Martinez et al. 2004; 2005). In our study, Zn supplementation increased both MT expression and TAC in the jejunal and ileal mucosae. MT proteins are characterized by high contents of cysteine and thiol groups. These thiol groups are known to sequester reactive oxygen and nitrogen species, suggesting an antioxidant role for MT proteins (Formigari et al. 2007).

Unlike FRAP and MDA values, total plasma SOD activity in piglets fed Zn-supplemented diets was decreased after injection of LPS. It should be noted that CuZn-SOD is the major form in plasma (Fukai and Ushio-Fukai 2011). Carlson et al. (1999) observed a decrease in CuZn-SOD activity in red blood cells of weanling pigs on a Zn-supplemented diet (3,000 mg Zn kg⁻¹). They suggested that this was due to a decrease in Cu availability, which can result from high levels of dietary Zn. It could also be due to sequestration in intestinal and hepatic tissues via increased expression of MTs (Martinez et al. 2004; 2005). This decrease in total plasma SOD activity could also be explained by improved antioxidant status. It is known that CuZn-SOD expression decreases with decreasing oxidative stress and improving antioxidant status (Fukai and Ushio-Kukai, 2011). However, we observed no effect of the Zn supplement on plasma MDA and FRAP value measured after injection of LPS.

In the present study, Arg supplementation produced increased FRAP values measured in plasma after LPS injection. In a recent study, Zheng et al. (2012) observed that a similar supplement (0.8% Arg) increased the TAC value measured in the plasma and liver of weanling piglets after injecting diquat to induce oxidative stress. Ma et al. (2010) noted higher TAC values in serum and skeletal muscle in finishing pigs fed diets supplemented with 0.5 and 1.0% Arg. It should be noted that the estimated TAC is well correlated with FRAP in plasma (Erel 2004). The antioxidant roles of Arg can be explained by two mechanisms. Arg is a precursor for the synthesis of NO, which can act as a scavenger of O₂⁻, an important source of reactive oxygen species (Dasgupta et al.

2006). However, we observed no effect of the dietary Arg supplement on either NO_x or MDA concentrations in plasma, before or after LPS injection, or in jejunal or ileal mucosae. Arg also provides protection against reactive oxygen species by direct chemical interaction with O₂⁻, thereby improving antioxidant status (Lass et al. 2002).

The increased plasma TNF concentration measured after LPS injection in piglets fed Zn-supplemented diets is not consistent with the expected anti-inflammatory effect. However, our results agree with those of Yu et al. (2000) in a study of piglets, and with those obtained by Driessen et al. (1995) using human lymphocytes, while Namkung et al. (2006) observed that the Zn-enriched diet had no effect as measured under conditions similar to those of our experiment. In another study of swine, intravenous injection of Zn (5.0 mg kg⁻¹) 2 h before LPS injection (1 µg kg⁻¹) increased the TNF concentration measured 2–3 h after the challenge (Krones et al. 2004). By direct binding, Zn may make LPS more efficient as an inducer of cytokine production (Wellinghauser et al. 1996). Zinc may also influence TNF stimulation via the TLR4 receptor, which is required for an immune response to LPS (Hoshino et al. 1999).

Unlike the TNF concentration in plasma, expression of TNF, IL12B and TGFB2 in the jejunal and ileal mucosae of the piglets was not altered by dietary Zn supplementation. In the case of TNF, these results are in contrast with those of Hu et al. (2012), who observed decreased TNF mRNA expression in the jejunal mucosae of piglets fed Zn-supplemented diets (2,250 mg kg⁻¹) for 7 days post-weaning. However, these authors noted no such effect after an additional week of feeding. It is possible that the effects of Zn supplementation on the pro-inflammatory cytokines subside during the second week after weaning. We nevertheless observed that Zn supplementation increased mRNA expression of IL10, a known anti-inflammatory factor (Kubo and Motomura 2012), in the mucosae of the ileum. Although a direct effect of Zn on IL10 is possible (Shankar et al. 1998), we cannot exclude an indirect effect due to a change in the jejunal and ileal microbial flora. It has been demonstrated that high doses Zn oxide (2,000–3,000 mg kg⁻¹) favour the proliferation of *Lactobacillus spp* in the flora of weanling pigs (Slade et al. 2011). It is known that *Lactobacillus spp* promote the expression of IL10 in the colonic mucosa, resulting in a reduction of the index of inflammation in colitic mice (Peña et al. 2005).

The absence of any effect of Arg supplementation on the expression of TNF in the mucosae of the jejunum and the ileum is in contrast with the findings of Liu et al. (2008), who showed that mucosal TNF expression was reduced in the jejunum 6 h after LPS challenge of piglets fed diets supplemented with 0.5% or 1.0% Arg. However, mucosal TNF expression in the ileum was reduced in the case of the 0.5% but not the 1.0% supplement. It is not clear why Arg would be effective only at the lower concentration, but in our experiment, the 1.0% dietary supplement was indeed ineffective as a suppressor of TNF expression (and other pro-inflammatory factors) in both segments of the intestine.

A significant reduction of villus height and brush border enzyme activity has been shown to occur during the post-weaning period in piglets (Wijtten et al. 2011). Our results showed that the combination of Zn and Arg supplements increased villus height in the jejunum, while neither supplement alone had any effect on the morphology of the mucosae of the ileum or the jejunum, in contrast to previously published results. Using 2,250–2,500 mg Zn kg⁻¹, Li et al. (2006) and Hu et al. (2012) both observed increased villus height in piglets fed Zn-supplemented diets. This improved intestinal structure was associated with increased mRNA and protein expression of the tight junction protein in the jejunal mucosa, and with reduced intestinal permeability (Hu et al. 2012). Liu et al. (2008) and Yao et al. (2011) showed that a diet containing a 1% Arg supplement increased villus height in the duodenal, jejunal and ileal mucosae of LPS-challenged weanling piglets. Zhan et al. (2008) suggested that the positive effect of Arg on the intestinal morphology of weanling piglets was due to the microvascular development of the mucosae via NO production. However, we did not observe any effect of the supplement on NO_x concentration in the jejunal and ileal mucosae. Arg could act on the intestinal mucosae via metabolic effects other than NO synthesis. This amino acid is also involved in nucleotide synthesis and glutamate-glutamine metabolism, which are two important factors that stimulate the proliferation and migration of intestinal epithelial cells (Wang et al. 2008; 2009). Indeed, Liu et al. (2008) noted an increased proliferation index in the mucosae of the ileum and the jejunum of weaned piglets fed a diet supplemented with 0.5 or 1.0% Arg and challenged with LPS.

In conclusion, dietary Zn supplementation increased the total antioxidant capacity in the jejunal and ileal mucosae and expression of anti-inflammatory factor IL10 in the ileum of weanling piglets. The Arg supplement had a limited effect on the control of inflammation and antioxidant status in the jejunal and ileal mucosae. Finally, the combination of Zn and Arg supplementation increased villus height in the mucosa of the jejunum. However, we cannot attribute this structural improvement to any synergic effect of Zn and Arg supplementation on the control of inflammation and antioxidant status.

7. Acknowledgements

Financial support for this work was provided by a grant from the Natural Science and Engineering Research Council (NSERC) awarded to F. Guay and by a studentship from La Fédération des producteurs de porcs du Québec (FPPQ) awarded to N. Bergeron.

8. Bibliography

- Alderton, W.K., Cooper, C.E. and Knowles, R.G. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.*, 357: 593-615.
- AOAC. 2005. Official methods of analysis. 17th ed. Assoc. Off. Anal. Chem. Arlington, VA, USA.
- Benzie, I.F.F. and Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.*, 239: 70-76.
- Canadian Council of Animal Care, 2009. Lignes directrices du CCPA sur : le soin et l'utilisation des animaux de ferme en recherche, en enseignement et dans les tests, a été préparé par le sous-comité spécial sur les animaux de ferme du Comité des lignes directrices du Conseil canadien de protection des animaux (CCPA). http://www.ccac.ca/documents/Normes/Lignes_directrices/Animaux_de_ferme.pdf
- Carlson, M.S., Hill, G.M. and Link, J.E. 1999. Early- and Traditionally weaned nursery pigs benefit from phase-feeding pharmacological concentrations of zinc oxide: Effect on metallothionein and mineral concentrations. *J. Anim. Sci.*, 77: 1199-1207.
- Dasgupta, T., Hebbel, R.P. and Kaul, D.K. 2006. Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models. *Free Rad. Biol.Med.*, 41: 1771-1780.
- Driessen, C., Hirv, K., Kirchner, H. and Rink, L. 1995. Divergent effects of zinc on different bacterial pathogenic agents. *J. Infect. Dis.*, 171: 486-489.
- Erel, O. 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem.*, 37: 277-285.
- Formigari, A., Irato, P. and Santon, A. 2007. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: Biochemical and cytochemical aspects. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 146: 443-459.
- Fukai, T. and Ushio-Kukai, M. 2011. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and disease. *Antioxid. Redox Signal.* 15: 1583-1606.
- Guay, F., Donovan, S.M. and Trottier, N.L. 2006. Biochemical and morphological developments are partially impaired in intestinal mucosa from growing pigs fed reduced-protein diets supplemented with crystalline amino acids. *J. Anim. Sci.* 84: 1749-1760.
- Heo, J.M., Opapeju, F.O., Pluske, J.R., Kim, J. C., Hampson, D.J. and Nyachoti, C.M. 2013. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without in-feed antimicrobial compounds. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 97:207-237.

- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K. and Akira, S. 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immun.*, 162: 3749-3752.
- Houle, V.M., Schroeder, E.A., Odle, J. and Donovan, S. 1997. Small intestinal disaccharidase activity and ileal villus height are increased in piglets consuming formula containing recombinant human insulin-like growth factor-1. *Pediatr. Res.*, 42:78-86.
- Hu, C., Song, J., You, Z., Luan, Z. and Li, W. 2012. Zinc oxide-montmorillonite hybrid influences diarrhea, intestinal mucosal integrity, and digestive enzyme activity in weaned pigs. *Biol. Trace Elem. Res.*, 149:190-196.
- Jain, S.K., McVie, R., Duett, J. and Herbst, J.J. 1989. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes*, 38: 1539–1543.
- Krones, C.J., Klosterhalfen, B., Fackeldey, V., Rosh, R., Junge, K., Schwab, R., Stumpf, M., Klinge, U. and Schumpelick, V. 2004. Deleterious effect of zinc in a pig model of acute endotoxemia. *J. Invest. Surg.*, 70:249-256.
- Kubo, M. and Motomura, Y. 2012. Transcriptional regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in acquired immune cells. *Front. Immunol.*, 3: 275
- Lass, A., Suessenbacher, A., Wölkart, G., Mayer, B. and Brunner, F. 2002. Functional and analytical evidence for scavenging of oxygen radicals by L-arginine. *Mol. Pharmacol.*, 61: 1081-1088.
- Li, X., Yin, J., Li, D., Chen, X., Zang, J. and Zhou, X. 2006. Dietary supplementation with zinc oxide increases IGF-I and IGF-I receptor gene expression in the small intestine of weanling piglets. *J. Nutr.*, 136: 1786–1791.
- Li, H., Cao, R., Wasserloos, K.J., Bernal, P., Liu, Z.-Q., Pitt, B.R. and St-Croix, C.M. 2010. Nitric oxide and zinc homeostasis in pulmonary endothelium. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1203: 73-78.
- Li, Q., Liu, Y., Che, Z., Zhu, H., Meng, G., Hou, Y., Ding, B., Yin, Y. and Chen, F. 2012. Dietary L-arginine supplementation alleviates liver injury caused by *Escherichia coli* LPS in weaned pigs. *Innate Immun.*, 18: 804-814.
- Liu, Y.L., Huang, J.J., Hou, Y.Q., Zhu, H.L., Zhao, S.J., Ding, B.Y., Yin, Y.L., Yi, G.F., Shi, J.X. and Fan, W. 2008. Dietary arginine supplementation alleviates intestinal mucosal disruption induced by *Escherichia coli* lipopolysaccharide in weaned pigs. *Brit. J. Nutr.*, 100: 552-560.
- Ma, X., Lin, Y., Jiang, Z., Zheng, C., Zhou, G., Yu, D., Cao, T., Wang, J. and Chen, F. 2010. Dietary arginine supplementation enhances antioxidative capacity and improves meat quality of finishing pigs. *Amino Acids*, 38: 95-102.

- Martinez, M.M., Hill, G.M., Link, J.E., Raney, N.E., Tempelman, R.J. and Ernst, C.W. 2004. Pharmacological zinc and phytase supplementation enhance metallothionein mRNA abundance and protein concentration in newly weaned pigs. *J. Nutr.*, 134: 538-544.
- Martinez, M.M., Link, J.E. and Hill, G.M. 2005. Dietary pharmacological or excess zinc and phytase effects on tissue mineral concentrations, metallothionein, and apparent mineral retention in the newly weaned pig. *Biol. Trace Elem. Res.*, 105: 97-115.
- Maurice, D., Lightsey, S.F., Toler, J.E. and Canty, S. 2007. Effect of chronic oxidative/corticosterone-induced stress on ascorbic acid metabolism and total antioxidant capacity in chickens (*Gallus gallus domesticus*). *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 91: 355-360.
- McCracken, B.A., Spurlock, M.E., Roos, M.A., Zuckermann, F.A. and Gaskins, H.R. 1999. Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *J. Nutr.*, 129: 613-619.
- Mercer, D.W., Smith, G.S., Cross, J.M., Russell, D.H., Chang, L. and Cacioppo, J. 1996. Effects of lipopolysaccharide on intestinal injury: potential role of nitric oxide and lipid peroxidation. *J. Surg. Res.*, 63: 185-192.
- Michel, F., Bonnefont-Rousselot, D., Mas, E., Draï, J. and Thérond, P. 2008. Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques. *Ann. Biol. Clin.*, 66: 605-620.
- Myers, M.J., Dorothy, D.E., Palmer, D.C. and Post, L.O. 2003. Inflammatory mediator production in swine following endotoxin challenge with or without co-administration of dexamethasone. *Int. Immunopharmacol.*, 3: 571-579
- Namkung, H., Gong, J., Yu, H. and de Lange, C.F.M. 2006. Effect of pharmacological intakes of zinc and copper on growth performance, circulating cytokines and gut microbiota of newly weaned piglets challenged with coliform lipopolysaccharides. *Can. J. Anim. Sci.*, 86: 511-522.
- NRC, 1998. Nutrient requirements of swine, 10th ed. National Academies, Washington, USA.
- Nygard, A-B., Jorgensen, C.B., Cirera, S. and Fredholm, M. 2007. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Mol. Biol.*, 8: 67.
- Peña, J.A., Rogers, A.B., Ge, Z., Ng, V., Li, S.Y., Fox, J.G. and Versalovic, J. 2005. Probiotic lactobacillus spp. diminish helicobacter hepaticus-induced inflammatory bowel disease in interleukin-10-deficient mice. *Infect. Immun.*, 73: 912-920.
- Pié, S., Lallès, J.P., Blazy, F., Laffitte, J., Sève, B. and Oswald, I.P. 2004. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *J. Nutr.*, 134: 641-647.

Prasad, A.S. 1998. Zinc in human health: an update. *J. Trace Elem. Exp. Med.*, 11: 63–87.

Robert, F., Bebin, K., Garrau, J.M., Gueriot, J.F., Foret, R., Brack, M. and Garrel, C. 2009. Evaluation et correction du stress oxydatif du porcelet en post-sevrage. *Journ. Recher. Porcine France*. 41: 173-178.

Sales, J. 2013. Effects of pharmacological concentrations of dietary zinc oxide on growth of post-weaning pigs: a meta-analysis. *Biol. Trace Elem. Res.*, 152: 343-349.

Sargeant, H.R., McDowall, D.J., Miller, H.M. and Shaw, M.A. 2010. Dietary zinc oxide affects the expression of genes associated with inflammation: Transcriptome analysis in piglets challenged with ETEC K88. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 137: 120-129.

Sauerwein, H., Schmitz, S. and Hiss, S. 2005. The acute phase protein haptoglobin and its relation to oxidative status in piglets undergoing weaning-induced stress. *Redox. Report.*, 10: 295-302.

Sauvant D., Perez, J.M. and Tran G. 2004. Tables of composition and nutritional value of feed materials, INRA Editions and AFZ. Wageningen Academic Publishers, Paris, France.

Shankar, A.H. and Prasad, A.S. 1998. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am. J. Clin. Nutr.*, 68: 447-463.

Slade, R.D., Kyriazakis, I., Carroll, S.M., Reynolds, F.H., Wellock, I.J., Broom, L.J. and Miller, H.M. 2011. Effect of rearing environment and dietary zinc oxide on the response of group-housed weaned pigs to enterotoxigenic *Escherichia coli* 0149 challenge. *Animal*, 5:1170-1178.

Wang, J., Chen, L., Li, P., Li, X., Zhou, H., Wang, F., Li, D., Yin, Y. and Wu, G. 2008. Gene expression is altered in piglet small intestine by weaning and dietary glutamine supplementation. *J. Nutr.*, 138: 1025-1032.

Wang, X., Ou, D., Yin, J. and Wang, J. 2009. Proteomic analysis reveals altered expression of proteins related to glutathione metabolism and apoptosis in the small intestine of zinc oxide-supplemented. *Amino Acids*, 37: 209-218.

Webel, D.M., Finck, B.N., Baker, D.H. and Johnson, R.W. 1997. Time course of increased plasma cytokines, cortisol, and urea nitrogen in pigs following intraperitoneal injection of lipopolysaccharide. *J. Anim. Sci.*, 75: 1514-1520.

Wellinghauser, N., Driessen, C. and Rink, L. 1996. Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells by zinc and related cations. *Cytokine* 8: 767-771.

Wijtten, P.J.A., van der Meulen, J. and Verstegen, W.A. 2011. Intestinal barrier function and absorption in pigs after weaning: a review. *Br. J. Nutr.*, 105: 967-981.

Wiseman, D.A., Wells, S.M., Wilham, J., Hubbard, M., Welker, J.E. and Black, S.M. 2006. Endothelial response to stress from exogenous Zn²⁺ resembles that of NO-

mediated nitrosative stress, and is protected by MT-1 overexpression. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 291: 555-568.

Wu, G., Bazer, F.W., Davis, T.A., Kim, S.W., Li, P., Rhoads, J.M., Satterfield, M.C., Smith, S.B., Spencer, T.E. and Yin, Y. 2009. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids*, 37: 153–168

Wu, X., Ruan, Z., Gao, Y., Yin, Y., Zhou, X., Wang, L., Geng, M., Hou, Y. and Wu, G. 2010. Dietary supplementation with L-arginine or N-carbamylglutamate enhances intestinal growth and heat shock protein-70 expression in weanling pigs fed a corn- and soybean meal-based diet. *Amino Acids*, 39: 831-839.

Yao, K., Guan, S., Li, T., Huang, R., Wu, G., Ruan, Z. and Yin, Y. 2011. Dietary L-arginine supplementation enhances intestinal development and expression of vascular endothelial growth factor in weanling piglets. *Brit. J. Nutr.*, 105: 703-709.

Yen, J.T. 2001. Anatomy of the digestive system and nutritional physiology. In: Lewis AJ, Southern LL. (ed.) *Swine Nutrition*. CRC Press, Boca Raton, USA. Pages 32–63.

Yu, I.T., Lin, J. and Lee, D.N. 2000. Effect of various levels of zinc and copper in diet on growth and immune responses of weaning pigs. *Asian-Aus. J. Anim. Sci.*, 13: 81.

Zhan, Z., Ou, D., Piao, X., Kim, S.W., Liu, Y. and Wang, J. 2008. Dietary arginine supplementation affects microvascular development in the small intestine of early-weaned pigs. *J. Nutr.*, 138: 1304-1309.

Zheng, P., Yu, B., He, J., Tian, G., Luo, Y., Mao, X., Zhang, K., Che, L. and Chen, D. 2012. Protective effects of dietary arginine supplementation against oxidative stress in weaned piglets. *Br. J. Nutr.*, 109: 2253-2260.

Zhu, L.H., Zhao, K.L., Chen, X.L. and Xu, J.X. 2012. Impact of weaning and an antioxidant blend on intestinal barrier function and antioxidant status in pigs. *J. Anim. Sci.*, 90: 2581-2589.

CHAPITRE 3 - FEED SUPPLEMENTATION WITH ARGININE AND ZINC ON ANTIOXIDANT STATUS AND INFLAMMATORY RESPONSE IN CHALLENGED WEANLING PIGLETS

Nadia Bergeron, Claude Robert, and Frédéric Guay

Department of Animal Science, Université Laval, Québec, Québec, Canada G1V 0A6.

Animal Nutrition, 2017 (3): 236-246.

Key words: Antioxidant, inflammation, zinc, arginine, piglet, weaning

1. Résumé

Les rations alimentaires avec un haut niveau de ZnO et un supplément d'Arg sont connues pour améliorer la croissance des porcelets récemment sevrés mais les mécanismes d'actions ne sont pas encore bien connus. Nous avons avancé l'hypothèse que le métabolisme antioxydant et la réponse anti-inflammatoire étaient impliqués. Les effets de l'ajout de Zn et Arg ont été évalués sur des porcelets après une injection de LPS. Quarante-huit porcelets sevrés à l'âge de 20 jours, à qui on a attribué pendant 7 ou 14 jours une ration supplémentée ou non de Zn (2,500 mg oxide de Zn/kg) et Arg (1%). Au jour 5, les porcelets (2 par parc) ont reçu une injection intramusculaire de LPS (100 µg/kg) et des échantillons de sang ont été prélevés avant et 6h, 24h et 48h après l'injection. Au jour 7, tout de suite après avoir prélevé le dernier échantillon de sang (48h après l'injection de LPS), 1 porcelet dans chacun des parcs a été euthanasié afin de prélever des échantillons de muqueuse de l'iléon. Au jour 12, le porcelet restant a de nouveau reçu une injection de LPS (100 µg/kg) et les mêmes échantillons de sang et de muqueuse de l'iléon que le premier porcelet ont été prélevés. À partir du jour 5 jusqu'au jour 12 avant l'injection de LPS, la concentration de glutathione total (GSH + GSSG) et de glutathione réduite (GSH) a augmenté et la concentration en TNF (tumor necrosis factor- α) a diminué ($P < 0,05$), tandis que les concentrations en MDA (malondialdéhyde), TAC (capacité totale antioxydante) et TOS (statut oxydant total) n'ont pas été modifiées. L'ajout de ZnO a fait diminuer la concentration plasmatique de MDA au jour 5 et 12 ($P < 0,05$) et a réduit la concentration sérique d'haptoglobine au jour 12 avant l'injection de LPS. L'ajout de Arg a réduit la concentration de GSH oxydé ($P < 0,05$) au jour 5 et 12. L'injection de LPS au jour 5 et 12 a fait augmentation les concentrations de TNF, haptoglobine, GSH+GSSG, GSH et TAC ($P < 0.05$) mais n'a eu aucun impact sur la concentration en MDA et NOx. Suite à l'injection de LPS, l'ajout de Zn et d'Arg a eu des effets limités sur la concentration de GSH+GSSG et GSH entre les jours 5 et 7 et sur le ratio TAC_TOS entre les jours 12 et 14. L'ajout de Zn à la ration a fait augmenter l'expression de MT et TAC dans la muqueuse iléale au jour 14 ($P < 0.05$). Cette étude a montré que l'ajout d'une forte dose de Zn réduisait l'oxydation des lipides et l'inflammation (concentration d'haptoglobine) pendant le sevrage. Finalement, l'ajout de Zn et Arg a eu des effets limités sur les statuts oxydatif et inflammatoire suivant l'injection de LPS.

2. Abstract

High level of dietary ZnO and Arg supplementation are known to improve growth in weanling piglets but the mechanism of action is not yet well understood. We hypothesized that antioxidant metabolism and inflammatory response was involved. The effects of high Zn supplement and Arg supplementation were evaluated on the antioxidant status and inflammatory response of piglets after LPS stimulation. Forty-eight 20-day-old weanling piglets were placed for 7 or 14 days on diets supplemented or not with Zn (2,500 mg Zn oxide/kg) and Arg (1%). On day 5, piglets (two per pen) were injected and blood samples were taken just before and, 6, 24 and 48 h after LPS injection (100 µg/kg). On day 7, shortly after obtaining the last post-LPS blood sample, one piglet per pen piglets was euthanized and samples of mucosa were taken from the ileum. On day 12, remaining piglet was injected again with same LPS dose and blood and ileum samples were collected as for the piglet on day 7. From days 5 to 12 before LPS injection, reduced glutathione (GSH) and total glutathione (GSH + GSSG) increased and TNF (tumor necrosis factor- α) concentration decreased ($P < 0.05$) whereas MDA (malondialdehyde), TAC (total antioxidant capacity) and TOS (total oxidant status) concentrations were not modified. Zinc supplementation decreased plasma MDA on days 5 and 12 ($P < 0.05$) and reduced serum haptoglobin on day 12 before LPS injection. Arg supplementation reduced oxidized GSH ($P < 0.05$) on days 5 and 12. LPS injection on days 5 and 12 increased TNF, haptoglobin, total GSH, reduced GSH and TAC plasma concentration ($P < 0.05$) but had no impact on MDA and NOx concentration. Following the injection of LPS, Zn and Arg supplements had limited effects on reduced and total GSH from days 5 to 7 and on the TAC_TOS ratio from days 12 to 14. Zn supplementation increased both MT expression and TAC in the ileal mucosa on day 14 ($P < 0.05$). This study showed that high Zn supplement reduced lipid oxidation and inflammation (Hapto concentration) during post-weaning period. However, Zn and Arg supplementations had limited effect on oxidative and inflammatory status following LPS challenge.

3. Introduction

For piglets, abrupt weaning and change in feed form from milk to solid feed cereal-based compound result in an increase of systemic and intestinal inflammation in piglets. This inflammation is characterized by an over-expression of pro-inflammatory cytokines (Pié et al., 2004; Tizard, 2004) as Tumor necrosis factor- α (TNF), Interferon γ (IFN), Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-2, IL-6 and IL-12p40 (Stokes et al., 2004). Haptoglobin, a protein of the acute phase of inflammation, increases also in serum after weaning in piglets (Petersen et al., 2004; Sauerwein et al., 2005). Weaning is usually followed by a systemic and intestinal oxidative stress (Sauerwein et al., 2005; Robert et al. 2009; Zhu et al., 2012). Oxidative stress is an unbalanced equilibrium between the reactive oxygen species (ROS) production and the antioxidant system of the animal; an increase of oxidant products as malondialdehyde (MDA) and oxidized glutathione (GSH) are some indicators of oxidative stress (Jaeschke, 2011).

Lots of experiments have shown that feeding pharmacological dose of Zn (2000-3000 mg/kg) to weaning piglets improves growth performances, reduces diarrhea and impact positively the immune response (Martin et al., 2013). Other studies have also shown that Arg supplements (0.5 to 1%) improved growth and feed efficiency in weaned piglets (Wu et al. 2010; Yao et al. 2011). In a recent study, we have noted that Zn supplementation (2500 mg/kg) reduced plasma concentration of malondialdehyde (MDA) after weaning in piglets (Bergeron et al. 2014). The Zn supplementation would also improve total antioxidant capacity in jejunal and ileal mucosa and Arg supplement improved the systemic antioxidant status 3 h after LPS challenge (acute inflammatory condition) (Bergeron et al., 2014). However, we do not know if these effects are observed after stimulation by LPS to simulate a chronic inflammatory condition.

The objective of this experimentation was to determine the impact of dietary Arg supplementation and high level of Zn supplements on antioxidant and inflammatory status in weaning piglets during a chronic inflammatory challenge. The hypothesis is that the Zn and Arg supplementations improve antioxidant status and control inflammation in LPS challenged piglets.

4. Materials and methods

4.1 *Animals and housing*

Forty-eight 20-day-old (± 1 day) male-castrated piglets (*Yorkshire* x *Landrace*, Coopérative Fédérée, Qc, Canada) were moved from the farrowing room of a commercial farm to an experimental farm (Centre de recherche en sciences animales de Deschambault, Québec, Canada) for a period of 7 or 14 days. At arrival the piglets were kept two per pen (1 m x 2 m) equipped with a feeder and watering nipple. At day 7, one pig per pen was euthanized 48 h after a lipopolysaccharide (LPS) injection as described below. Other pig was kept individually in the pen thereafter. The ambient temperature was set at 32°C for their arrival, decreased until day 7 to 26°C and maintained at this temperature on a 12h/12h light/dark photoperiod until the end of the experiment. All animal procedures were conducted according to the guidelines set by the Canadian Council on Animal Care (2009) and the experimental protocol was approved by the Animal Use and Care Committee of Laval University.

4.2 *Experimental design and diets*

Four diets (Table 3.1) were formulated to meet or exceed recommendations suggested by the NRC (1998) for piglets. Dietary treatments were begun just after weaning. The diets were designated as follows: **ZN0ARG0** or control (n = 12), **ZN2500ARG0** (containing 2,500 mg Zn/kg; n = 12), **ZN0ARG1** (containing 1% Arg; n = 12) and **ZN2500ARG1** (containing 2,500 mg Zn/kg and 1% Arg; n = 12). Piglets were distributed according to their initial body weight (BW) among the four treatments in a randomized complete block design, initially with twelve piglets per treatment. The piglets are grouped in the pen to minimize the difference in weight between the two animals. Feed was provided daily in three equal installments for the 14-day period. Feeding level was at 60 g/(piglet x day) on day 0 and was adjusted daily by increasing the previous day's intake by 45%. During the LPS challenge between days 5 and 7, and 12 and 14, feeding level was maintained to the same level as before the injection and refusal was noted daily. Piglets had *ad libitum* access to water during the experiment. The piglets were weighed on days 0 and 7 and 14.

Table 3.1: Composition of experimental diets (as-fed basis).

	ZN0ARG0	ZN2500ARG0	ZN0ARG1	ZN2500ARG1
<i>Ingredients (% of total diet)</i>				
Ground corn	31.5	31.5	31.5	31.5
Soybean meal	22.5	22.5	22.5	22.5
Whey powder	20.0	20.0	20.0	20.0
Hamlet Protein 300	9.5	9.5	9.5	9.5
Choice fat	5.0	5.0	5.0	5.0
Spray-dried animal plasma	3.5	3.5	3.5	3.5
Blood meal	2.5	2.5	2.5	2.5
Limestone	1.1	1.1	1.1	1.1
Di-calcium phosphate	1.0	1.0	1.0	1.0
Salt	0.3	0.3	0.3	0.3
Vitamins ¹	0.25	0.25	0.25	0.25
Minerals ²	0.25	0.25	0.25	0.25
Lysine HCL	0.25	0.25	0.25	0.25
DL-methionine	0.15	0.15	0.15	0.15
L-threonine	0.10	0.10	0.10	0.10
Corn starch	0.40	---	1.1	0.70
Zinc oxide	---	0.40	---	0.40
L-arginine-HCl	---	---	1.00	1.00
L-alanine	1.70	1.70	---	---
<i>Analyzed nutrient composition</i>				
ME, MJ/kg	18.67	18.72	18.68	18.69
CP, %	25.18	24.49	24.77	24.81
Calcium, %	0.78	0.78	0.73	0.77
Phosphorus, %	0.58	0.61	0.53	0.57
Zinc, mg/kg	134	2,224	123	2,342
Total lysine, %	1.69	1.65	1.67	1.67
Total arginine, %	1.52	1.49	2.30	2.31
<i>Calculated nutrient composition³</i>				
Digestible lysine, %	1.52	1.52	1.52	1.52
Digestible arginine, %	1.37	1.37	2.17	2.17

¹Provided per kilogram of diet: vitamin A palmitate 5,000 IU; vitamin D₃ 1,000 IU; vitamin E acetate

22.5 IU; menadione sodium bisulphite 3.75 mg; thiamine HCl 1.0 mg; riboflavin 4.5 mg; niacin 20.0 mg; calcium pantothenate 25.0 mg; pyridoxine HCl 1.5 mg; biotin 0.2 mg ; choline bitartrate 375 mg ; vitamin B₁₂ 25.0 µg

²Provided per kilogram of diet: Zn (as zinc carbonate) 100 mg; Fe (as ferric citrate) 100 mg; Cu (as cupric carbonate) 25 mg; I (as potassium iodate) 0.28 mg; Mn (as manganous carbonate) 46 mg; Se (as sodium selenite) 0.30 mg.

³Values for nutritional composition were calculated according to Sauvant et al. (2004)

4.3 Challenge with lipopolysaccharide

Lipopolysaccharide (*Escherichia coli* LPS, K-235 Sigma Aldrich, St-Louis, MO, USA) was administered by an intramuscular injection ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$ BW) as a model of chronic inflammation and oxidative stress (Rakhshandeh and de Lange, 2012) on days 5 and 12. On day 5, the two piglets in the pen were injected and blood samples were taken just before (T0) and, 6 h (T6), 24 h (T24) and 48 h (T48) after LPS injection on one piglet per pen. On day 12, remaining piglet was injected again with same LPS dose and blood samples were collected according to same sampling schedule. All samples were placed on ice and then centrifuged at $2000 \times g$ for 15 min at 4°C . Plasma was stored at -80°C for further analysis.

4.4 Tissue collection

Shortly after obtaining the last post-LPS blood sample (48 h post-injection) on day 7 or 14, piglets were first sedated with an intramuscular injection of Azaperone (Stresnil, Vetoquinol Canada inc. Qc, Canada) at doses of 2 mg/kg. After sedation, the piglets were euthanized by CO_2 inhalation. The entire intestine was removed and freed from the mesentery. The segment ending 50 cm cranial from the cecum was considered ileum (Yen 2001). For this section, the 20 cm from the middle portion was used for biochemical analyses and determination of mRNA expression levels of MT-1, tumor necrosis factor- α (TNF) and inductive nitric oxide synthase (iNOS). The ileal 20 cm segments were rinsed with ice-cold saline solution (0.9% NaCl), opened lengthwise and blotted dry. The mucosa was scraped from the underlying tissue using a glass slide, immediately transferred into liquid nitrogen, and then stored at -80°C until analysis.

4.5 Biochemical analysis

Malondialdehyde (MDA) generation in samples of plasma and ileum was measured according to the method of Jain et al. (1989) as an index of lipid peroxidation and oxidative status (Michel et al., 2008). Plasma assays were done as described in the method. Intra- and inter-assay CV values were 6.0 and 5.5%, respectively. For samples of jejunum and ileum, 0.5 g of tissue was homogenized directly (Ultra-Turrax T18, IKA-Labortechnik, Stenfer, Germany) with 5 mL of ice-cold PBS pH 7.4 and then centrifuged at $2000 \times g$ for 15 min. The supernatant (100 μL) was used for the assay as

previously described for plasma. Intra- and inter-assay CV values were 7.0 and 6.0%, respectively.

The TNF concentrations were determined in plasma using an ELISA kit (# KSC3012/KSC3011, Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) with intra- and inter-assay CV values of 6.0 and 7.2%, respectively.

Total antioxidant capacity (TAC) of plasma and ileal mucosae were assayed according to the method of Erel (2004) and Maurice et al. (2007) with intra- and inter-CV values of 2.5 and 3.0%, respectively. TAC assay measures the concentration of antioxidants including vitamin C, vitamin E, glutathione, polyphenol compounds and protein thiol groups (Erel 2004). Plasma assays were done as described in the method. For tissues, (0.5 g was homogenized (Ultra-Turrax T18, IKA Labortechnik) in 5 mL of ice-cold PBS pH 7.4 and centrifuged at 2000g for 15 min. The supernatant (80 mL) was used 2000 x g for 15 min. The supernatant (80uL) was used for the assay as described for the plasma assay. Total oxidant status (TOS) of serum was assayed according to the method of Erel (2005) with intra- and inter-CV values of 2.0 and 3.5%, respectively. The TOS assay is linearly related to the molar concentration of oxidant substrates (hydrogen peroxide, cumene hydroperoxide, tert-butyl hydroperoxide).

Reduced and total Glutathione (GSH) of plasma was determined using the fluorescent detection kit K006-F5 (Arbor Assays, Ann Arbor, USA) according to manufacturer instructions with intra- and inter-assay CV values of 3.7 and 9.1%, for reduced GSH, and 3.6 and 10.0% for total GSH, respectively.

Haptoglobin (Hapto) of serum was determined using the Pig Haptoglobin ELISA kit KT-349 (Kamiya Biomedical Company, Seattle, USA) according to manufacturer instructions with intra- and inter-assay CV values of 5.0 and 6.2%, respectively.

The plasma nitrite + nitrate (NOx) concentration was assayed using fluorometric kit 780051 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA). Intra- and inter-assay CV values were 2.5 and 3.5%, respectively.

4.6 Analysis of *MT1*, *TNF* and *NOS2* mRNA expression

Total RNA was extracted from 170 mg of tissue homogenized (Ultra-Turrax T18, IKA-Labortechnik) in 1 mL of TRIzol reagent (Invitrogene, Ontario, Canada). RNA extracts were purified on RNeasy Mini Spin Columns including the Rnase-free Dnase step (Qiagen, Ontario, Canada) and quantified with a Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies). RNA quality of every sample was analyzed on the Agilent 2100 Bioanalyzer with the Agilent RNA 6000 Nano Assay Protocol (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Samples with a RNA integrity number (RIN) over 7.5 were kept for further analysis. Samples with a RIN under 7.5 were re-extracted.

RT procedure was performed with the Sensiscript® reverse transcription kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Before RT reaction, RNA was denatured (secondary structures disrupted) using the following procedure: 72°C for 2 min then placed immediately on ice until the addition of the enzyme; this procedure increases primer annealing, which in turn increases RT reaction output. After this procedure, two micrograms of denatured RNA were mixed with random decamer solution (10 µM, Ambion), held for five minutes at 65°C and then placed on ice. Four units of Sensiscript reverse transcriptase (Qiagen) in of 1X RT buffer with 0.5 mM dNTP and 10U Rnase inhibitor (Promega) were added and the reaction mixture was held for 10 minutes at 25°C to allow priming of the random decamers, followed by one hour at 37°C.

The resulting cDNA (2 µL) was then amplified on the Roche LightCycler by real-time PCR in buffer containing 0.25 mM of each primer, 3 mM MgCl₂ in 1X SYBR green, dNTPs and FastStart Taq DNA polymerase enzyme (Roche) in total volume of 20 µL. Primer sequences are shown in Table 3.2. The PCR conditions used for all genes were as follows: denaturing cycle of 10 minutes at 95°C, 45 PCR cycles (denaturing at 95°C for 5 seconds; 5 seconds at the annealing temperature in Table 3.2; extension at 72°C for 20 seconds), followed by a melting cycle. DNA was quantified using LightCycler Software Version 3.5 and comparison with the standard curve.

The standard curve consisted of five dilutions of purified amplicon (diluted from 0.1 pg to 0.1 fg). Quantitative PCR was performed using a LightCycler apparatus with SYBR green incorporation (Roche Diagnostics, Laval, Qc, Canada). Amplicon specificity was confirmed by analysis of the melting curve given by the Lightcycler software.

Table 3.2: Primers used for measurement of gene expression level by quantitative PCR

Gene Description	Gene Symbol	Primer sequences	qPCR efficiency (%)	Amplicon size (bp)	Annealing Temperature (°C)	Fluorescence acquisition temp. (°C)	GeneCards identifiers
<i>Actin, beta</i>	ACTB	Up 5' -CACGCCATCCTGCGTCTGGA- 3' Low 5' -AGCACCGTGTGGCGTAGAG- 3'	93	452	58.7	72	GC07M005566
<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	GAPDH	Up 5' -ACACTCACTCTTCTACCTTTG- 3' Low 5' -CAAATTCATTGTCGTACCAG- 3'	95	90	49.3	81	GC12P006643
<i>Ribosomal protein L4</i>	RPL4	Up 5' -CAAGAGTAACTACAACCTTC- 3' Low 5' -GAACTCTACGATGAATCTTC- 3'	94	635	60.0	72	GC15M066790
<i>Metallothionein</i>	MT1	Up 5'-TTGCTCTCTGCTTGGTCTCACCT-3' Low 5'-GGGATGTAGCATGAAGTCAGTGCATGTG-3'	98	378	60.3	72	NM 001001266
<i>Tumour necrosis factor-α</i>	TNF	Up 5'-GCCCACGTTGTAGCCAATGTCAAA-3' Low 5'-TTGTCTTTCAGCTTCACGCCGTTG-3'	99	98	58.0	72	GC06P031543
<i>Nitric oxide synthase 2, inducible</i>	NOS2	Up 5'-TCCAGAAGCAGAACGTGACCATCA-3' Low 5'-GAGCACGGCTTTGACCAAGACTTT-3'	93	293	58.0	72	GC17M026083

Amplicons were then separated by electrophoresis on 1% agarose gel and sequenced to confirm that the proper sequence was amplified. Expression of mRNA was normalized using the geometric means of three housekeeping genes (ACTB, GAPDH and RPL4) and GeNorm version 3.5. These housekeeping genes are usually used (Nygard et al. 2007; Chapman and Walderström, 2015) for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR.

4.7 *Feed analysis*

Feed samples were finely ground using a sample mill (Cyloctec 1093, Foss Tecator, Sweden). Energy analysis in feed was done with a calorimetric bomb (Parr Instruments Co., Moline, IL, USA). Nitrogen was determined in feed samples by the combustion method using the Leco Nitrogen Determinator (model TruSpec v1.10, Leco, MI, USA). The mineral analysis (P, Ca, and Zn) in feeds were done according to AOAC (2005) (procedures 985.01). Samples were then analysed with an ICP-OES (Optima 430DV, Perkin Elmer. MA, USA). Lysine and Arg were determined by HPLC (Water HPLC system, Water Corporation, MA, USA) as described by Guay et al. (2006).

4.8 *Statistical analysis*

To study the effect of post-weaning period (before LPS injection), data were analyzed using the MIXED procedure of SAS (SAS inst. Inc. Cary, NC) according to a 2 x 2 x 2 factorial arrangement in a randomized complete block design (initial body mass) with Zn and Arg supplementation as the two main independent variables and the post-weaning days (5 and 12) was added as a third factor. Treatment means and interactions were calculated for blood parameters (i.e. MDA, TAC, TOS, GSH (reduced, oxidized, total), TNF, Hapto and Nox concentrations), mucosal mRNA expression (TNF, MT1 and NOS2 expression) and mucosal antioxidant and oxidative status (MDA, and TAC concentration). The model was: $Y_{ijk} = \mu + B_i + F_j + (B_i \times F_j) + P_k + (B_i \times P_k) + (F_j \times P_k) + (B_i \times F_j \times P_k) + e_{ijk}$, where Y_{ij} = dependent variable, B_i = Zn factor, F_j = Arg factor, P_k = post weaning day and e_{ij} = residual error. To study the effect of time after a LPS injection, data from blood parameters were analyzed using the MIXED procedure of SAS (SAS inst. Inc. Cary, NC) according to a 2 x 2 x 4 factorial arrangement with Zn and Arg supplementation as the two main independent variables and the time post injection

was added as a third factor and was analysed using repeat option. Two different analyses were made for the two post weaning periods, for the period between days 5 and 7 and between days 12 and 14, respectively. The model was: $Y_{ijk} = \mu + B_i + F_j + (B_i \times F_j) + T_k + (B_i \times T_k) + (F_j \times T_k) + (B_i \times F_j \times T_k) + e_{ijk}$, where Y_{ij} = dependent variable, B_i = Zn factor, F_j = Arg factor, T_k = time after the LPS injection and e_{ij} = residual error. For growth parameters (i.e. average daily weight gain [ADG], average daily feed intake [ADFI], and growth-to-feed ratio [G:F]), only Zn and Arg supplementation was including in model as the two main independent variables. For each analysis, the pen was considered as an experimental unit. Differences between means were considered significant at $P < 0.05$. For parameters measured in plasma, the baseline value (at day 1) was added as a covariable in all statistical models.

5. Results

5.1 *Growth performance*

The initial and final weights of piglets were not affected by dietary supplements of Zn and Arg (Table 3.3). There was an interaction between Zn and Arg for the ADFI but only for the period after the first LPS injection (days 5 to 7; $P < 0.05$). However, this interaction is not present for the second LPS injection (days 12 to 14).

5.2 *Effect of post-weaning days before LPS injection*

The piglets fed Zn-supplemented diets had reduced plasma MDA concentration before the LPS injection during post weaning period ($P < 0.05$, Table 3.4) compared to those fed the ZN0 diet. As shown in Table 3.4, the reduced and total GSH concentrations were significantly higher on day 12 than at day 5 ($P < 0.001$) but not oxidised GSH. Arg supplement tended to decrease reduced GSH when diet was not supplemented with Zn but increased it when Zn was added to the diet (Zn x Arg, $P = 0.075$). However, Arg supplement significantly decreased the oxidized GSH concentration ($P < 0.05$) and oxidized_total GSH ratio during post-weaning period. Also, Arg supplement tended to reduce TAC concentration ($P = 0.059$) and TAC_TOS ratio ($P=0.086$).

Table 3.3: Growth performances (average daily gain (ADG), average daily feed intake (ADFI), feed efficiency (G:F)) of piglets weanling on diets supplemented or not with Zn and Arg

Treatment ¹	Initial BW	7 days BW	14 days BW	ADG (g/d)		G:F		ADFI (g/d)			
	(kg)	(kg)	(kg)	0-7d	7-14d	0-7d	7-14d	0-7d	5-7d	12-14d	7-14d
	n=12	n=12	n=6	n=12	n=6	n=12	n=6	n=12	n=12	n=6	n=6
ZN0ARG0	6.93	7.78	10.60	137	431	0.389	0.836	355	540 ^a	514	468
ZN0ARG1	7.39	7.90	10.72	107	433	0.283	0.835	358	306 ^b	519	499
ZN2500ARG0	7.39	7.85	10.95	80	435	0.237	0.863	302	313 ^b	507	490
ZN2500ARG1	6.81	7.52	10.42	125	437	0.358	0.865	347	490 ^{ab}	505	515
SEM	0.31	0.33	0.49	30	23	0.078	0.046	26	93	10	28
Zn	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Arg	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Zn x Arg	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.019	NS	NS

¹ ZN2500ARG1: control diet + 2500 mg of Zn (ZnO) + 1% Arg (n = 7); ZN2500ARG0: control diet + 2500 mg of Zn (ZnO) (n = 8); ZN0ARG1: control diet + 1% Arg (n = 8); ZN0ARG0: control diet (n = 9)

Table 3.4: Malondialdehyde (MDA), reduced, oxidised and total Glutathione (GSH), concentrations and oxidised_total GSH ratio (O_T GSH) in plasma before LPS injection on day 5 and 12 post-weaning from piglets fed diets supplemented or not with Zn and Arg

Treatment ¹	MDA ($\mu\text{mol/L}$)		Reduced GSH ($\mu\text{mol/L}$)		Oxidized GSH ($\mu\text{mol/L}$)		Total GSH ($\mu\text{mol/L}$)		O_T GSH Ratio	
	Day 5	Day 12	Day 5	Day 12	Day 5	Day 12	Day 5	Day 12	Day 5	Day 12
	n=12	n=6	n=12	n=6	n=12	n=6	n=12	n=6	n=12	n=6
ZN0ARG0	2.73	3.05	1.62	3.04	0.42	0.59	2.37	4.46	0.183	0.142
ZN0ARG1	3.04	3.01	0.77	2.61	0.15	0.43	1.14	3.54	0.126	0.132
ZN2500ARG0	2.73	2.56	0.87	2.15	0.55	0.65	1.85	3.46	0.277	0.205
ZN2500ARG1	2.83	2.35	1.91	2.30	0.49	0.39	2.76	3.05	0.149	0.134
SEM	0.25		0.50		0.13		0.64		0.040	
Arg	NS		NS		0.039		NS		0.021	
Zn	0.041		NS		NS		NS		NS	
Day	NS		0.001		NS		0.001		NS	
Zn x Arg	NS		0.075		NS		NS		NS	
Day x Zn	NS		NS		NS		NS		NS	
Day x Arg	NS		NS		NS		NS		NS	
Day x Zn x Arg	NS		NS		NS		NS		NS	

¹ZN2500ARG1: control diet + 2500 mg of Zn (ZnO) + 1% Arg (n = 7); ZN2500ARG0: control diet + 2500 mg of Zn (ZnO) (n = 8); ZN0ARG1: control diet + 1% Arg (n = 8); ZN0ARG0: control diet (n = 9)

Inflammatory status evaluated during post weaning period showed that TNF concentration was higher at day 5 than day 12 (Table 3.5; $P < 0.01$) but was not affected by dietary treatments. However, Zn supplementation decreased the Hapto concentration at day 12 (377 vs 1074 mg L⁻¹) but increased it at day 5 (1046 vs 897 mg L⁻¹, Table 3.5, Zn x Day, $P < 0.05$). Finally, Zn supplement tended only to reduce NOx concentration ($P = 0.099$).

5.3 *Effect of LPS injection*

From days 5 to 7, Zn and Arg supplements had no effect on MDA concentration during LPS challenges (Fig. 4.1). However, the Zn supplement reduced plasma MDA concentration only on T0 (Fig. 4.1, Zn x Time, $P < 0.05$). However between the days 5 and 7, the highest value of TAC was obtained at T6 (192 ± 24 $\mu\text{mol L}^{-1}$) followed by the values at T0 (165 $\mu\text{mol L}^{-1}$) and at T24 (145 $\mu\text{mol L}^{-1}$) and T48 (144 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (Time effect, $P < 0.05$); from days 12 to 14, only a tendency of post-injection time was observed ($P = 0.060$). For TOS value, Arg supplementation increased concentration compared to unsupplemented diet but only when diet was also unsupplemented with Zn during LPS challenge from days 12 to 14 (Zn x Arg, $P < 0.05$). TAC_TOS ratio decreased during the post-LPS injection periods (Time effect, $P < 0.05$). However, during second period (days 12 to 14), TAC_TOS ratio was reduced in ZN2500ARG0 and ZN0ARG1 compared to ZN2500ARG1 and ZN0ARG0 (Zn x Arg, $P < 0.05$).

From days 5 to 7, the Zn supplementation increased significantly GSH and GSH + GSSG (Fig. 4.2, $P < 0.05$) during LPS challenge but especially when diet was also supplemented with Arg (Zn x Arg, $P < 0.05$). The GSH and GSH + GSSG concentrations were also higher 24 and 48 hours after the LPS injection for all dietary treatments than at T0 and T6 (Time effect, $P < 0.05$). The Zn supplementation also increased oxidized GSH ($P < 0.05$) during LPS challenge on days 5 to 7; however, Zn supplement tended only to decrease oxidised GSH during LPS challenge on days 12 to 14 ($P = 0.062$).

Haptoglobin and TNF concentrations increased during the LPS challenges (on days 5 and 12) with highest values at 24h and 48h for Hapto and at 6h for TNF (Fig. 4.3, Time effect, $P < 0.01$).

Table 3.5: Total antioxidant capacity (TAC), Total oxidant status (TOS), TAC_TOS ratio, Tumor necrosis factor- α (TNF), haptoglobine (Hapto) and nitrite/nitrate (NOx) concentrations in plasma before LPS injection on day 5 and 12 post-weaning of piglets fed diets supplemented or not with Zn and Arg

Treatments ¹	TAC ($\mu\text{mol/L}$)		TOS ($\mu\text{mol/L}$)		TAC_TOS Ratio		TNF (ng/L)		Hapto (mg/L)		NOx (nmole/L)	
	Day 5	Day 12	Day 5	Day 12	Day 5	Day 12	Day 5	Day 12	Day 5	Day 12	Day 5	Day 12
	n=12	n=6	n=12	n=6	n=12	n=6	n=12	n=6	n=12	n=6	n=12	n=6
ZN0ARG0	169	158	10.39	6.93	38.46	97.04	178	107	1083	1173	635	949
ZN0ARG1	156	122	7.94	9.40	23.76	12.70	185	88	710	975	1354	752
ZN2500ARG0	151	151	8.22	9.24	49.45	51.03	166	139	1279	322	652	598
ZN2500ARG1	131	95	5.70	8.18	54.35	13.45	177	142	812	432	698	650
SEM	28		4.75		25.70		30		307		246	
Arg	0.059		NS		0.086		NS		NS		NS	
Zn	NS		NS		NS		NS		NS		0.099	
Day	NS		NS		NS		0.010		NS		NS	
Zn x Arg	NS		NS		NS		NS		NS		NS	
Day x Zn	NS		NS		NS		NS		0.047		NS	
Day x Arg	NS		NS		NS		NS		NS		NS	
Day x Zn x Arg	NS		NS		NS		NS		NS		NS	

¹ ZN2500ARG1: control diet + 2500 mg of Zn (ZnO) + 1% Arg (n = 7); ZN2500ARG0: control diet + 2500 mg of Zn (ZnO) (n = 8); ZN0ARG1: control diet + 1% Arg (n = 8); ZN0ARG0: control diet (n = 9)

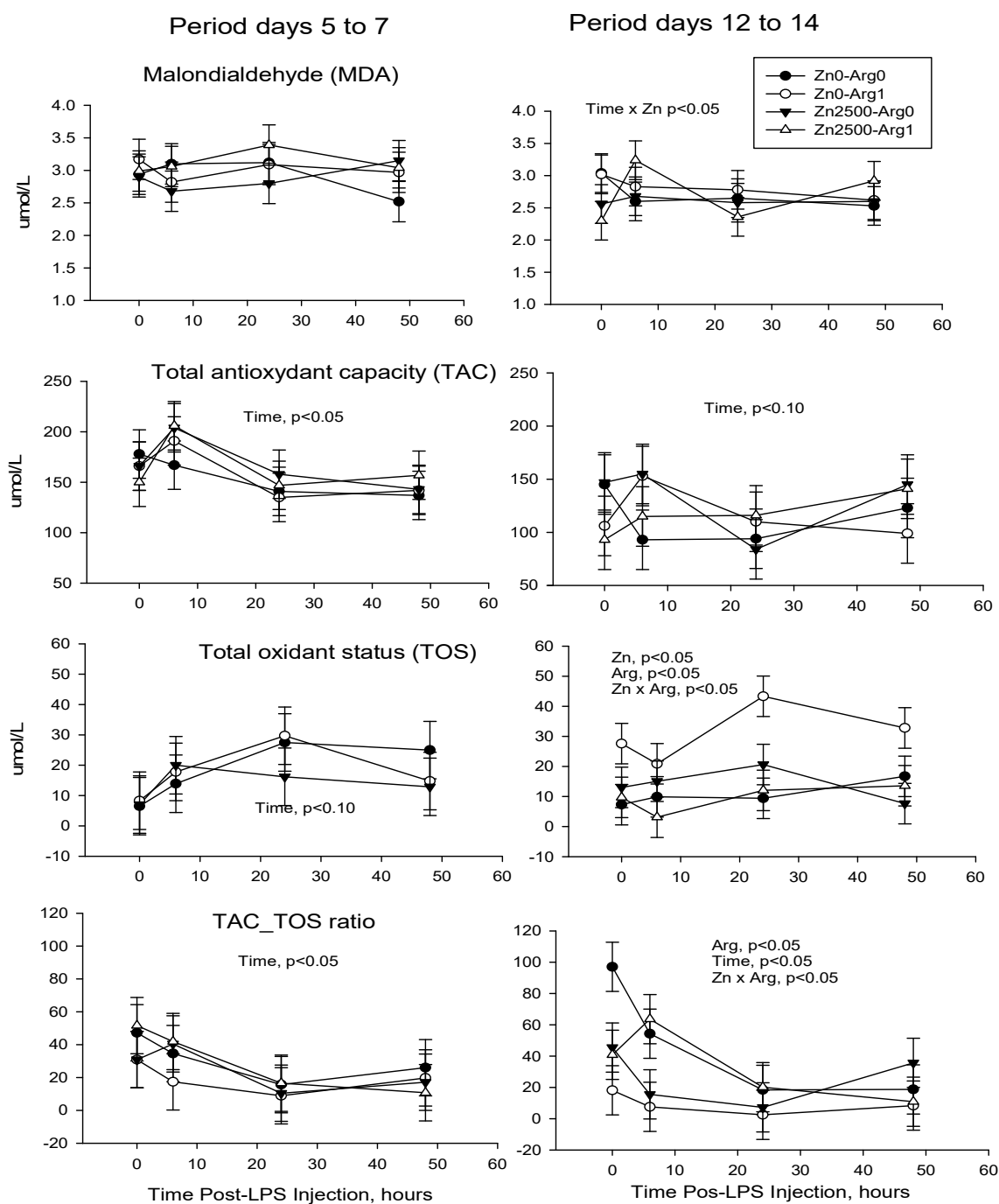


Figure 3.1 Malondialdehyde (MDA), Total antioxidant capacity (TAC) and Total oxidant status (TOS) plasma concentrations and TAC_TOS ratio of piglets fed diets supplemented or not with Zn and Arg before (0h) and after LPS injection (6h, 24h and 48h).

For days 5 to 7, $n=12$. For days 12 to 14, $n=6$

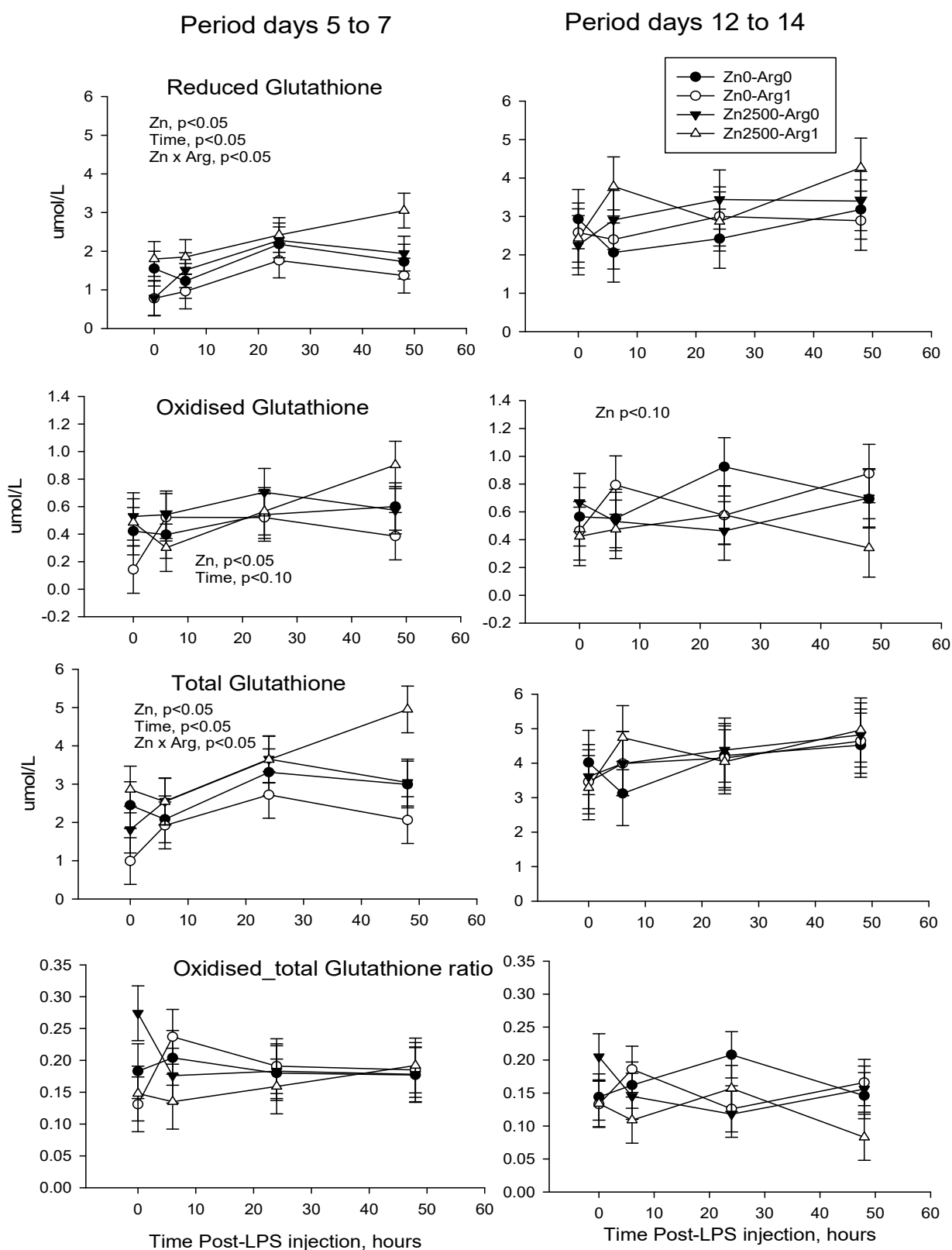


Figure 3.2 Total, reduced, oxidised glutathione (GSH) plasma concentrations and oxidised_total GSH ratio of piglets fed diets supplemented or not with Zn and Arg before (0h) and after LPS injection (6h, 24h and 48h).

For days 5 to 7, $n=12$. For days 12 to 14, $n=6$.

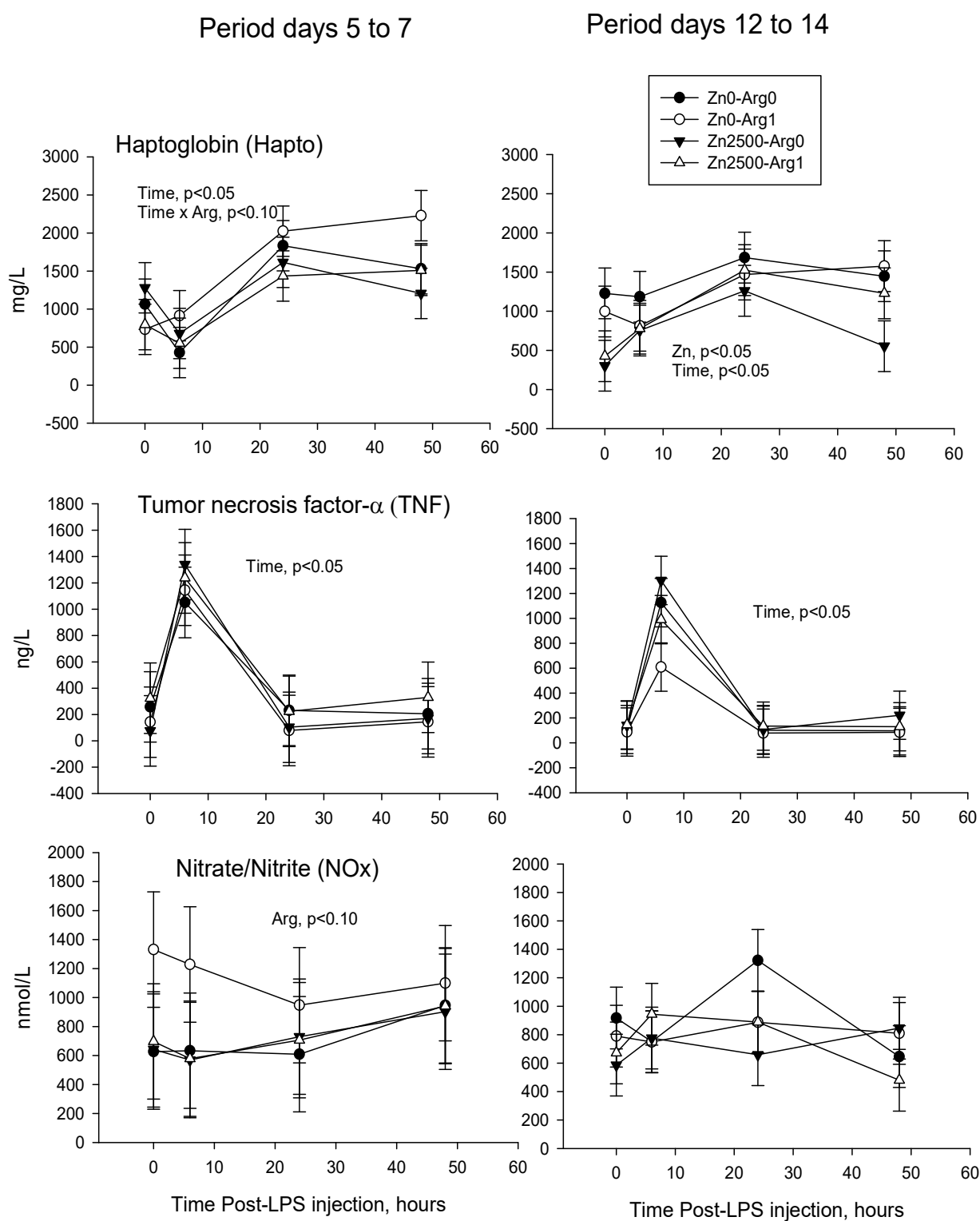


Figure 3.3 Haptoglobin (Hapto), tumor necrosis factor- α (TNF) and nitrite/nitrate (NOx) plasma concentrations of piglets fed diets supplemented or not with Zn and Arg before (0h) and after LPS injection (6h, 24h and 48h).
For days 5 to 7, $n=12$. For days 12 to 14, $n=6$.

However from days 5 to 7, Hapto concentration tended to increase more when diet was supplemented with Arg (Time x Arg, $P = 0.096$). Between days 12 and 14 only, Zn supplementation decreased Hapto concentrations (854 vs 1300 ± 324 mg L⁻¹, $P < 0.05$) during LPS challenge. The NO_x concentration tended to be increased by the Arg supplement during the LPS challenge only from days 5 to 7.

5.4 Antioxidant and oxidative status and MT mRNA expression in the ileal mucosae

The MDA concentration measured in the ileal mucosae decreased from days 5 to 14 for ZN0ARG1 and ZN2500ARG0 but increased for ZN0ARG0 and ZN2500ARG1 treatments (Zn x Arg x Day, Table 3.6, $P < 0.05$); this modification lead to lower MDA concentration in ZN0ARG1 than in ZN0ARG0 on day 14 but not on day 7 (Zn x Arg x Day, Table 3.6, $P < 0.05$). The Zn supplementation increased TAC concentration mainly on day 14 (Zn x Day effect, $P < 0.05$). The MT-1 mRNA expression was also increased by the Zn supplementation on day 14 after weaning (Zn x Day effect, $P < 0.05$). The Zn supplement tended to increase TNF mRNA expression from days 7 to 14 (Zn x Day, $P = 0.098$). The iNOS mRNA expression tended to decrease from days 7 to 14 (Day effect, $P = 0.093$) but it was not modified by Arg and Zn supplements.

6. Discussion

The goal of the present study was to investigate the effect of Zn and Arg supplements on systemic and ileal antioxidant and inflammatory status in weanling after a LPS injection to stimulate a chronic inflammatory condition.

6.1 Growth performance

The present study did not observe any growth difference as reported in previous studies (Broom et al., 2006; Bergeron et al., 2014) compare to the results of Kim et al. (2015) who showed that high Zn supplementation (2,500 mg/kg) improved growth only after a challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. It cans be explain by the fact that all the diets met the recommendation for Zn what means at least 100 mg/kg (NRC, 1998). For Arg, its role in the growth performance is also linked to level of oxidative stress. Zheng et al. (2013) tested the effect of Arg in an oxidative stress environment.

Table 3.6: Malondialdehyde (MDA) and Total antioxidant capacity (TAC) concentration and Metallothionein-1 (MT-1), Tumor necrosis factor- α (TNF) and inducible Nitric oxide synthase (iNOS) expressions in ileal mucosae 48h after LPS injection in weanling piglets fed diets supplemented or not with Zn and Arg

Treatment ¹	MDA (μ mol/g)		TAC (mmol/g)		MT-1 expression (Arbitrary unit)		TNF expression (Arbitrary unit)		iNOS (Arbitrary unit)	
	Day 7	Day 14	Day 7	Day 14	Day 7	Day 14	Day 7	Day 14	Day 7	Day 14
	n=12	n=6	n=12	n=6	n=12	n=6	n=12	n=6	n=12	n=6
ZN0ARG0	136	156 ^b	3.99	3.86 ^a	0.008 ^a	0.074 ^a	1.042	0.810	3.320	2.200
ZN0ARG1	147	89 ^a	4.19	3.39 ^a	0.012 ^a	0.039 ^a	1.460	1.000	5.154	2.234
ZN2500ARG0	200	122 ^{ab}	4.71	4.73 ^b	2.200 ^b	3.300 ^b	0.905	2.720	3.342	2.845
ZN2500ARG1	139	146 ^{ab}	4.60	4.88 ^b	0.630 ^{ab}	3.930 ^b	0.720	1.290	7.984	2.647
SEM	33		0.24		0.690		0.100		1.228	
Arg	NS		NS		NS		NS		NS	
Zn	NS		0.001		0.001		NS		NS	
Day	NS		0.048		0.028		NS		0.093	
Zn x Arg	NS		NS		NS		NS		NS	
Day x Zn	NS		0.050		0.036		0.098		NS	
Day x Arg	NS		NS		NS		NS		NS	
Day x Zn x Arg	0.050		NS		NS		NS		NS	

¹ ZN2500ARG1: control diet + 2500 mg of Zn (ZnO) + 1% Arg (n = 7); ZN2500ARG0: control diet + 2500 mg of Zn (ZnO) (n = 8); ZN0ARG1: control diet + 1% Arg (n = 8); ZN0ARG0: control diet (n = 9)

Before the injection of diquat, which increases the oxidative stress, Arg had no effect on growth performance. But after the diquat injection, the supplementation of 0.8% or 1.6% Arg in the diet improved the growth performance. In the present experimental conditions (health and hygiene status), it is possible that the dietary level of Arg is sufficient to support the growth of the weaning piglets.

6.2 *Effect of post-weaning days before the LPS injection.*

In the present study, reduced and total GSH increased and TNF decreased from days 5 to 12 suggesting a reduction of oxidative stress and systemic inflammation during this post-weaning period. However, other oxidative markers such as MDA, TAC and TOS, were not modified during this period. This effect can be explained by the post-weaning period chosen to evaluate the oxidative status. Yin et al. (2014) noted an increase of serum MDA 3 days post-weaning following by a return to a pre-weaning value at days 5 and 7 post-weaning. In fact, inflammatory and oxidative stress seems more important in first post-weaning days compared to days in second and third weeks after weaning (Sugiharto et al., 2014).

In the present experiment, Zn supplementation helped to decrease the lipid oxidation by maintaining low MDA concentration on days 5 and 12 post-weaning as previously reported by Bergeron et al. (2014). In addition to positively affect antioxidant status, high Zn supplementation seemed to act on inflammation by reducing serum Hapto 12 days after weaning.

Oxidized GSH was reduced in piglets supplemented with Arg but it had no effect on the concentration of MDA. We have to note that the analysis was made by spectrophotometer, without separated the yellow product by HPLC. It is possible that other yellow products have been created during the reaction. Ours results of MDA could be higher than what we obtained. Zheng et al. (2013) noted also no effect of dietary Arg level (0,8 vs 1,6 %) on MDA and TAC concentration in weanling pigs on day 8 post-weaning. Arg provides protection against reactive oxygen species by direct chemical interaction with O_2^- , thereby improving antioxidant status (Lass et al., 2002). The Arg supplementation can also modify

GPx activity in pigs which can alter total_oxidised GSH ratio as observed in the present study (Zheng et al., 2013).

6.3 *Effect of LPS injection*

In the present study, feed intake was only reduced during the first challenge and only in ZN0ARG1 and ZN2500ARG0 groups. These results are rather unexpected because the markers of inflammation, TNF and Hapto, increased after the injection of LPS on d 5 to 7 regardless of the Zn or Arg supplement. Frank et al. (2005) showed that the increase of blood acute-phase protein after LPS challenge is correlated to the reduced-feed intake in pigs (for 48 h post-injection) suggesting that difference observed in the present study did not depend to response of pigs to the LPS injection. Moreover, during the second period days 12 to 14, the injection of LPS did not modify the feed intake, although the challenge increased the concentrations of TNF and Hapto.

As previously noted, the TNF concentration increased significantly 6h after LPS injection for all treatments then was back at the initial level 24h after LPS injection, what is consistent with results published by Webel et al. (1997) and Myers et al. (2003). Yu et al. (2000) and Bergeron et al. (2014) noted a higher TNF concentration following LPS injection in piglets fed high Zn supplemented (2,500 mg/kg) diet. However, these last studies have observed this difference 3 h after the LPS injection. It is possible that 6 h and more after the injection, the effect of Zn would be reduced. Like to TNF, LPS injection increased the Hapto concentration in two challenge periods and the higher concentration was observed 12h after the injection as previously reported (Llamas Moya et al., 2006; Williams et al., 2009). During the second period from days 12 to 14, the high level of Zn supplement reduced the Hapto concentration suggesting that high level of Zn helped to control the inflammation caused by chronic LPS challenge.

Arg had a limited effect on NO_x concentration. Myers et al. (2003) showed that injection of LPS led to an increase in plasma NO_x 24 h after the injection in pigs. However, Poeze et al. (2011) reported that Arg administration may contribute to controlled Arg metabolism, depending on the dosage and route of supplementation and the metabolic state of the endotoxemic host. In the present experience, the fact that all treatments had the same NO_x

level could mean that the Arg level in basal diet was adequate to provide substrate for the NO_x production before and after an LPS injection.

The insignificant increase in MDA concentration suggests that LPS had a limited effect on lipid oxidative status. This result is different from this reported by Weber et al. (2014) who observed an increase of MDA following LPS injection in weanling piglets but agrees with those reported by Kang et al. (2014). For the GSH, Kadiiska et al. (2015) also noted an increase of total GSH and reduced GSH in mini pigs challenged with LPS. In the present study, although total, oxidised and reduced GSH were also increased during the first LPS challenge from days 5 to 7, the oxidised_total GSH ratio was not modified during this LPS challenge. Kadiiska et al. (2015) suggested that higher GSH concentration following LPS injection would be attributable to release of GSH from damaged hepatic cells. Moreover, a decrease TAC_TOS ratio during the two LPS challenges, from days 5 to 7 and days 12 to 14, suggests a modification of oxidant/antioxidant metabolism following the LPS injection. In previous study, Hou et al. 2014 have also noted that LPS challenge led to a reduced TAC in pigs.

The high level of Zn supplement increased the concentration of oxidized, total and reduced GSH from days 5 to 7 in first LPS challenge period. In fact, it appears that Zn supplement increases the synthesis or release of GSH in LPS challenge conditions but mainly when Arg is also added to the diet without changing the oxidized_total GSH ratio. Iszard et al. (1995) were noted that Zn injection increased hepatic GSH concentration in rats and maybe one factors involved in the Zn antioxidant protection. It is known that Arg is an essential precursor for the synthesis of NO and increased production and concentration of NO is known to cause Zn release in endothelial cells (Wiseman et al. 2006; Li et al. 2010) and then optimize the effect of Zn on GSH metabolism. However, Arg supplement did not clearly increase NO concentration in the post-LPS injection period from days 5 to 7. It is possible that NO_x concentration in the plasma is not correlated with NO synthesis in different tissues (Poeze et al., 2011). However, it cannot exclude that the effect on GSH concentration was explained by reduced feed intake observed in the piglets fed with ZN0ARG1 and ZN2500ARG0 from days 5 to 7, which may reduce the nutrient supplied for GSH synthesis (Stipanuk et al., 1992). The concentration of reduced and total GSH was

higher at day 12 than day 5, which suggests that the synthesis or release of GSH was already maximal before LPS injection on day 12 and then the effect of dietary supplements was reduced and non-significant.

Although during the period from days 12 to 14, the Arg supplement increased TOS concentration and reduced the ratio TAC_TOS but these values were restored when Zn supplement was added to the diet. The injection of LPS clearly reduced the TAC_TOS ratio from days 12 to 14 suggesting the presence of oxidative stress during the challenge. These effects of Arg on TOS value suggest an imbalance between reactive species and endogenous antioxidant defense systems (Blokhina et al., 2003). This may be due to the high protein content of our diets (25% CP) linked to the addition of Arg to the diet. A high crude protein represents a challenge for the animal metabolism. Arg is the substrate of NO synthesis which is reactive nitrogen species (RNS) and can increase oxidative stress (Valko et al., 2007). However, Arg supplement did not increase the plasma concentration of NO and therefore cannot explain the effect of Arg on TOS. However, this effect of Arg on the oxidative status during LPS challenge would be partially dependent on the Zn status because the addition of Zn restores the value of TOS and the ratio TAC_TOS and then the oxidative balance.

In intestinal mucosa, the MDA concentration in mucosa 48h after an LPS injection was reduced by Arg supplement on day 14 but only when Zn supplement was not added to diet (Day x Zn x Arg, $P < 0.05$). As mentioned previously, Arg can have an antioxidant effect by a direct interaction with O_2^- (Lass et al., 2002; Dasgupta et al., 2006). However, this effect of Arg was not associated to TAC value in mucosa and would be dependent to dietary Zn level, mucosal concentration of MDA being not reduced when two, Arg and Zn, were added to the diet.

Zinc supplementation increased both MT expression and TAC in the ileal mucosa, as we previously observed (Bergeron et al., 2014). Wang et al. (2009) observed that a Zn-supplemented diet (3,000 mg/kg) decreased oxidized GSH in the jejunal mucosa of weanling piglets, suggesting reduced oxidative stress. As it is known, MT proteins are characterized by high contents of cysteine and thiol groups. These thiol groups are known

to sequester reactive oxygen and nitrogen species, suggesting an antioxidant role for MT proteins (Formigari et al. 2007). However, this increase of TAC value in ileal mucosa did not allow controlling the lipid oxidation estimated by MDA concentration and inflammatory status evaluated by TNF and iNOS expression.

7. Conclusion

In conclusion, Zn and Arg supplements had no effect on growth performance. The results of the present study showed that antioxidant and inflammatory status improve in the days following the weaning by increasing reduced and total GSH and decreasing TNF concentration. High Zn supplementation reduced lipid oxidation and Hapto concentration during post-weaning period but these effects was not modified by Arg supplement. Injections of LPS on days 5 and 12 caused an inflammatory response and modified the antioxidant status. However, Zn and Arg supplements had limited and inconsistent effects on inflammatory and oxidative parameters during LPS challenge. At least, the results show that in a clean environment where there is no dietary deficiencies, the potential positive effects of pharmacological Zn or Arg supplements on growth performances are significantly reduced or not evident at all and need more investigations.

8. Acknowledgment

Financial support for this work was provided by a grant from the Natural Science and Engineering Research Council (NSERC) awarded to F. Guay and by a studentship from La Fédération des producteurs de porcs du Québec (FPPQ) awarded to N. Bergeron.

9. Bibliography

Association of Official Analytical Chemists (AOAC) Official methods of analysis, Arlington, VA, USA. Latimer JW, Horwitz W, editors. 2005.

Bergeron N, Robert C, Guay F. Antioxidant status and inflammatory response in weanling piglets fed diets supplemented with arginine and zinc. *Can J Animal Sci* 2014;94(1):87-97.

Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 2003;91(2):179-94.

Broom LJ, Miller HM, Kerr KG, Knapp JS. Effects of zinc oxide and *Enterococcus faecium* SF68 dietary supplementation on the performance, intestinal microbiota and immune status of weaned piglets. *Res Vet Sci* 2006;80(1):45-54.

Care, C. C. O. A. The care and use of farm animals in research, teaching and testing. CCAC., Ottawa, ON. 2009; 12-15.

Chapman JR and Waldenström J. Whit reference to reference genes: A systematic review of endogenous controls in gene expression studies. *PLoS ONE* 2015; 10 (11): e0141853.

Dasgupta T, Hebbel RP, Kaul DK. Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models. *Free Rad Biol Med* 2006;41(12):1771-80.

Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004;37(4):277-85.

Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005;38(12):1103-11.

Formigari A, Irato P, Santon A. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: Biochemical and cytochemical aspects. *Comp Biochem Physiol C* 2007;146 (4):443-59.

Frank JW, Mellencamp MA, Carroll JA, Boyd RD, Allee GL. Acute feed intake and acute-phase protein responses following a lipopolysaccharide challenge in pigs from two dam lines. *Vet Immunol Immunopatol* 2005;107(3):179-87.

Guay F, Donovan SM, Trottier NL. Biochemical and morphological developments are partially impaired in intestinal mucosa from growing pigs fed reduced-protein diets supplemented with crystalline amino acids. *J Anim Sci* 2006;84(7):1749-60.

Hou X, Zhang J, Ahmad H, Zhang H, Xu Z, Wang T. Evaluation of antioxidant activities of ampelopsin and its protective effect in lipopolysaccharide-induced oxidative stress piglets. *PloS one* 2014;9(9), e108314.

Iszard MB, Liu J, Klaassen CD. Effect of several metallothionein inducers on oxidative stress defense mechanisms in rats. *Toxicology* 1995;104(1):25-33.

Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *J Gastroen Hepatol* 2011;26:173-9.

Jain SK, McVie R, Duett J, Herbst JJ. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes* 1989;38(12):1539-43.

jae Kim S, Kwon CH., Park BC, Lee CY, Han JH. Effects of a lipid-encapsulated zinc oxide dietary supplement, on growth parameters and intestinal morphology in weanling pigs artificially infected with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Anim Sci Technol* 2015; 57(1), 4-8.

Kang P, Zhang L, Hou Y, Ding B, Yi D, Wang L, Zhu H, Liu Y, Wu G. Effects of l-proline on the growth performance, and blood parameters in Weaned Lipopolysaccharide (LPS)-challenged pigs. *Asian Australas J Anim Sci* 2014;27(8):1150-6.

Kadiiska MB, Peddada S, Herbert RA, Basu S, Hensley K, Jones DP, Mason RP. Biomarkers of oxidative stress study VI. Endogenous plasma antioxidants fail as useful biomarkers of endotoxin-induced oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 2015;81:100-6.

Lass A, Suessenbacher A, Wölkart G, Mayer B, Brunner F. Functional and analytical evidence for scavenging of oxygen radicals by L-arginine. *Molecular pharmacology* 2002;61(5): 1081-8.

Li H, Cao R, Wasserloos KJ, Bernal P, Liu Z-Q, Pitt BR, St-Croix CM. Nitric oxide and zinc homeostasis in pulmonary endothelium. *Ann NY Acad Sci* 2010;1203:73-8.

Llamas Moya S, Boyle LA, Lynch PB, Arkins S. Age-related changes in pro-inflammatory cytokines, acute phase proteins and cortisol concentrations in neonatal piglets. *Neonatology*, 2006;91(1):44-8.

Martin L, Pieper R, Schunter N, Vahjen W, Zentek J. Performance, organ zinc concentration, jejunal brush border membrane enzyme activities and mRNA expression in piglets fed with different levels of dietary zinc. *Arch Animal Nutr* 2013;67:248-61.

Maurice D, Lightsey SF, Toler JE, Canty S. Effect of chronic oxidative/corticosterone-induced stress on ascorbic acid metabolism and total antioxidant capacity in chickens (*Gallus gallus domesticus*). *J Anim Physiol Anim Nutr* 2007;91(2):355-60.

Michel F, Bonnefont-Rousselot D, Mas E, Draï J, Thérond P. Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques. *Ann Biol Clin* 2008;66(6):605-20.

Myers MJ, Dorothy DE, Palmer DC, Post LO. Inflammatory mediator production in swine following endotoxin challenge with or without co-administration of dexamethasone. *Int Immunopharmacol* 2003;3(4):571-9.

NRC. Nutrient Requirements of Swine: Eleventh Revised Edition. 1998. Washington, DC: The National Academies Press.

Nygard AB, Jørgensen CB, Cirera S, Fredholm M. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Mol Biol* 2007; 8(1): 67.

Petersen HH, Nielsen JP, Heegard PMH. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res* 2004;35(2):163-87.

Pié S, Lallès JP, Blazy F, Laffitte J, Sève B, Oswald IP. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *J Nutr* 2004;134(3):641-7.

Poeze M, Bruins MJ, Kessels F, Luiking YC, Lamers WH, Deutz NEP. Effects of L-arginine pretreatment on nitric oxide metabolism and hepatosplanchnic perfusion during porcine endotoxemia. *Am J Clin Nut* 2011;93(6):1237-47.

Rakhshandeh A, de Lange CFM. Evaluation of chronic immune system stimulation models in growing pigs. *Animal* 2012;6(2):305-10.

Robert F, Bebin K, Garrau JM, Gueriot JF, Foret R, Brack M, Garrel C. Evaluation et correction du stress oxydatif du porcelet en post-sevrage. *Journ Recher Porcine France* 2009;41:173-8.

Sauerwein H, Schmitz S, Hiss S. The acute phase protein haptoglobin and its relation to oxidative status in piglets undergoing weaning-induced stress. *Redox Report* 2005;10(6):295-302.

Stipanuk MH, Coloso RM, Garcia RA, Banks MF. Cysteine concentration regulates cysteine metabolism to glutathione, sulfate and taurine in rat hepatocytes. *J Nutr* 1992;122(3):420-7.

Stokes CR, Bailey M, Haverson K, Harris C, Jones P, Inman C, Pié S, Oswald IP, Williams BA, Akkermans ADL, Sowa E, Rothkötter HJ, Miller BG. Postnatal development of intestinal immune system in piglets: implications for the process of weaning. *Anim Res* 2004;53(4):325–34.

Sugiharto S, Hedemann MS, Lauridsen C. Plasma metabolomic profiles and immune responses of piglets after weaning and challenge with *E. coli*. *J Anim Sci Biotechnol* 2014;5(1):17.

Tizard IR. *Veterinary Immunology: An Introduction*. Saunders, Philadelphia. 2004.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(1):44–84.

Wang X, Ou D, Yin J, Wu G, Wang J. Proteomic analysis reveals altered expression of proteins related to glutathione metabolism and apoptosis in the small intestine of zinc oxide-supplemented piglets. *Amino Acids* 2009;37(1):209-18.

Webel DM, Finck BN, Baker DH, Johnson RW. Time course of increased plasma cytokines, cortisol, and urea nitrogen in pigs following intraperitoneal injection of lipopolysaccharide. *J Anim Sci* 1997;75(6):1514-20.

Weber TE, van Sambeek DM, Gabler NK, Kerr BJ, Moreland S, Johal S, Edmonds MS. Effects of dietary humic and butyric acid on growth performance and response to lipopolysaccharide in young pigs. *J Anim Sci* 2014;92(9):4172-9.

Williams PN, Collier CT, Carroll JA, Welsh TH, Laurenz JC. Temporal pattern and effect of sex on lipopolysaccharide-induced stress hormone and cytokine response in pigs. *Domest Anim Endocrinol* 2009;37(3):139-47.

Wiseman DA, Wells SM, Wilham J, Hubbard M, Welker JE, Black SM. Endothelial response to stress from exogenous Zn²⁺ resembles that of NO-mediated nitrosative stress, and is protected by MT-1 overexpression. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;291(3):555-68.

Wu X, Ruan Z, Gao Y, Yin Y, Zhou X, Wang L, Geng M, Hou Y, Wu G. Dietary supplementation with L-arginine or N-carbamylglutamate enhances intestinal growth and heat shock protein-70 expression in weanling pigs fed a corn- and soybean meal-based diet. *Amino Acids* 2010;39:831-9.

Yao K, Guan S, Li T, Huang R, Wu G, Ruan Z, Yin Y. Dietary L-arginine supplementation enhances intestinal development and expression of vascular endothelial growth factor in weanling piglets. *Brit J Nutr* 2011;105(5):703-9.

Yen J. Anatomy of the digestive system and nutritional physiology. In: A. J. Lewis, L. L. Southern (eds), *Swine Nutrition*. CRC Press, Florida, USA, pp. 32. 2001.

Yin J, Wu MM, Xiao H, Ren WK, Duan JL, Yang G, Li TJ, Yin YL. Development of an antioxidant system after early weaning in piglets. *J Anim Sci* 2014;92(2):612-9.

Yu IT, Lin J, Lee DN. Effect of various levels of zinc and copper in diet on growth and immune responses of weaning pigs. *Asian-Aus J Anim Sci* 2000;13 A(Suppl): 81.

Zheng P, Yu B, He J, Tian G, Luo Y, Mao X, Zhang K, Che L, Chen D. Protective effects of dietary arginine supplementation against oxidative stress in weaned piglets. *Brit J Nutr* 2013;109(12):2253-60.

Zhu LH, Zhao KL, Chen XL, Xu JX. Impact of weaning and an antioxidant blend on intestinal barrier function and antioxidant status in pigs. *J Anim Sci* 2012;90 (8):2581-9

CHAPITRE 4 - IMPACT OF ZINC AND ARGININE ON ANTIOXIDANT STATUS IN WEANING PIGLETS RAISED UNDER COMMERCIAL CONDITIONS

Nadia Bergeron and Frédéric Guay

Department of Animal Science, Université Laval, Québec, Québec, Canada G1V 0A6.

Article soumis le 21 novembre 2018 au Animal Nutrition.

Key words: zinc, arginine, weanling piglets, antioxidant status, growth performance

1. Résumé

Dans cette étude, nous avons étudié les effets de dose élevées de ZnO et d'un supplément d'Arg sur la capacité antioxydante et le statut oxydatif des porcelets récemment sevrés élevés dans des conditions commerciales. Des porcelets âgés de 21 jours ont été alimentés pendant 15 jours avec une ration supplémentée avec ou sans 2 500 mg de ZnO et 1% de Arg. Les porcelets ont été attribués à l'un des quatre traitements alimentaires dans un dispositif en blocs complets aléatoires basé sur le poids initial des porcelets. Les échantillons sanguins ont été prélevés sur les mêmes deux porcelets dans chacun des parcs avant l'alimentation du matin au jour 8 et 15. L'ajout de Zn augmente le gain moyen quotidien entre les jours 0 et 7, 7 et 15 et pour la période expérimentale complète (0,289 vs 0,217 kg/j), la consommation moyenne quotidienne entre les jours 0 et 7, 7 et 15 et pour la période expérimentale complète (0,338 vs 0,279 kg/j) et également le ratio gain : consommation entre les jours 0 et 7 et pour la période expérimentale complète (0,860 vs 0,777) ($P < 0,001$). Les deux suppléments ont diminué significativement la concentration en malondialdéhyde (Zn: 4,37 vs 3,91, $P < 0,005$; Arg: 4,38 vs 3,89 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0,002$). La capacité antioxydante totale et la le glutathion réduit ont augmenté entre le jour 8 et 15 (0,953 vs 1,391 $\mu\text{mol/L}$, 3,37 vs 2,22 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0,05$) sans égard au traitement alimentaire. Au jour 8, les concentrations de glutathion total et oxydée étaient plus élevées quand l'Arg et le Zn étaient ajoutés tous les deux comparativement à lorsqu'ils étaient ajoutés seuls (Zn x Arg interaction $P < 0,01$). Les porcelets ayant été nourris avec la ration élevée en Zn avaient un taux sérique d'haptoglobine plus bas que ceux nourris sans l'ajout de Zn (509,5 vs 1417,6 mg/L; $P < 0,001$). En conclusion, la ration avec une dose élevée en Zn améliore les performances de croissance des porcelets et le statut oxydatif en diminuant la concentration de malondialdéhyde. L'ajout d'Arg a eu un effet limité sur les performances de croissance en conditions commerciales.

2. Abstract

The effects of dietary zinc and L-arginine supplements on the weight gain, feed efficiency, antioxidant capacity and oxidative status of weanling piglets raised under commercial conditions were examined. Animals aged 21 days were fed for 15 days a diet supplemented or not with 2,500 mg/kg of zinc (provided as ZnO) and 1% L-arginine hydrochloride. The four treatments were distributed in a randomized complete block design with six initial body weight categories (12 animals per pen). Access to feed and water was ad libitum. Data were analyzed as a 2 x 2 factorial experiment using the SAS MIXED procedure, with zinc and arginine as the main independent variables. Blood collection day (8 and 15, from the same two piglets in each pen before the morning feeding) was included as a third factor. The zinc supplement increased the average daily gain (ADG) over days 0 to 7, 8 to 15 and 0 to 15 (0.289 vs 0.217 kg/d), average daily feed intake (ADFI) from days 0 to 7, days 8 to 15 and 0 to 15 (0.338 vs 0.279 kg/d) and the ADG:ADFI ratio from days 0 to 7 and 0 to 15 (0.860 vs 0.77) ($P < 0.001$). Both supplements decreased the malondialdehyde concentration significantly (zinc: 4.37 vs 3.91, $P < 0.005$; arginine: 4.38 vs 3.89 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.002$). Total antioxidant capacity and reduced glutathione increased from days 8 to 15 (0.953 vs 1.391 $\mu\text{mol/L}$, 2.22 vs 3.37 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$) regardless of dietary treatment. Total and oxidized glutathione concentrations on day 8 were higher in response to the combined supplements (zinc x arginine interaction $P < 0.01$). Piglets fed either Zn-supplemented diet had a lower haptoglobin serum concentration (509 vs 1417 mg/L; $P < 0.001$). In conclusion, the zinc supplement improved piglet growth performance (ADG and ADFI) and oxidative status (based on MDA concentration). The arginine supplement had a limited effect on growth performance and oxidative status under these conditions.

3. Introduction

When piglets are raised under conditions described as natural, the process of weaning begins at 10 days and ends at 4 months (Jensen and Recén, 1989; Jensen and Stangel, 1992). This normally involves a gradual reduction in milk intake and increase in water and solid (cereal-based) feed intake. In contrast, weaning under commercial conditions begins at about 3 to 4 weeks of age, when the piglets are separated from the sow and moved to pens shared with unfamiliar cohorts. This abrupt change in diet, ambient sounds and social environment causes the animal to experience increased systemic inflammation and over-expression of pro-inflammatory cytokines in intestinal tissues (Pié et al., 2004). Haptoglobin, a protein marker of acute-phase inflammation, also increases in piglets weaned in this manner (Petersen et al., 2004; Sauerwein et al., 2005), as do other signs of systemic and intestinal oxidative stress associated with or caused by the increased inflammation (Sauerwein et al., 2005; Zhu et al., 2012; Yin et al., 2014). Oxidative stress is an unbalanced equilibrium between reactive oxygen species (ROS) production and the antioxidant system of the animal, resulting in an increase in oxidation products such as malondialdehyde, an indicator of oxidative stress (Jaeschke, 2011).

Numerous experiments have shown that feeding pharmacological doses of zinc (2,000–3,000 mg/kg) to weaning piglets improves growth performance and reduces diarrhea (reviewed by Sales, 2013). Other studies have shown that L-arginine supplements (0.5 to 1% of the dry feed) improve growth and feed efficiency in weaned piglets (Tan et al. 2009; Wu et al. 2010; Yao et al. 2011). Arginine is known as an essential precursor for the synthesis of nitric oxide, a key mediator in several physiological functions. Increased production and concentration of nitric oxide is known to cause Zn release in endothelial cells and to increase metallothionein expression (Wiseman et al. 2006; Li et al. 2010). Metallothioneins are Zn-storing sulfo-proteins involved in Zn homeostasis and have significant antioxidant properties (Formigari et al. 2007). In two previous studies, we noted that zinc supplementation (2,500 mg/kg) reduced plasma malondialdehyde concentration in weaned piglets (Bergeron et al. 2014; 2017). We also observed that it improved antioxidant status under conditions of lipopolysaccharide-induced stress, especially when the diet included an arginine supplement (Bergeron et al., 2014). However, no zinc–arginine

interaction was observed under conditions of chronic lipopolysaccharide-induced inflammation and oxidative stress (Bergeron et al., 2017).

It is known that deteriorating sanitary conditions in the breeding environment affect the antioxidant status of piglets, which can be measured in terms of decreased plasma glutathione and increased plasma haptoglobin (Le Floch et al. 2006; Pastorelli et al., 2012a;b). At research stations, injections of lipopolysaccharide are used to activate the immune system and cause oxidative stress (Yi et al., 2016). However, the physiological conditions induced by such injections do not mimic entirely the alterations of immune system and antioxidant status that occur in conventional pig production facilities (Le Floch et al. 2006).

The objective of this study was to determine the impact of dietary arginine and zinc supplements on antioxidant and inflammatory status in weanling piglets raised in a conventional pig production facility. Our hypothesis is that this status should improve under the supplemented condition and lead to better growth performance.

4. Material and methods

4.1 Animals and housing

The experiment was carried out with 288 piglets (Génétiporc Fertilis 25 x Génétiporc G Performer 6.0, St-Bernard, Qc, Canada) obtained from 26 litters born in a conventional pig production facility (St-Anselme, Québec, Canada). The animals were weaned at the age of 21 days then moved to 1.62 m x 1.82 m pens such that each housed 12 piglets of similar body weight. The six initial weight categories were 2 low (5.0-6.0 kg), 2 medium (6.0-7.0) and 2 high (>7.0) bodyweight. Each pen was equipped with a self-feeder (4-hole space feeder) and a watering nipple. The room temperature was initially 26°C then decreased by 0.5°C each day down to 22°C, where it was maintained until the end of experiment. All animal procedures were conducted according to the guidelines set by the Canadian Council on Animal Care (2009), and the experimental protocol received approval from the Université Laval animal use and care committee. The health status of the pig farm was

rated as stable but positive for exposure to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), Circovirus-2, and *Mycoplasma hyopneumoniae*.

4.2 *Experimental Design and Diets*

The feeding experiment was begun on day 0 (distribution of the piglets to the pens). Formulated to meet or exceed NRC recommendations (2012) for piglets, the four dietary treatments (Table 4.1) were designated as follows: **ZN0ARG0** or control, **ZN2500ARG0** (supplemented with 2,500 mg Zn per kg in the form of zinc oxide), **ZN0ARG1** (supplemented with 10.0 g of arginine in the form of L-arginine HCl) and **ZN2500ARG1** (containing both supplements). The treatments were distributed throughout the room and to each of the six weight categories according to a randomized complete block design. Feed and water were provided *ad libitum*. The piglets and uneaten feed in each pen were weighed each day.

4.3 *Blood Samples*

Two piglets are randomly selected from the 12 of the each pen for blood sampling. Blood was collected by jugular venipuncture into two Vacutainer tubes (one containing EDTA and heparin for plasma and one empty for serum) before the morning feeding on days 0, 8 and 15. Feeders were emptied four hours before sampling to uniformize piglet nutrient status. Samples were centrifuged at 2,000 x g for 15 min at 4°C to obtain plasma and serum, which were frozen at -80°C for analysis.

4.4 *Biochemical Analysis*

Malondialdehyde generation was measured in plasma according to the method of Jain et al. (1989) as an index of systemic lipid peroxidation and oxidative status (Michel et al., 2008). Phosphate-buffered saline (800 µL, pH 7.4) and butylated hydroxytoluene solution (25 µL, 0.88%) were mixed thoroughly with 200 µL of plasma. Trichloroacetic acid (500 µL, 30%) was added, and the samples were placed on ice for 2 h.

Table 4.1: Composition of experimental diets (as fed)

	ZN0ARG0	ZN2500ARG0	ZN0ARG1	ZN2500ARG1
Ingredients ^a	% of total diet			
Ground corn	31.5	31.5	31.5	31.5
Soybean meal	22.5	22.5	22.5	22.5
Whey powder	20.0	20.0	20.0	20.0
Hamlet Protein 300	9.5	9.5	9.5	9.5
Choice fat	5.0	5.0	5.0	5.0
Spray-dried animal plasma	3.5	3.5	3.5	3.5
Blood meal	2.5	2.5	2.5	2.5
Limestone	1.1	1.1	1.1	1.1
Di-calcium phosphate	1.0	1.0	1.0	1.0
Sodium chloride	0.3	0.3	0.3	0.3
Vitamins mix ¹	0.25	0.25	0.25	0.25
Minerals mix ²	0.25	0.25	0.25	0.25
Lysine HCl	0.25	0.25	0.25	0.25
DL-methionine	0.15	0.15	0.15	0.15
L-threonine	0.10	0.10	0.10	0.10
Corn starch	0.40	---	1.1	0.70
Zinc oxide	---	0.40	---	0.40
L-arginine-HCl	---	---	1.00	1.00
L-alanine	1.70	1.70	---	---
<i>Analysed nutrient composition, %</i>				
ME; MJ/kg	18.67	18.72	18.68	18.69
CP, %	25.18	24.49	24.77	24.81
Calcium, %	0.78	0.78	0.73	0.77
Phosphorus, %	0.58	0.61	0.53	0.57
Zinc, mg/kg	134	2,224	123	2,342
Total lysine, %	1.69	1.65	1.67	1.67
Total arginine, %	1.52	1.49	2.30	2.31
<i>Calculated nutrient composition³</i>				
Digestible lysine, %	1.89	1.89	1.89	1.89
Digestible arginine, %	1.65	1.65	2.45	2.45

¹Provided per kilogram of diet: vitamin A palmitate 5,000 IU; vitamin D₃ 1,000 IU; vitamin E acetate 22.5

IU; menadione sodium bisulfite 3.75 mg; thiamin HCl 1.0 mg; riboflavin 4.5 mg; niacin 20.0 mg; calcium pantothenate 25.0 mg; pyridoxine HCl 1.5 mg; biotin 0.2 mg; choline bitartrate 375 mg; vitamin B₁₂ 25.0 µg

²Provided per kilogram of diet: Zn (as carbonate) 100 mg; Fe (as ferric citrate) 100 mg; Cu (as cupric carbonate) 25 mg; I (as potassium iodate) 0.28 mg; Mn (as manganous carbonate) 46 mg; Se (as sodium selenite) 0.30 mg.³Values for nutritional composition were calculated according to Sauvant et al. (2004)

After 15 min of centrifugation at 2,000 x g, 1 mL of supernatant was mixed with 75 μ L of 0.1 M EDTA and 250 μ L of 1% thiobarbituric acid in 0.05 M NaOH. The samples were then placed in boiling water (100°C) for 15 min, followed by cooling to room temperature. Absorbance was measured at 532 nm. Intra-assay and inter-assay CV values were respectively 6.0% and 5.5%.

The total antioxidant capacity (TAC) of plasma was assayed according to the methods of Erel (2004) and Maurice et al. (2007), which measure the concentration of antioxidants including vitamin C, vitamin E, glutathione, polyphenols and protein thiol groups (Erel, 2004). The intra-assay and inter-assay CV values were respectively 2.5% and 3.0%.

Serum total oxidant status (TOS), which is related linearly to the molar concentration of strong oxidizers (hydrogen peroxide, cumene hydroperoxide, tert-butyl hydroperoxide) was assayed according to the method of Erel (2005). The intra-assay and inter-assay CV values were respectively 2.0% and 3.5%.

Reduced and total glutathione (GSH) in plasma was determined using the fluorescent detection kit K006-F5 (Arbor Assays, Ann Arbor, USA) according to the manufacturer's instructions. The intra-assay and inter-assay CV values were respectively 3.7% and 9.1% for reduced GSH and 3.6% and 10.0% for total GSH. The difference between total and reduced GSH was presumed to be oxidized glutathione (disulfide-linked GSSG).

Serum haptoglobin was determined using the Pig Haptoglobin ELISA kit KT-349 (Kamiya Biomedical Company, Seattle, USA) according to the manufacturer's instructions. The intra-assay and inter-assay CV values were respectively 5.0% and 6.2%.

Plasma zinc concentration was determined using the QuantiChrom™ Zinc Assay Kit DIZN-250 (BioAssay Systems, Hayward, USA).

4.5 *Feed analysis*

Feed samples were ground in a sample mill (Cyloctec 1093, Foss Tecator, Sweden). Feed energy content was measured using a bomb calorimeter (Parr Instruments Co., Moline, IL, USA). Nitrogen content was determined according to the combustion method using the Leco Nitrogen Determinator (model TruSpec v1.10, Leco, MI, USA). The mineral contents (P, Ca, and Zn) were determined using AOAC methods (procedures 985.01, 2005 version). The same samples were then analyzed with a spectroscope (Optima 4300DV ICP-OES, Perkin Elmer, MA, USA). Lysine and arginine contents were determined by HPLC (Waters HPLC system, Waters Corporation, MA, USA) as described by Guay et al. (2006).

4.6 *Statistical Analysis*

Results were analyzed as a 2 x 2 factorial experiment in a randomized complete block design (initial body weight category) with zinc and arginine supplementation as the main independent variables. The SAS MIXED procedure (SAS inst. Inc. Cary, NC) was used. Treatment means and interactions were calculated for malondialdehyde, TAC, TOS, zinc, glutathione (reduced, oxidized and total), haptoglobin and growth performance (ADG, ADFI and G:F ratio). The model was: $Y_{ijk} = \mu + B_i + F_j + G_k + BF_{ij} + BG_{ik} + FG_{jk} + BFG_{ijk} + e_{ijk}$, where Y_{ijk} = dependent variable, B_i = zinc factor, F_j = arginine factor, G_k = day of blood sampling and e_{ijk} = residual error. For each analysis, the pen was considered as the experimental unit. Differences were considered significant at $P < 0.05$, while tendency refers to $0.05 < P < 0.10$. For parameters measured in plasma and serum, the baseline value (at day 0) was added as a covariable in all statistical models.

5. Results

5.1 *Growth Performance*

As expected, zinc supplementation had a positive impact on the growth performance of piglets raised under commercial conditions (Table 4.2). It was associated with a higher ADG and G:F during the 15-day post-weaning period ($P < 0.05$, Table 4.2). These piglets also had a significantly higher ADFI ($P < 0.001$) during the second week and for the 15 days overall.

Arginine supplementation tended to reduce ADG ($P = 0.091$, Table 4.2) during the second week and over the 15 days ($P = 0.10$). There was also a tendency for lower ADFI during the second week ($P = 0.108$). For the 15-day period overall, this supplement was associated with an ADFI reduced by 5% ($P = 0.172$). There was no significant effect of arginine on the G:F ratio.

5.2 *Antioxidant and oxidative status*

The average concentration of plasma malondialdehyde was reduced from 4.37 $\mu\text{mol/L}$ to 3.91 $\mu\text{mol/L}$ by zinc ($P < 0.005$) and from 4.38 $\mu\text{mol/L}$ to 3.89 $\mu\text{mol/L}$ by arginine ($P < 0.002$), as measured on days 8 and 15 (Table 4.3). In contrast, neither supplement had any effect on serum TAC or TOS during the same period. However, TAC averaged for all four treatments increased from 119.1 $\mu\text{mol/L}$ on day 8 to 173.9 $\mu\text{mol/L}$ on day 15 ($P < 0.003$), and TAC/TOS ratio did likewise, from 19.7 $\mu\text{mol/L}$ to 35.3 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.044$). The zinc supplement tended to increase the TAC/TOS ratio, but only in the presence of the arginine supplement (zinc x arginine, $P < 0.091$). As expected, the average concentration of plasma Zn measured on days 8 and 15 was higher in piglets fed Zn-supplemented diets ($P < 0.001$). However, the increase was more pronounced when the piglets also received the arginine supplement (zinc x arginine, $P < 0.042$) and tended to be greater on day 15 than on day 8 (day x zinc, $P < 0.099$). The presumed average daily increase in plasma Zn was 0.29 $\mu\text{mol/L/d}$ in piglets fed the Zn-supplemented diet versus 0.15 $\mu\text{mol/L/d}$ in those fed the control diet.

The combined supplement (treatment ZN2500ARG1) increased the total glutathione concentration measured in plasma on day 8 but not on day 15 (Table 4.4, day x zinc x arginine, $P < 0.017$), while no effect could be attributed to either supplement alone. The reduced glutathione concentration was not affected by either supplement, although the average for all four treatments increased from 2.22 $\mu\text{mol/L}$ on day 8 to 3.37 $\mu\text{mol/L}$ on day 15 ($P < 0.001$). The GSSH to total GSH ratio was affected by arginine as measured on day 15 but not on day 8 (day x zinc x arginine, $P < 0.001$). The apparent differences between the arginine, zinc and combined treatments on day 15 are not significant. However, the

Table 4.2: Average daily gain (ADG), average daily feed intake (ADFI) and gain feed ratio (G:F) of weaning piglets fed a diet with or without zinc and /or arginine supplementation under commercial conditions.

Treatment ¹	ADG, g/d			ADFI, g/d			G:F ratio		
	0-7	7-15	0-15	0-7	7-15	0-15	0-7	7-15	0-15
ZN0ARG0	0.159	0.290	0.231	0.193	0.378	0.294	0.821	0.768	0.783
ZN0ARG1	0.130	0.267	0.209	0.181	0.344	0.269	0.761	0.778	0.771
ZN2500ARG0	0.190	0.379	0.294	0.193	0.462	0.340	0.986	0.822	0.865
ZN2500ARG1	0.198	0.357	0.285	0.200	0.446	0.335	0.995	0.801	0.854
SEM	0.015	0.026	0.019	0.019	0.022	0.022	0.046	0.018	0.015
Zn	0.001	<0.001	<0.001	NS	<.0001	<.001	<0.001	0.019	<0.001
Arg	NS	0.091	0.100	NS	0.108	NS	NS	NS	NS
Zn*Arg	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Weight	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

¹ ZN0ARG0 = control diet (n = 12) ; ZN2500ARG0 = control diet + 2,500mg of ZnO (n = 12) ; ZN0ARG1 = control diet + 1% Arg (n = 12) ; ZN2500ARG1 = control diet + 2,500mg of ZnO + 1% Arg (n = 12).

Table 4.3: Plasma malondyaldehyde, total antioxidant capacity (TAC), total oxidant capacity (TOS), TAC:TOS ratio and zinc concentration on days 8 and 15 in piglets fed diets with or without zinc and/or arginine supplementation

Treatment ¹	Malondialdehyde μmol/L		TAC μmol/L		TOS μmol/L		TAC/TOS ratio		Zinc μmol/L	
	Day 8	Day 15	Day 8	Day 15	Day 8	Day 15	Day 8	Day 15	Day 8	Day 15
ZN0ARG0	4.59	4.66	123.5	198.4	20.3	7.3	13.0	44.8	2.34	3.49
ZN0ARG1	4.09	4.14	70.5	158.3	12.2	18.9	19.3	18.6	2.26	3.25
ZN2500ARG0	4.16	4.16	149.6	152.5	37.4	7.1	12.1	30.8	5.42	7.89
ZN2500ARG1	4.15	3.21	132.8	186.2	25.4	10.4	34.4	46.8	6.97	8.62
SEM	0.33		29.1		9.7		8.9		0.58	
Arg	0.002		NS		NS		NS		NS	
Zn	0.005		NS		NS		NS		<0.001	
Day	NS		0.003		NS		0.044		<0.001	
Zn x Arg	NS		NS		NS		0.091		0.042	
Day x Zn	NS		NS		NS		NS		0.099	
Day x Arg	NS		NS		NS		NS		NS	
Day x Zn x Arg	NS		NS		NS		NS		NS	

¹ ZN0ARG0 = control diet (n = 12) ; ZN2500ARG0 = control diet + 2,500mg of ZnO (n = 12) ; ZN0ARG1 = control diet + 1% Arg (n = 12) ; ZN2500ARG1 = control diet + 2,500mg of ZnO + 1% Arg (n = 12).

Table 4.4: Plasma reduced glutathione, total glutathione, oxidized glutathione and serum haptoglobin concentrations on days 8 and 15 post-weaning in piglets fed a diet with or without zinc and/or arginine supplementation

Treatment ¹	Glutathione μmol/L		GSH + GSSG μmol/L		GSSG, μmol/L		GSSG/ GSH + GSSG		haptoglobin mg/L	
	Day 8	Day 15	Day 8	Day 15	Day 8	Day 15	Day 8	Day 15	Day 8	Day 15
ZN0ARG0	2.27	3.60	4.19 ^{abc}	4.37	1.04 ^b	0.46	0.234	0.087 ^a	1715.2	1359.1
ZN0ARG1	2.01	2.87	3.42 ^{ab}	4.56	0.67 ^a	0.84	0.202	0.195 ^b	1303.2	1292.7
ZN2500ARG0	1.66	3.50	2.57 ^a	4.88	0.41 ^a	0.72	0.141	0.134 ^{ab}	768.6	572.4
ZN2500ARG1	2.96	3.49	5.42 ^c	4.36	1.20 ^b	0.40	0.224	0.103 ^{ab}	376.7	320.0
SEM	0.55		0.55		0.24		0.052		244.6	
Arg	NS		NS		NS		NS		0.081	
Zn	NS		NS		NS		NS		<0.001	
Day	<0.001		NS		0.068		<0.001		NS	
Zn x Arg	NS		NS		NS		NS		NS	
Day x Zn	NS		NS		NS		NS		NS	
Day x Arg	NS		NS		NS		NS		NS	
Day x Zn x Arg	NS		0.017		<0.001		0.002		NS	

¹ ZN0ARG0 = control diet (n = 12) ; ZN2500ARG0 = control diet + 2,500mg of ZnO (n = 12) ; ZN0ARG1 = control diet + 1% Arg (n = 12) ; ZN2500ARG1 = control diet + 2,500mg of ZnO + 1% Arg (n = 12).

ratio averaged over the four treatments decreased from 0.201 on day 8 to 0.130 on day 15 ($P < 0.001$).

Finally, the zinc supplement had the effect of lowering the serum concentration of haptoglobin ($P < 0.001$), while the arginine supplement only tended to do so on day 8 ($P = 0.081$). In spite of what the values suggest, there was no interaction between zinc and arginine.

6. Discussion

6.1 Growth performance

The objective of this study was to determine the impact of zinc and arginine dietary supplements on the growth performance and antioxidant and oxidative status of weanling piglets raised in a commercial pig production facility. The farm where the experiment was conducted was positive for known pathogens including Circovirus-2, PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae*, which could affect the immune and antioxidant responses (Krakowka et al., 2001).

In the present study, the zinc supplement had a positive impact on ADFI and ADG and increased the G:F ratio. Supplementing the weanling piglet diet with 2,500-3,000 mg/kg of Zn in the form of zinc oxide is known to improve growth performance and reduce the incidence of diarrhea (reviewed by Sales, 2013). However, in previous studies conducted under good sanitary conditions, such supplementation has been found not to have any effect on growth performance, even in conjunction with lipopolysaccharide challenge of the immune system (Bergeron et al., 2014; 2017). Other growth promoters (antibiotics and spray-dried animal plasma) are known to be more effective at improving piglet growth and health under poor sanitary conditions (inadequate pen maintenance, high microbiological loads) in commercial settings (Williams et al., 1997).

In contrast, the arginine supplement tended to reduce ADG and ADFI. Studies have shown that such supplements (0.5% to 1% for totals of 1.64% to 2.14% arginine) improve growth

and feed efficiency and enhance small intestinal growth in weanling piglets (Wu et al. 2009; Wu et al. 2010; Yao et al. 2011). However, Chen et al. (2012) and Zhan et al. (2008) found no effect of 0.5% to 1.2% added arginine (for totals of 1.52% to 2.14%) on ADG and ADFI. Zhan et al. (2008) suggest that 1.2% added arginine could lead to an amino acid imbalance by lowering the lysine to arginine ratio from 2.30 to 0.93. These authors observed a significant reduction in the plasma lysine concentration under this condition. In our experiment, the supplement raised the total arginine concentration to 2.45% and lowered the lysine/arginine ratio to 0.77. This lower ratio might explain the reduced growth performance. Since lysine and arginine share certain chemical properties, excess dietary arginine could increase the requirement for lysine, as has been observed in chicks (O'Dell and Savage 1966).

6.2 *Antioxidant and oxidative status*

Weaning is well known to decrease antioxidant status and increase oxidative stress in piglets as measured in plasma and the intestinal mucosa (Zhu et al., 2012; Yin et al., 2014). We found increases in TAC and total glutathione and decreased GSSG/total glutathione ratio from days 8 to 15, suggesting a lowering of oxidative stress. The plasma Zn concentration increased during this post-weaning period, suggesting an improvement in Zn status and corroborating at least one study (Carlson et al., 2007). In another study, weaning itself was associated with a reduction in plasma Zn (Davin et al., 2013).

Although neither zinc nor arginine had any impact on glutathione overall (reduced, total or GSSG) or TAC values, both supplements reduced malondialdehyde concentration. Zinc supplementation of the piglet diet has been found to decrease plasma malondialdehyde measured 8 or 15 days after weaning (Bergeron et al., 2014; 2017) and to increase blood total superoxide dismutase activity measured 14 and 28 days after weaning (Zhu et al., 2017), although this latter effect was not observed in a similar previous study (Bergeron et al., 2014). Zinc is known as an essential co-factor for the function of CuZn-superoxide-dismutase (SOD), which catalyzes the dismutation of superoxide anion O_2^- to H_2O_2 and is stimulated during periods of oxidative stress (Fukai and Ushio-Fukai 2011). Increased zinc intake also elevates levels of MT1 in tissues and plasma in weanling piglets (Martinez et al. 2004; 2005; Bergeron et al. 2014; 2017). The Zn-containing sulpho-protein MT1 is

involved in Zn homeostasis and has a significant antioxidant function (Formigari et al. 2007). Previous studies have shown no effect of increased dietary arginine (0.8% to 1.6%) on malondialdehyde concentration in piglets 8 days after weaning (Zheng et al., 2013; Bergeron et al., 2014, 2017). A similar arginine supplement has been found to have a positive effect on antioxidant status measured as ferric reduction by plasma in lipopolysaccharide-challenged piglets (Bergeron et al., 2014) and on the total antioxidant capacity value measured in the plasma and liver of weanling piglets injected with diquat to induce oxidative stress (Zheng et al., 2012). Arginine could provide protection against reactive oxygen species by direct chemical interaction with $\cdot\text{O}_2^-$, thereby improving antioxidant status (Lass et al. 2002).

Although the present results show overall that zinc and arginine supplements did not modify glutathione metabolism or TAC value, either supplement alone (but not the combination) did decrease total glutathione and GSSG on day 8. Combined zinc and arginine supplementation in conjunction with LPS injection five days after weaning has been found to increase total glutathione and GSH concentrations in plasma (Bergeron et al., 2017). Zinc injections have been shown to increase the concentration of GSH in the liver of rats (Iszard et al., 1995). Increased hepatic concentrations of GSSG in piglets fed diets supplemented with 0.5% or 1% arginine have been noted after injection of lipopolysaccharide (Li et al., 2012). However, there is no obvious explanation of how arginine or zinc increase the release or synthesis of glutathione. It is possible that by stimulating nitric oxide synthesis (Poeze et al., 2011), an arginine supplement acts on glutathione metabolism through the release of Zn from the protein MT-1 (Wiseman et al. 2006; Li et al. 2010). In the present study, zinc supplementation increased plasma Zn concentration as expected and observed previously (Walk et al., 2015), but the effect was enhanced by the arginine supplement, suggesting either a release of Zn from tissues or better intestinal absorption of Zn.

In addition to improving oxidative status in weanling piglets, the dietary zinc supplement appeared to act on inflammation by reducing serum haptoglobin. This may prevent the inflammation induced by weaning from reaching the acute phase (Peterson et al., 2004; Sauerwein et al., 2005). Reduced haptoglobin concentrations have been observed in a study

of piglets fed a zinc-supplemented diet and challenged with lipopolysaccharide 12 days after weaning (Bergeron et al., 2017). It has been observed also that IL10, a known anti-inflammatory factor (Kubo and Motomura, 2012), is overexpressed (based on mRNA) in the mucosa of the ileum of weanling piglets fed a Zn-supplemented diet (Bergeron et al., 2014).

7. Conclusion

In this study, we demonstrated that increasing the dietary intake of zinc had a positive effect on the growth performance of weanling piglets through a mechanism that remains to be determined but likely involves improvement of the systemic antioxidant capacity (estimated as malondialdehyde concentration) and control of inflammation (haptoglobin concentration). Also in this study, increasing the dietary intake of arginine had no positive effect on growth performance despite a positive impact on malondialdehyde status. Zinc and arginine supplements may act synergistically on glutathione metabolism, but the mechanism involved remains to be determined.

8. Acknowledgements

Financial support for this work was provided by a grant from the Natural Science and Engineering Research Council (NSERC) awarded to F. Guay and by a studentship from La fédération des producteurs de porcs du Québec (FPPQ) awarded to N. Bergeron.

9. Bibliography

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 2005 17th ed. AOAC, Arlington, VA.

Bergeron N, Robert C, Guay F. Antioxidant status and inflammatory response in weanling piglets fed diets supplemented with arginine and zinc. *Can J Anim Sci* 2014;94(1):87-97.

Bergeron N, Robert C, Guay F. Feed supplementation with arginine and zinc on antioxidant status and inflammatory response in challenged weanling piglets. *Anim Nutr* 2017; 3:236-246.

Care CCOA. The care and use of farm animals in research, teaching and testing. Ottawa, ON: CCAC; 2009. p. 12-5.

Carlson D, Beattie JH, Poulsen HD. Assessment of zinc and copper status in weaned piglets in relation to dietary zinc and copper supply. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2007;91:19–28.

Chen Y, Chen D, Tian G, He J, Mao X, Mao Q, Yu B. Dietary arginine supplementation alleviates immune challenge induced by *Salmonella enterica* serovar *Choleraesuis* bacterin potentially through the Toll-like receptor 4-myeloid differentiation factor 88 signalling pathway in weaned piglets. *Brit J Nutri* 2012;108(6):1069-1076.

Davin R, Manzanilla EG, Klasing KC, Pérez JF. Effect of weaning and in-feed high doses of zinc oxide on zinc levels in different body compartments of piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2013;97(1):6-12.

Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004;37(4):277-85.

Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005;38(12):1103-11.

Formigari A, Irato P, Santon A. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. *Comp Biochem Physiol C* 2007;146(4):443-59.

Fukai, T. and Ushio-Kukai, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and disease. *Antioxid. Redox Signal.* 2011; 15: 1583-1606.

Guay F, Donovan SM, Trottier NL. Biochemical and morphological developments are partially impaired in intestinal mucosa from growing pigs fed reduced-protein diets supplemented with crystalline amino acids. *J Anim Sci* 2006;84(7): 1749-60.

Iszard MB, Liu J, Klaassen CD. Effect of several metallothionein inducers on oxidative stress defense mechanisms in rats. *Toxicology* 1995;104(1):25-33.

Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: present concepts. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26:173-9.

- Jain SK, McVie R, Duett J, Herbst JJ. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes* 1989;38(12):1539-43.
- Jensen P, Recén B. When to wean – observations from free-ranging domestic pigs. *Appl Anim Behav Sci* 1989;23:49–60.
- Jensen P, Stangel G. Behaviour of piglets during weaning in a seminatural enclosure. *Appl Anim Behav Sci* 1992;33:227–238.
- Krakowka S, Ellis JA, McNeilly F, Ringler S, Rings DM, Allan G. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Vet Pathol* 2001;38(1):31-42.
- Kubo M, Motomura Y. Transcriptional regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in acquired immune cells. *Front. Immunol.* 2012; 3: 275
- Lass A, Suessenbacher A, Wölkart G, Mayer B, Brunner F. Functional and analytical evidence for scavenging of oxygen radicals by L-arginine. *Mol. Pharmacol.* 2002; 61: 1081-1088.
- Le Floc'h N, Jondreville C, Matte JJ, Seve B. Importance of sanitary environment for growth performance and plasma nutrient homeostasis during the post-weaning period in piglets. *Arch anim nutri* 2006;60(1):23-34.
- Li H, Cao R, Wasserloos KJ, Bernal P, Liu Z-Q, Pitt BR, et al. Nitric oxide and zinc homeostasis in pulmonary endothelium. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1203:73-8.
- Li Q, Liu Y, Che Z, Zhu H, Meng G, Hou Y, Ding B, Yin Y, Chen F. Dietary L-arginine supplementation alleviates liver injury caused by *Escherichia coli* LPS in weaned pigs. *Innate Immun* 2012;18:804-814.
- Martinez MM, Hill GM, Link JE, Raney NE, Tempelman RJ, Ernst CW. Pharmacological zinc and phytase supplementation enhance metallothionein mRNA abundance and protein concentration in newly weaned pigs. *J. Nutr.* 2004; 134: 538-544.
- Martinez MM, Link JE, Hill GM. Dietary pharmacological or excess zinc and phytase effects on tissue mineral concentrations, metallothionein, and apparent mineral retention in the newly weaned pig. *Biol. Trace Elem. Res.* 2005; 105: 97-115.
- Maurice D, Lightsey SF, Toler JE, Canty S. Effect of chronic oxidative/corticosterone-induced stress on ascorbic acid metabolism and total antioxidant capacity in chickens (*Gallus gallus domesticus*). *J Anim Physiol Anim Nutr* 2007;91(2):355-60.
- Michel F, Bonnefont-Rousselot D, Mas E, Drai J, Thérond P. Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques. *Ann Biol Clin* 2008;66(6):605-20.
- NRC. Nutrient requirements of swine. twelfth revised ed. Washington, DC: The National Academies Press; 2012.

O'Dell BL, Savage JE. Arginine-lysine antagonism in the chick and its relationship to dietary cations. *J Nutr* 1966;90:364–370

Pastorelli H, Van Milgen J, Lovatto P, Montagne L. Meta-analysis of feed intake and growth responses of growing pigs after a sanitary challenge. *Animal* 2012a;6(6):952-961.

Pastorelli H, Le Floch N, Merlot E, Meunier-Salaün MC, Van Milgen J, Montagne L. Sanitary housing conditions modify the performance and behavioural response of weaned pigs to feed-and housing-related stressors. *Animal* 2012b;6(11):1811-1820.

Petersen HH, Nielsen JP, Heegard PMH. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res* 2004;35(2):163-87.

Pié, Lallès JP, Blazy F, Laffitte J, Sève B, Oswald IP. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *J Nutr* 2004;134(3):641-7.

Poeze M, Bruins MJ, Kessels F, Luiking YC, Lamers WH, Deutz NEP. Effects of L-arginine pretreatment on nitric oxide metabolism and hepatosplanchnic perfusion during porcine endotoxemia. *Am J Clin Nutr* 2011;93(6):1237-47.

Sales J. Effects of pharmacological concentrations of dietary zinc oxide on growth of post-weaning pigs: a metaanalysis. *Biol Trace Elem Res* 2013;152(3):343-9.

Sauerwein H, Schmitz S, Hiss S. The acute phase protein haptoglobin and its relation to oxidative status in piglets undergoing weaning-induced stress. *Redox Rep* 2005;10(6):295-302.

Tan B, Li XG, Kong X, Huang R, Ruan Z, Yao K, Deng Z, Xie M, Shinzato I, Yin Y, Wu G. Dietary L-arginine supplementation enhances the immune status in early-weaned piglets. *Amino Acids* 2009;37:323-311.

Walk CL, Wilcock P, Magowan E. Evaluation of the effects of pharmacological zinc oxide and phosphorus source on weaned piglet growth performance, plasma minerals and mineral digestibility. *Animal* 2015;9(7):1145-1152.

Williams NH, Stahly TS, Zimmerman DR. Effect of chronic immune system activation on nitrogen retention, partial efficiency of lysine utilization, and lysine needs of pigs. *J Anim Sci* 1997;75:2472–2481.

Wiseman DA, Wells SM, Wilham J, Hubbard M, Welker JE, Black SM. Endothelial response to stress from exogenous Zn²⁺ resembles that of NO-mediated nitrosative stress, and is protected by MT-1 overexpression. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;291(3):555-68.

Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Rhoads JM, Satterfield MC, Smith SB, Spencer TE, Yin Y. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids* 2009;37:153–168.

Wu X, Ruan Z, Gao Y, Yin Y, Zhou X, Wang L, et al. Dietary supplementation with L-arginine or N-carbamylglutamate enhances intestinal growth and heat shock protein-70

expression in weanling pigs fed a corn- and soybean meal-based diet. *Amino Acids* 2010;39:831-9.

Yao K, Guan S, Li T, Huang R, Wu G, Ruan Z, et al. Dietary L-arginine supplementation enhances intestinal development and expression of vascular endothelial growth factor in weanling piglets. *Br J Nutr* 2011;105(5):703-9.

Yi D, Hou Y, Wang L, Zhao D, Ding B, Wu T, Chen H, Liu Y, Kang P, Wu G. Gene expression profiles in the intestine of lipopolysaccharide-challenged piglets. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2016;21:487-501.

Yin J, Wu MM, Xiao H, Ren WK, Duan JL, Yang G, et al. Development of an antioxidant system after early weaning in piglets. *J Anim Sci* 2014;92(2):612-9.

Zhan Z, Ou D, Piao X, Kim SW, Liu Y, Wang J. Dietary arginine supplementation affects microvascular development in the small intestine of early-weaned pigs. *J Nutr* 2008;138(7):1304-9.

Zheng P, Yu B, He J, Tian G, Luo Y, Mao X, et al. Protective effects of dietary arginine supplementation against oxidative stress in weaned piglets. *Br J Nutr* 2013;109(12):2253-60.

Zhu C, Lv H, Chen Z, Wang L, Wu X, Chen Z, Zhang W, Liang R, Jiang Z. Dietary zinc oxide modulates antioxidant capacity, small intestine development, and jejunal gene expression in weaned piglets. *Biol Trace Elem Res*. 2017; 175(2):331-338.

Zhu LH, Zhao KL, Chen XL, Xu JX. Impact of weaning and an antioxidant blend on intestinal barrier function and antioxidant status in pigs. *J Anim Sci* 2012;90(8):2581-9.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'hypothèse générale de ce projet était que l'ajout de suppléments de Zn et Arg permettaient d'améliorer le statut antioxydant et réduire l'inflammation systémique et intestinale des porcelets sevrés sous différentes conditions de stimulation des systèmes inflammatoire et antioxydant.

L'objectif du chapitre 2 était de déterminer l'effet d'une supplémentation en Zn et en Arg sur le statut antioxydant et la réponse inflammatoire chez les porcelets sevrés, lors d'une stimulation inflammatoire aiguë provoquée par l'administration de LPS. Les résultats ont indiqué que le Zn peut réduire le stress oxydatif systémique avant l'injection de LPS mais pas 3h après. Le Zn a aussi permis d'améliorer le statut antioxydant de la muqueuse intestinale du jéjunum et de l'iléon. Par contre, la supplémentation en Zn et en Arg n'a pas semblé avoir un effet synergique pour améliorer le statut antioxydant ou réduire l'inflammation systémique ou dans la muqueuse intestinale chez les porcelets sevrés.

L'objectif du chapitre 3 était de déterminer l'effet d'une supplémentation en Zn et en Arg sur le stress oxydatif et la réponse inflammatoire chez les porcelets sevrés, après l'injection intramusculaire de LPS afin de simuler une situation d'inflammation chronique. L'essai a démontré que l'ajout d'une forte dose de Zn réduisait l'oxydation des lipides avant l'injection de LPS ainsi qu'aidait au contrôle de l'inflammation lors d'une simulation d'inflammation chronique, après l'injection répétée de LPS. L'ajout combiné d'une forte dose de Zn et d'un surplus d'Arg n'a eu que des effets limités sur les statuts oxydatif et inflammatoire suivant l'injection de LPS. Conséquemment, nous n'avons pu observer d'interaction entre les deux facteurs après l'injection de LPS.

L'objectif du chapitre 4 était de déterminer l'impact de l'Arg et du Zn sur le statut antioxydant et la réponse inflammatoire chez les porcelets sevrés en conditions d'élevage commerciales. Cette fois, la ration avec une dose élevée en Zn a amélioré les performances de croissance des porcelets et le statut oxydatif en diminuant la concentration de MDA. Encore une fois, l'ajout de l'Arg a eu un effet limité sur les performances de croissance bien que cet ajout d'Arg a amélioré le statut oxydatif. Cette fois, il a été possible d'observer

des interactions entre les deux facteurs comme l'amélioration de la concentration sérique en Zn et des modifications positives de la concentration en GSH et en GSSG lorsque l'ajout d'Arg était combiné au supplément de Zn, le tout suggérant un impact positif sur les statuts oxydatif et inflammatoire des animaux.

Les résultats des trois essais ont démontré que le supplément de Zn peut améliorer les performances de croissance et que cette amélioration pourrait s'expliquer par une réduction l'oxydation systémique, une amélioration du statut antioxydant dans les tissus intestinaux et un meilleur contrôle de l'inflammation suite au sevrage. Les résultats de l'Arg ont toutefois été beaucoup moins clairs puisque les effets du supplément sur les statuts oxydatif et inflammatoire ont été limités en période post-sevrage. Finalement, les résultats n'ont pu démontrer d'effet synergique clair des deux suppléments sur la croissance et les principaux paramètres tout au long de l'étude. Toutefois, les effets observés de la combinaison des suppléments sur le métabolisme de la GSH laissent croire à un lien possible entre ces deux nutriments sur le contrôle du statut oxydatif en période post-sevrage.

Bibliographie

- Abe, F., Ishibashi, N. and Shimamura, S. 1995. Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *Journal of Dairy Science*, 78(12) : 2838-2846.
- Abou-Mohamed, G., Papapetropoulos, A., Catravas, J.D. and Caldwell, R.W. 1998. Zn²⁺ inhibits nitric oxide formation in response to lipopolysaccharides: implication in its anti-inflammatory activity. *Eur J Pharmacol.*, 12; 341(2-3):265-72.
- Adams, C.A. 2000. The role of nutraceuticals in health and total nutrition. In *Proc. Aust. Poult. Sci. Sym* (Vol. 12, pp. 17-24).
- Agriculture et Agroalimentaire Canada. [En ligne]. Information sur le marché des viandes rouges. Pages consultées en mars 2013.
- Akkermans, A.D.L., Konstantinov, S.R., Zhu, W.Y., Favier, C.F., Williams, B.A. 2003. In "Proceedings of the 9th International symposium on digestive physiology in pigs", vol. 1, 49-56. BALL R.O., éd., Banff, AB, Canada.
- Aktan, F., Henness, S., Roufogalis, B.D., Ammit, A.J. 2003. Gynenosides derived from *Gynostemma pentaphyllum* suppress NO synthesis in murine macrophages by inhibiting iNOS enzymatic activity and attenuating NF- κ B-mediated iNOS protein expression. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 8 (4): 235–242.
- Albera, E. and Kankofer, M. 2009. Antioxidants in colostrum and milk of sows and cows. *Reproduction in domestic animals*, 44(4): 606-611.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E. and Knowles, R.G. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, 357: 593–615.
- Andreumont, A., Corpet, D. and Courvalin, P. 1997. La résistance des bactéries aux antibiotiques. *Pour la science*, 232 : 66–73.
- Asada, K., Toyota, K., Nishimura, T., Ikeda, J. and Hori, K. 2010. Accumulation and mobility of zinc in soil amended with different levels of pig-manure compost. *J Environ Sci Health B*, 45:285e92.
- Bahl, R., N. Bhandari, K. M. Hambidge and M. K. Bhan. 1998. Plasma zinc as a predictor of diarrheal and respiratory morbidity in children in an urban slum setting. *Am J Clin Nutr* 68: 414-417.
- Bailey, M., Miller, B.G., Telemo, E., Stokes, C.R. and Bourne, F.J. 1993. Specific immunological-unresponsiveness following active primary responses to proteins in the weaning diet of piglet. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 101: 266–271.

- Barrow, P.A., Fuller, R. and Newport, M.J. 1977. Changes in microflora and physiology of anterior intestinal tract of pigs weaned at 2 days, with special reference to pathogenesis of diarrhea. *Infection and Immunity*, 18: 586–595.
- Berkes, J., Viswanathan, V.K., Savkovic, S.D. and Hecht, G. 2003. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut*, 52: 439-451.
- Bhandari, N., Bahl, R., Hambidge, K.M. and Bhan, M.K. 1996. Increased diarrhoeal and respiratory morbidity in association with zinc deficiency-a preliminary report. *Acta Paediatr*, 85 : 148-150.
- Blachier, F., M'Rabet-Touil, H., Posho, L., Darcy-Vrillon, B. and Duee, P.-H. 1993. Intestinal arginine metabolism during development: Evidence for de novo synthesis of L-arginine in newborn pig enterocytes. *Eur. J. Biochem.*, 216: 109-117.
- Blakely, S. R., Mitchell, G. V., Jenkins, M. Y., Grundel, E. and Whittaker, P. 1991. Canthaxanthin and excess vitamin A alter alpha-tocopherol, carotenoid and iron status in adult rats. *The Journal of nutrition*, 121(10): 1649-1655.
- Blecha, F., Pollman, D.S. and Nichols, D.A. 1983. Weaning pigs at an early age decreases cellular immunity. *Journal of Animal Science*, 56(2): 396-400.
- Bogdan, C.T., Rollinghoff, M. and Diefenbach, A. 2000. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev*, 173: 17–26.
- Bogdan, C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*, 2 (10): 907–916.
- Bonazzi, G., Cortellini, L. and Piccinini, S. 1994. Presenza di rame e zinco nei liquami suinicoli e rischio di contaminazione dei suoli. *L'Informatore Agrario*, 36: 55–59.
- Bonnette, E.D., Kornegay, E.T., Lindemann, M.D. and Notter, D.R. 1990. Influence of two supplemental vitamin E levels and weaning age on performance, humoral antibody production and serum cortisol levels of pigs. *J. Anim. Sci.* 68:1346–1353.
- Bosi, P., Casini, L., Finamore, A., Cremokolini, C., Merialdi G., Trevisi, P., Nobili, F. and Mengheri, E. 2004. Spray-dried plasma improves growth performance and reduces inflammatory status of weaned pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *Journal of Animal Science*. 82: 1764-1772.
- Boudry, G., Guerin, S. and Malbert, C.H. 2004a. Effect of an abrupt switch from a milkbased to a fibre-based diet on gastric emptying rates in pigs: difference between origins of fibre. *British Journal of Nutrition*, 92: 913–920.

- Boudry, G., Peron, V., Le Huerou-Luron, I., Lalles, J.P. and Seve, B. 2004b. Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. *The Journal of Nutrition*, 134: 2256–2262.
- Broom, L.J., Miller, H.M., Kerr, K.G. and Knapp, J.S. 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.
- Brown, P.J., Miller, B.G., Stokes, C.R., Blazquez, N.B. and Bourne, F.J. 1988. Histochemistry of mucins of pig intestinal secretory epithelial cells before and after weaning. *J. Comp. Pathol.*, 98: 313–323.
- Brugger, D. and Windisch, W.M. 2015. Environmental responsibilities of livestock feeding using trace mineral supplements. *Animal Nutrition*.
- Buckley, J.M., Wang, J.H. and Redmond, H.P. 2006. Cellular reprogramming by gram-positive bacterial components: a review. *J Leukocyte Biol*, 80(4):731–41.
- Buescher, E.S. and McIlheran, S.M. Colostral antioxidants: separation and characterization of two activities in human colostrum. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 14:47-56.
- Buetler, T.M., Krauskopf, A. and Ruegg, U.T. 2004. Role of superoxide as a signaling molecule. *News Physiol. Sci.*, 19:120-123.
- Butler, J.E., Klobasa, F. and Werhahn, E. 1981. The differential localization of IgA, IgM and IgG in the gut of suckled neonatal piglets. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2(1): 53-65.
- Buzoianu, S.G., Walsh, M.C., Rea, M.C., O’Sullivan, O., Cotter, P.D., Ross, R.P., Gardiner, G.E. and Lawlor, P.G. 2012. High-throughput sequence-based analysis of the intestinal microbiota of weanling pigs fed genetically modified MON810 maize expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab (Bt maize) for 31 days. *Appl Environ Microbiol*, 78: 4217–4224.
- Canada Porc International. 2013. [En ligne]. Information sur l’industrie. Page consultée en mai 2015.
- Carlson, M.S., Hill, G.M. and Link, J.E. 1999. Early- and Traditionally weaned nursery pigs benefit from phase-feeding pharmacological concentrations of zinc oxide: Effect on metallothionein and mineral concentrations. *J. Anim. Sci.*, 77: 1199-1207.
- Carlson, D., Sehested, J., Feng, Z. and Poulsen, H.D. 2008. Serosal zinc attenuate serotonin and vasoactive intestinal peptide induced secretion in piglet small intestinal epithelium in vitro. *Comp Biochem Physiol A MolIntegr Physiol*, 149: 51-58.

Case, C.L. and Carlson, M.S. 2002. Effect of feeding organic and inorganic sources of additional zinc on growth performance and zinc balance in nursery pigs. *Journal of Animal Science*, 80: 1917–1924.

Castillo, M., Martin-Orue, S.M., Nofrarias, M., Manzanilla, E.G. and Gasa, J. 2007. Changes in caecal microbiota and mucosal morphology of weaned pigs. *Veterinary Microbiology*, 124: 239–247.

Castillo, M., Martín-Orúe, S.M., Taylor-Pickard, J.A., Pérez, J.F. and Gasa, J. 2008. Use of mannanoligosaccharides and zinc chelate as growth promoters and diarrhea preventative in weaning pigs: Effects on microbiota and gut function. *J. Anim. Sci.*, 86, 94–101.

Centre de développement du porc du Québec. 2016. ABC de la production porcine – portrait de la production porcine québécoise. http://www.google.ca/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=5&ved=2ahUKEwjVteWq6a7eAhVoqlkKHT7dDLkQFjAEegQIBRAC&url=http%3A%2F%2Fwww.cdpq.ca%2Fgetattachment%2FPublications-et-documents%2FIndicateurs-de-performance%2F2016-09_ABC_prod_Quebec.pdf.aspx&usg=AOvVaw3zkOU7zI8Nr7mqOEWsXQBp page visitée le 30 octobre 2018.

Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 59: 527–605.

Chao, W.H., Askew, E.W., Roberts, D.E., Woods, S.M. and Perkins, J.B. 1999. Oxidative stress in humans during work at moderate altitude. *J. Nutr.* 129:2009-2012.

Che, T.M., Johnson, R.W., Kelley, K.W., Van Alstine, W.G., Dawson, K.A., Moran, C.A. and Pettigrew, J.E. 2011. Mannan oligosaccharide improves immune responses and growth efficiency of nursery pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of animal science*, 89(8): 2592-2602.

Chiba, L.I. 2001. Protein supplement. In: Lewis, A.J., Southern, L.L. (Eds.), *Swine Nutrition*, 2nd ed. CRC Press LLC, New York, pp. 803–837.

Ching, S., Mahan, D.C., Wiseman, T.G. and Fastinger, N.D. 2002. Evaluating the antioxidant status of weanling pigs fed dietary vitamins A and E. *Journal of animal science*, 80(9): 2396-2401.

Cifone, M.G., Cironi, L., Meccia, M.A., Roncaioli, P., Festuccia, C., De Nuntiis, G., D'Aló, S. and Santoni, A. 1995. Role of nitric oxide in cellmediated tumor cytotoxicity. *Adv Neuroimmunol*, 5: 443–61.

Commission on Antimicrobial Feed Additives. 1997. *Antimicrobial Feed Additives*. Government Official Reports, SOU; Ministry of Agriculture: Stockholm; 132 pp.

Connelly, L., Palacios-Callender, M., Ameixa, C., Moncada, S. and Hobbs, A.J. 2001. Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro-and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *Journal of Immunology*, 166 (6): 3873–3881.

Conseil de recherches agro-alimentaires du Canada et Conseil canadien du porc. 2003. Code de pratiques recommandées pour le soin et la manipulation des animaux de ferme : porcs. Ajout : sevrage précoce. Ottawa : Conseil de recherches agro-alimentaires du Canada, 20 pages.

Cranwell, P.D. 1985. The development of acid and pepsin (Ec-3.4.23.1) secretory capacity in the pig – the effects of age and weaning 1. Studies in anesthetized pigs. *British Journal of Nutrition*, 54: 305–320.

Cranwell, P.D. 1995. Development of the neonatal gut and enzyme systems. In: M. A. Varley (ed.), *The Neonatal Pig: Development and Survival*. CAB International, Wallingford, pp. 99–154.

Cromwell, G.L. 2000. Utilization of soy products in swine diets. In: Drackley, J.K. (Ed.), *Soy in Animal Nutrition*. Fed. Anim. Sci. Soc., Savoy, IL, USA, pp. 258–282.

Csaky, I. and Fekete, S. 2004. Soybean: feed quality and safety. Part 2: pathology of soybean feeding in animals. A review. *Acta Vet. Hung.* 52, 315–326.

Cummings, J.H., Antoine, J.M., Azpiroz, F., Bourdet-Sicard, R., Brandtzaeg, P., Calder, P.C., Gibson, G.R., Guarner, F., Isolauri, E., Pannemans, D., Shortt, C., Tuijelaars, S. and Watzl, B. 2004. PASSCLAIM1—Gut health and immunity. *European Journal of Nutrition*, 43(2): 118–173.

Danielson, D.M. and Crenshaw, J.D. 1991. Raw and processed soybeans in swine diets. In: Miller, E.R., Ullrey, D.E., Lewis, A.J. (Eds.), *Swine Nutrition*. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 573–584.

Davis, S.R. and Cousins, R.J. 2000. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *The Journal of Nutrition*, 130(5): 1085–1088.

Davis, M.E., Maxwell, C.V., Brown, D.C., de Rodas, B.Z., Johnson, Z.B., Kegley, E.B., Hellwig, D.H. and Dvorak, R.A. 2002. Effect of dietary mannan oligosaccharides and(or) pharmacological additions of copper sulfate on growth performance and immunocompetence of weanling and growing/finishing pigs. *J. Anim. Sci.*, 80: 2887–2894.

Dawn, B. and Bolli, R. 2002. Role of nitric oxide in myocardial preconditioning. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 962: 18–41.

De Diego, M., Rodriguez, F., Alcaraz, C., Gomez, N., Alonso, C. and Escribano, J.M. 1994. Characterization of the IgA and subclass IgG responses to neutralizing epitopes after

infection of pregnant sows with the transmissible gastroenteritis virus or the antigenically related porcine respiratory coronavirus. *Journal of general virology*, 75: 2585-2593.

Deitch, E.A., Rutan, R. And Waymack, J.P. 1996. Trauma, shock, and gut translocation. *New Horiz.*, 4:289-299.

De Jonge, W.J., Dingemanse, M.A., de Boer, P.A., Lamers, W.H. and Moorman, A.F. 1998. Arginine-metabolizing enzymes in the developing rat small intestine. *Pediatr Res*, 43:442-451.

De Jonge, W.J., Kwikkers, K.L., Te Velde, A.A., van Deventer, S.J.H., Nolte, M.A., Mebius, R.E., Ruijter, J.M., Lamers, M.C. and Lamers, W.H. 2002. Arginine deficiency affects early B cell maturation and lymphoid organ development in transgenic mice. *J Clin Invest*, 110:1539–1548.

Deng, Q., Xu, J., Yu, B., He, J., Zhang, K., Ding, X. and Chen, D. 2010. Effect of dietary tea polyphenols on growth performance and cell-mediated immune response of post-weaning piglets under oxidative stress. *Arch. Anim. Nutr.* 64:12–21.

Deprez, P., Deroose, P., Van den Hende, C., Muylle, E. and Oyaert, W. 1987. Liquid versus dry feeding in weaned piglets: The influence on small intestinal morphology. *J. Vet. Med. Biol.*, 34: 254-259.

Desseyn J.L., Aubert J.P., Porchet N. and Laine A. 2000. Evolution of the large secreted gel-forming mucins. *Mol. Biol. Evol.*, 17: 1175–1184.

Dong, G.Z. and Pluske, J.R. 2007. The low feed intake in early-weaned pigs: problems and possible solutions. *Asian Aust J Anim Sci*, 20:440–452.

Dreau, D. and Lalles, J.P. 1999. Contribution to the study of gut hypersensitivity reactions to soybean proteins in preruminant calves and early-weaned piglets. *Livest. Prod. Sci.*, 60: 209–218.

Dritz, S.S., Owen, K.Q., Goodband, R.D., Nelssen, J.L., Tokach, M.D., Chengappa, M.M. and 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. *Journal of animal sciences*, 74: 1620-1628.

Du, X. and Low, M.G. 2001. Down-regulation of glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D induced by lipopolysaccharide and oxidative stress in the murine monocyte-macrophage cell line RAW 264.7. *Infection and Immunity*, 69 (5): 3214–3223.

Efird, R.C., Armstrong, W.D. and Herman, D.L. 1982. The development of digestive capacity in young pigs: effects of age and weaning system. *Journal of Animal Science*, 55: 1380–1387.

Egounlety, M. and Aworh, O.C. 2003. Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine max* Merr.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and groundbean (*Macrotyloma geocarpa* Harms). *J. Food Eng.* 56, 249–254.

Eicher, S.D., McKee, C.A., Carroll, J.A. and Pajor, E.A. 2006. Supplemental vitamin C and yeast cell wall betaglucan as growth enhancers in newborn pigs and as immunomodulators after an endotoxin challenge after weaning. *J. Anim. Sci.* 84:2352–2360.

El-Chemaly, S., Salathe, M., Baier, S., Conner, G.E. and Forteza, R. 2003: Hydrogen peroxide-scavenging properties of normal human airway secretions. *Am J Resp Crit Care Med*, 167: 425–430.

Elass, E., Masson, M., Mazurier, J. and Legrand, D. 2002. Lactoferrin inhibits the lipopolysaccharide-induced expression and proteoglycan-binding ability of interleukin-8 in human endothelial cells. *Infect. Immun.* 70 : 1860-1866.

EQSP. 2015. Liste des recommandations et documents produits par l'EQSP dans le cadre de la stratégie du secteur porcin Québécois pour la prévention et le contrôle de la diarrhée épidémique porcine (DEP) et du deltacoronavirus porcine (DCVP). http://www.leseleveursdeporsduquebec.com/upa_porcs_files/producteurs/pdf/liste_des_recommandations_et_documents_sur_la_depdcvp_de_l_eqsp_31_03_2015_final_fr.pdf

Esplugues, J. V., Bulbena, O., Escolar, G., Marti-Bonmati, E. and Esplugues, J. 1985. Effects of zinc acexamate on gastric mucosal resistance factors. *Eur J Pharmacol*, 109: 145-151.

Evoy, D., Fahey, T.J. and Daly, J.M. 1998. Immunonutrition: the role of arginine. *Nutrition*, 14:611–617.

Fang, Y.Z., Yang, S. and Wu, G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 8: 872–879.

Favier, C.F., Vaughan, E.E., De Vos, W.M. and Akkermans, A.D.L. 2002. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 219-226.

Feng, Z., Carlson, D. and Poulsen, H.D. 2006. Zinc attenuates forskolin-stimulated electrolyte secretion without involvement of the enteric nervous system in small intestinal epithelium from weaned piglets. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.*, 145: 328-333.

Ferron, A. 1994. Chapitre 76 : La résistance des bactéries aux antibiotiques. In *Bactériologie médicale*. 15th ed., Ed. C. et R., Paris, 12 pages.

Finkel, T. 2003. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15:247-254.

Flint, H.J. and Bayer, E.A. 2008. Plant cell wall breakdown by anaerobic microorganisms from the mammalian digestive tract. *Ann N Y Acad Sci*, 1125: 280–288.

Flynn, N.E., Meininger, C.J., Kelly, K., Ing, N.H., Morris, S.M. Jr. and Wu, G. 1999. Glucocorticoids mediate the enhanced expression of intestinal type II arginase and argininosuccinate synthase in postweaning pigs. *J Nutr*, 129:799–803.

Flynn, N.E., Meininger, C.J., Haynes, T.E. and Wu, G. 2002. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomed Pharmacother*, 56: 427–438.

Forbes, J.M. 1995. Environmental factors affecting feed intake. In: *Voluntary Intake and Diet Selection in Farm Animals*, edited by Forbes, J.M. Wallingford, UK: CAB, p. 332-353.

Forman, H.J. and Torres, M. 2002. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med*, 166: S4–S8.

Formigari, A., Irato, P. and Santon, A. 2007. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: Biochemical and cytochemical aspects. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 146: 443-459.

Foster, M., and Samman, S. 2012. Zinc and regulation of inflammatory cytokines: implications for cardiometabolic disease. *Nutrients*, 4: 676-694.

Foussat, A., Cottrez, F., Brun, V., Fournier, N., Breitmayer, J.P. and Groux, H. 2003. A comparative study between T regulatory type 1 and CD4⁺ CD25⁺ T cells in the control of inflammation. *The Journal of Immunology*, 171(10): 5018-5026.

Frank, J.W., Mellencamp, M.A., Carroll, J.A., Boyd, R.D. and Allee, G.L. 2005. Acute feed intake and acute-phase protein responses following a lipopolysaccharide challenge in pigs from two dam lines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 107: 179-187.

Frank, J.W., Escobar, J., Hguyen, H.V., Jobgen, S.C., Jobgen, W.S., Davis, T.A. and Wu, G. 2007. Oral N-carbamylglutamate supplementation increases protein synthesis in skeletal muscle of piglets. *J Nutr*, 137:315–319.

Fu, C.J.J., Jez, J.M., Kerley, M.S., Allee, G.L. and Krishnan, H.B. 2007. Identification, characterization, epitope mapping, and three-dimensional modeling of the alpha-subunit of beta-conglycinin of soybean, a potential allergen for young pigs. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 4014–4020.

Fubini, B. and Hubbard, A. 2003. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(12) : 1507-1516.

Fukai, T. and Ushio-Kukai, M. 2011. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and disease. *Antioxid. Redox Signal.*, 15: 1583-1606.

Galanos, C., Luderitz, O., Rietschel, E.T., Westphal, O., Brade, H., Brade, L., Freudenberg, M., Schade, U., Imoto, M., Yoshimura, H., Kusumoto, S. and Shiba, T. 1985. Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur. J. Biochem.*, 148: 1-5.

Gerster, H. 1993 Anticarcinogenic effect of common carotenoids. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 63:93-121.

Gewirtz, A.T., Liu, Y., Sitaraman, S.V. and Madara, J.L. 2002. Intestinal epithelial pathology: past, present and future. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 16: 851-867.

Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, 125, 1401–1412.

Goldman, S.A, Cheda, S., Keeney, S.E., Schmalstieg and F.C., Schanler, R.J. 1994: Immunologic protection of the premature newborn by human milk. *Semin Perinatol*, 18: 495–501.

Gresham, H.D., Zheleznyak, A., Mormol, J.S. and Brown, E.J. 1990. Studies on the molecular mechanisms of human neutrophil Fc receptor-mediated phagocytosis. Evidence that a distinct pathway for activation of the respiratory burst results in reactive oxygen metabolite-dependent amplification of ingestion. *J Biol Chem*, 265: 7819–7826, 1990.

Gu, X. and Li, D. 2004. Effect of dietary crude protein level on villous morphology, immune status and histochemistry parameters of digestive tract in weaning piglets. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 114: 113–126.

Guillou, D., Sacy, A., Marchand, D., Le Treut, Y., Le Dividich, J. and Chevaux, E. 2012. Influence de l'apport alimentaire de *Saccharomyces cerevisiae boulardii* sur les immunoglobulines du colostrum et du lait de truie. *Jour. Rech. Porc*, 44, 189-190.

Gumbiner, B.M. 1993. Breaking through the tight junction barrier, *J. Cell Biol.*, 123: 1631–1633.

Gumbiner, B.M. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, 84(3): 345-357.

Guzik, T.J. and Harrison, D.G. 2006. Vascular NADPH oxidases as drug targets for novel antioxidant strategies. *Drug Discov Today*, 11: 524–533.

Hahn, J.D. and Baker, D.H. 1993. Growth and plasma zinc responses of young pigs fed pharmacologic levels of zinc. *J. Anim. Sci.*, 71: 3020–3024.

- Halas, V. and Nocht, I. 2012. Mannan oligosaccharides in nursery pig nutrition and their potential mode of action. *Animals*, 2(2): 261-274.
- Halliwell, B., Clement, M.V. and Long, L.H. 2000. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett*, 486: 10–13.
- Hampson, D.J. 1986. Alterations in piglet small intestinal structure at weaning. *Research in Veterinary Science*, 40: 32–40.
- Han, J., Liu, Y.L., Fan, W., Chao, J., Hou, Y.Q., Yin, Y.L., Zhu, H.L., Meng, G.Q. and Che, Z.Q. 2009a. Dietary l-arginine supplementation alleviates immunosuppression induced by cyclophosphamide in weaned pigs. *Amino Acids*, 37 (4): 643-651.
- Han, Y.H., Moon, H.J., You, B.R., Kim, S.Z., Kim, S.H. and Park, W.H. 2009b. The effect of MAPK inhibitors on arsenic trioxide-treated Calu-6 lung cells in relation to cell death, ROS and GSH levels. *Anticancer Res.*, 29:3837–3844.
- Han, J., Shuvaev, V.V. and Muzykantov, V.R. 2011. Catalase and SOD conjugated with PECAM antibody distinctly alleviate abnormal endothelial permeability caused by exogenous ROS and vascular endothelial growth factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 338:82–91.
- Han, J., Bian, L., Liu, X., Zhang, F., Zhang, Y. and Yu, N. 2014. Effects of *Acanthopanax senticosus* Polysaccharide supplementation on growth performance, immunity, blood parameters and expression of pro-inflammatory cytokines genes in challenged weaned piglets. *Asian-Australas Journal of Animal Science*, 27(7): 1035-1043.
- Hancock, J.D., Jones, C.L. and Starkey, C.W. 2003. Mannanoligosaccharides in diets for nursery pigs. Available online: <http://krex.k-state.edu/dspace/bitstream/2097/2116/1/Mannanoligosaccharides%20in%20Diets%20for%20Nursery%20Pigs-%20Swine%20Day%202003.pdf> Page visitée le 23 décembre 2015.
- Hansen, J.A., Nelssen, J.L., Goodband, R.D. and Weeden, T.L. 1993. Evaluation of animal protein supplements in diets of early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 71 (7): 1853-1862.
- Haversen, L.A., Engberg, I., Baltzer, L., Dolphin, G., Hanson, L.A. and Mattsby-Baltzer, I. 2000. Human lactoferrin and peptides derived from a surface-exposed helical region reduce experimental *Escherichia coli* urinary tract infection in mice. *Infect. Immun.* 68: 5816-5823.
- Hedemann, M.S. and Jensen, B.B. 2004. Variations in enzyme activity in stomach and pancreatic tissue and digesta in piglets around weaning. *Archives of Animal Nutrition*, 58: 47–59.

Hedemann, M.S., Jensen, B.B. and Poulsen, H.D. 2006. Influence of dietary zinc and copper on digestive enzyme activity and intestinal morphology in weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 84: 3310–3320.

Heo, J.M., Opapeju, F.O., Pluske, J.R., Kim, J.C., Hampson, D.J. and Nyachoti, C.M. 2012. Gastrointestinal health and function in weaned pig: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhea without using in-feed antimicrobial compounds. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 97: 207-237.

Heppell, L.M., Sissons, J.W. and Banks, S.M. 1989. Sensitisation of preruminant calves and piglets to antigenic protein in early weaning diets: control of the systemic antibody responses. *Research in veterinary science*, 47(2): 257-262.

Heo, J.M., Opapeju, F.O., Pluske, J.R., Kim, J.C., Hampson, D.J. and Nyachoti, C.M. 2013. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without in-feed antimicrobial compounds. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 97:207-237.

Hibbs, J.B., Taintor, R.R. and Vavrin, Z. 1987. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*, 235: 473-476.

Hill, G.M., Cromwell, G.L., Crenshaw, T.D., Dove, C.R., Ewan, R.C., Knabe, D.A., Lewis, A.J., Libal, G.W., Mahan, D.C., Shurson, G.C., Southern, L.L. and Veum, T.L. 2000. Growth promotion effects and plasma changes from feeding high dietary concentrations of zinc and copper to weanling pigs (regional study). *Journal of Animal Science*, 78: 1010–1016.

Hill, G.M., Mahan, D.C., Carter, S.D., Cromwell, G.L., Ewan, R.C., Harrold, R.L., Lewis, A.J., Miller, P.S., Shurson, G.C. and Veum, T.L. 2001. Effect of pharmacological concentrations of zinc oxide with or without the inclusion of an antibacterial agent on nursery pig performance. *Journal of Animal Science*, 79: 934– 941.

Højberg, O., Canibe, N., Poulsen, H.D., Hedemann, M.S. and Jensen, B.B. 2005. Influence of dietary zinc oxide and copper sulfate on the gastrointestinal ecosystem in newly weaned piglets. *Appl Environ Microbiol*, 71: 2267-2277.

Hopwood, D.E. and Hampson, D.J. 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 (eds), *Weaning the Pig: Concepts and Consequences*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Netherlands, pp. 199–218.

Hoque, K.M. and Binder, H.J. 2006. Zinc in the treatment of acute diarrhea: current status and assessment. *Gastroenterology*, 130: 2201–2205.

Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K. and Akira, S. 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immun.*, 162: 3749-3752.

Hotz, C. and Gibson, R.S. 2007. Traditional food-processing and preparation practices to enhance the bioavailability of micronutrients in plant-based diets. *J. Nutr.*, 137: 1097–1100.

Houdijk, J.G.M., Hartemink, R., Verstegen, M.W.A. and Bosch, M.W. 2002. Effects of dietary non-digestible oligosaccharides on microbial characteristics of ileal chyme and faeces in weaner pigs. *Arch. Anim. Nutr.*, 56:297–307.

Hsieh, N.K., Chang, H.R., Hu, C.T. and Chen, H.I. 2008. Effects of nitric oxide donor and nitric oxide synthase inhibitor on the resistance, exchange and capacitance functions of the canine intestinal vasculature. *Vascul Pharmacol*, 48: 122–8.

Hu, C.A., Khalil, S., Zhaorigetu, S., Liu, Z., Tyler, M., Wan, G. and Valle, D. 2008. Human D1-pyrroline-5-carboxylate synthase: function and regulation. *Amino Acids*, 35: 665-672.

Hu, C., Song, J., Li, Y., Luan, Z. and Zhu, K. 2012a. Diosmectite-zinc oxide composite improves intestinal barrier function, modulates expression of pro-inflammatory cytokines and tight junction protein in early weaned pigs. *Br J Nutr*, 110: 681-688.

Hu, C., Song, J., You, Z., Luan, Z. and Li, W. 2012b. Zinc oxide-montmorillonite hybrid influences diarrhea, intestinal mucosal integrity, and digestive enzyme activity in weaned pigs. *Biol. Trace Elem. Res.*, 149:190-196.

Hu, C.H., Xiao, K., Song, J. and Luan, Z.S. 2013. Effects of zinc oxide supported on zeolite on growth performance, intestinal microflora and permeability, and cytokines expression of weaned pigs. *Anim Feed Sci Tech*, 181: 65.

Huang, K.T., Kuo, L. and Liao, J.C. 1998. Lipopolysaccharide activates endothelial nitric oxide synthase through protein tyrosine kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 245 (1): 33–37.

Huang, S.X., McFall, M., Cegielski, A.C. and Kirkwood, R.N. 1999. Effect of dietary, zinc supplementation on *Escherichia coli* septicemia in weaned pigs. *Swine Health and Production*, 7: 109-112.

Husband, A.J., Brandon, M.R. and Lascelles, A.K. 1973. The effect of corticosteroid on absorption and endogenous production of immunoglobulins in calves. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 51: 707–710.

Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrus, R.E. and Chaudhuri, G. 1987. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and

chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84: 9265-9269.

Inoue, R., Tsukahara, T., Nakanishi, N., and Ushida, K. 2005. Development of the intestinal microbiota in the piglet. *J Gen Appl Microbiol*, 51: 257–265.

Ivarsson, E., Liu, H.Y., Dicksved, J., Roos, S. and Lindberg, J.E. 2012. Impact of chicory inclusion in a cereal-based diet on digestibility, organ size and faecal microbiota in growing pigs. *Animal*, 6: 1077–1085.

Jaeschke, H. 2011. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *J. Gastroen. Hepatol.*, 26: 173-179.

Jensen, P. and Recén, B. 1989. When to wean – observations from free-ranging domestic pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 23: 49–60.

Jensen, P. and Stangel, G. 1992. Behaviour of piglets during weaning in a seminatural enclosure. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 33: 227–238.

Jensen, M.S., Jensen, S.K. and Jakobsen, K. 1997. Development of digestive enzymes in pigs with emphasis on lipolytic activity in the stomach and pancreas. *Journal of Animal Science*, 75: 437–445.

Jensen-Waern, M., Melin, L., Lindberg, R., Johannisson, A., Peterson, L. and Wallgren, P. 1998. Dietary zinc oxide in weaned pigs-effects on performance, tissue concentrations, morphology, neutrophil functions and faecal microflora. *Research in Veterinary Science*, 64: 225–231.

Jensen, B.B., Hojberg, O., Mikkelsen, L.L., Hedemann, M.S. and Canibe, N. 2003. In “Proceedings of the 9th International symposium on digestive physiology in pigs”, vol. 1, 103-119. BALL R.O., éd., Banff, AB, Canada.

Jensen, A.N., Mejer, H., Mølbak, L., Langkjær, M., Jensen, T.K., Angen, Ø., Martinussen, T., Klitgaard, K., Baggesen, D.L., Thamsborg, S.M. and Roepstorff, A. 2011. The effect of a diet with fructan-rich chicory roots on intestinal helminths and microbiota with special focus on *Bifidobacteria* and *Campylobacter* in piglets around weaning. *Animal*, 5:851–860.

Jones, R.D. and Morice, A.H. 2000. Hydrogen peroxide—an intracellular signal in the pulmonary circulation: involvement in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Pharmacol Ther*, 88: 153–161.

Johnson, L.R. 1988. Regulation of gastrointestinal mucosal growth. *Physio. Rev.* 68: 456-502.

Kägi, J. H. and Nordberg, M. (Eds.). 1979. *Metallothionein* (Vol. 1). Birkhauser.

Kagi, J. H. R. and Kojima, Y. 1987 *Expel: Suppl. (Basel)* 52, 25-61.

Katouli, M., Melin, L., Jensen-Waern, M., Wallgren, P. and Möllby, R. 1999. The effect of zinc oxide supplementation on the stability of the intestinal flora with special reference to composition of coliforms in weaned pigs. *Journal of Applied Microbiology*, 87: 564–573.

Kaunitz, J.D., Barrett, K.E. and McRoberts, J.A. 1995. Electrolyte secretion and absorption: small intestine and colon. In: T. Yamada, J. B. Lippincott (eds), *Gastroenterology*, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 326.

Kelly, D., Smyth, J.A. and McCracken, K.J. 1991. Digestive development of the early-weaned pig. II, Effect of level of food intake on digestive enzyme activity during the immediate post-weaning period. *British Journal of Nutrition*, 65: 181–188.

Kepka-Lenhart, D., Mistry, S.K., Wu, G. and Morris, S.M. Jr. 2000. Arginase I: a limiting factor for nitric oxide and polyamine synthesis by activated macrophages? *Am J Physiol*, 279: 2237–2242.

Kerr, L.D., Inoue, J. and Verma, I.M. 1992. Signal transduction: The nuclear target. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 4:496-501.

Khan, A.R., Khazanovich-Bernstein, N., Bergmann, E.M. and James, M.N.G. 1999. Structural aspects of activation pathways of aspartic protease zymogens and viral 3C protease precursors. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 96: 10968-10975.

Kick, A.R., Tompkins, M.B., Flowers, W.L., Whisnant, C.S. and Almond, G.W. 2012. Effects of stress associated with weaning on the adaptive immune system in pigs. *Journal of animal science*, 90(2) : 649-656.

Kim, S.W. and Wu, G. 2004. Dietary arginine supplementation enhances the growth of milk-fed young pigs. *J Nutr*, 134:625–630.

Kim, D.-W., Chae, S.-J., Cho, S.-B., Hwang, O.-H., Lee, H.-J., Chung, W.-T., Park, J.-C., Kim, I.-C. and Kim, I.-H. 2010. Effect of prebiotics on intestinal microflora and fermentation products in pig in vitro model. *J. Anim. Sci. Technol.*, 52:199–204.

Kim, H.B., Borewicz, K., White, B.A., Singer, R.S., Sreevatsan, S., Tu, Z.J., and Isaacson, R.E. 2011 Longitudinal investigation of the age-related bacterial diversity in the feces of commercial pigs. *Vet Microbiol*, 153: 124–133.

Kim, H.B., Borewicz, K., White, B.A., Singer, R.S., Sreevatsan, S., Tu, Z.J. and Isaacson, R.E. 2012. Microbial shifts in the swine distal gut in response to the treatment with antimicrobial growth promoter, tylosin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109: 15485–15490.

Klobasa, F. and Butler, J.E. 1987. Absolute and relative concentrations of immunoglobulins G, M. and A, and albumin in the lacteal secretion of sows of different lactation numbers. *Am. J. Vet. Res.* 48 : 176-182.

Klobasa, F., Werhahn, E. and Butler, J.E. 1987. Composition of sow milk during lactation. *J. Anim. Sci.* 64 : 1485-1466.

Klopfenstein, C. 2004. Utilisation des antibiotiques en production porcine: où sont les problèmes? Colloque sur la production porcine, Saint-Hyacinthe. http://www.agrireseau.qc.ca/porc/documents/klopfenstein_christian.pdf

Konstantinov, S.R., Zhu, W.Y., Williams, B.A., Tamminga, S., De Vos, W.M. and Akkermans, A.D.L. 2003. Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 43: 225-235.

Krogfelt, K.A. 1991. Bacterial adhesion: genetics, biogenesis, and role in pathogenesis of fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Rev Infect Dis*, 13(4):721–35

Kröncke, K.D., Fehsel, K. and Kolb-Bachofen, V. 1998. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clinical and Experimental Immunology*, 113 (2): 147–156.

Kunz, C. and Rudloff, S. 1993. Biological functions of oligosaccharides in human milk. *Acta Paediatr.* 82 : 903-912.

La Financière agricole du Québec. 2016. Nombre d'entreprises et d'unités assurées à l'ASRA par strate de production, 3 pages.

Lafond, N. 2009. L'utilisation judicieuse des ingrédients alternatifs en alimentation porcine : une bonne façon de réduire ses coûts d'alimentation. Expo-Congrès du porc du Québec. [En ligne]. <http://www.agrireseau.qc.ca/porc/documents/Nicolas%20lafond%20l%27utilisation%20judicieuse%20des%20ingr%C3%A9dients%20alternatifs.pdf>

Lalles, J.P., Bosi, P., Smidt, H. and Stokes, C.R. 2007. Weaning – A challenge to gut physiologists. *Livestock Science*, 108: 82–93.

Le Mieux, F.M., Naranjo, V.D., Binder, T.D. and Southern, L.L. 2010. Effect of Dried Brewers Yeast on Growth Performance of Nursing and Weanling Pigs. *Profess. Anim. Scient.*, 26, 70–75.

Les Éleveurs de porcs du Québec. 2018a. L'impact économique et les exportations. <http://www.leseleveursdeporcsduquebec.com/lorganisation-fr/production/le-portrait-economique/limpact-economique-et-les-exportations.php> Page visitée en octobre 2018.

Les Éleveurs de porcs du Québec. 2018b. La production par région. <http://www.leseleveursdeporcsduquebec.com/lorganisation-fr/production/le-portrait-economique/la-production-par-region.php> Page visitée en octobre 2018.

Li, D.F., Nelssen, J.L., Reddy, P.G., Blecha, F., Hancock, J.D., Allee, G.L., Goodband, R.D. and Klemm, R.D. 1990. Transient hypersensitivity to soybean meal in the early-weaned pig. *J. Anim. Sci.*, 68 : 1790–1799.

Li, D.F., Nelssen, J.L., Reddy, P.G., Blecha, F., Klemm, R. and Goodband, R.D. 1991. Interrelationship between hypersensitivity to soybean proteins and growth performance in early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.*, 69: 4062–4069.

Li, B.T., Van Kessel, A.G., Caine, W.R., Huang, S.X. and Kirkwood, R.N. 2001. Small intestinal morphology and bacterial populations in ileal digesta and feces of newly weaned pigs receiving a high dietary level of zinc oxide. *Can J Anim Sci*, 81: 511-516.

Li, D.F., Jiang, J.Y. and Ma, Y.X. 2003. Early weaning diets and feed additives. In Xu, R.-J. *The neonatal pig; gastrointestinal physiology and nutrition*, p. 247-274. Nottingham University Press.

Li, X.L., Yin, J.D., Li, D.F., Chen, X.J., Zang, J.J. and Zhou, X. 2006. Dietary supplementation with zinc oxide increases IGF-I and IGF-I receptor gene expression in the small intestine of weanling piglets. *Journal of Nutrition*, 136: 1786–1791.

Li, P., Yin, Y.L., Li, D., Kim, S.W. and Wu, G. 2007. Amino acids and immune function. *Br J Nutr*, 98: 237–252.

Li, H., Cao, R., Wasserloos, K.J., Bernal, P., Liu, Z.-Q., Pitt, B.R. and St-Croix, C.M. 2010. Nitric oxide and zinc homeostasis in pulmonary endothelium. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1203: 73-78.

Li, Q., Liu, Y., Che, Z., Zhu, H., Meng, G., Hou, Y., Ding, B., Yin, Y. and Chen, F. 2012a. Dietary L-arginine supplementation alleviates liver injury caused by *Escherichia coli* LPS in weaned pigs. *Innate Immun.*, 18: 804-814.

Li, M., Bauer, L. and Chen, X. 2012b. Microbial composition and in vitro fermentation patterns of human milk oligosaccharides and prebiotics differ between formula-fed and sow-reared piglets. *J. Nutr.*, 142:681–689.

Liévin-Le Moal, V. and Servin, A.L. 2014. Anti-infective activities of *Lactobacillus* strains in the human intestinal microbiota: from probiotics to gastrointestinal anti-infectious biotherapeutic agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 27:167–199.

Liu, Y.L., Huang, J.J., Hou, Y.Q., Zhu, H.L., Zhao, S.J., Ding, B.Y., Yin, Y.L., Yi, G.F., Shi, J.X. and Fan, W. 2008. Dietary arginine supplementation alleviates intestinal mucosal

disruption induced by *Escherichia coli* lipopolysaccharide in weaned pigs. *Brit. J. Nutr.*, 100: 552-560.

Livingston, D.H., Mosenthal, A.C. and Deitch, E.A. 1995. Sepsis and multiple organ dysfunction syndrome: a clinical-mechanistic overview. *New Horiz.*, 3: 257-266.

Llyod, D.A.J. and Gabe, S.M. 2008. Intestinal morphology, intestinal regeneration and the promise of tissue engineering. In: A. N. Langnas, O. Goulet, E. M. M. Quigley, K. A. Tappenden (eds), *Intestinal Failure: Diagnosis, Management and Transplantation*. Wiley-Blackwell, Maiden, MA, USA, pp. 13.

Lonnerdal, B. and Iyer, S. 1995. Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu Rev Nutr*, 15: 93-110.

Mackie, R.I., Sghir, A., Gaskins, R.H. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.*, 69: 1035-1045.

Madara, J.L. 1990. Warner-Lambert/Parke-Davis Award lecture. Pathobiology of the intestinal epithelial barrier. *American Journal of Pathology*, 137: 1273-1281.

Madec, F., Bridoux, N., Bounaix, S. and Jestin, A. 1998. Measurement of digestive disorders in the piglet at weaning and related risk factors. *Prev Vet Med*, 35:53-72.

Magalhaes, J.G., Tattoli, I. and Girardin, S.E. 2007. The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin Immunol*, 19: 106-115.

Manchester, K. L. 1970. Sites of hormonal regulation of protein metabolism. *Mammalian protein metabolism*, 4: 229.

Manners, M.J. 1976. The development of digestive function in the pig. *Proceedings of the Nutrition Society*, 35: 49-55.

Maret, W. and Vallee, B.L. 1998. Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:3478-3482

Marion, J., Biernat, M., Thomas, F., Savary, G., Le Breton, Y., Zabielski, R., Le Huërou-Luron, I. and Le Dividich, J. 2002. Small intestine growth and morphometry in piglets weaned at 7 days of age. Effects of level of energy intake. *Reprod. Nutr. Dev.* 42: 339-354.

Marini, J., Premkumar, M., Didelija, I., Stoll, B. and Burrin, D. 2014. Evidence for a functional intestinal-renal axis for arginine synthesis in the neonatal pig. *The FASEB Journal*, 28(1), supplement 258.2.

Marks-Konczalik, J., Chu, S.C. and Moss, J. 1998. Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein

1 and nuclear factor kappaB-binding sites. *Journal of Biological Chemistry*, 273 (35): 22201–22208.

Martin, L., Lodemann, U., Bondzio, A., Gefeller, E-M., Vahjen, W., Aschenbach, J.R., Zentek, J. and Pieper, R. 2013a. A high amount of dietary zinc changes the expression of zinc transporters and metallothionein in jejunal epithelial cells in vitro and in vivo but does not prevent zinc accumulation in jejunal tissue of piglets. *J Nutr*, 143: 1205-1210.

Martin, L., Pieper, R., Schunter, N., Vahjen, W. and Zentek, J. 2013b. Performance, organ zinc concentration, jejunal brush border membrane enzyme activities and mRNA expression in piglets fed with different levels of dietary zinc. *Arch Animal Nutr*, 67: 248-261.

Martinez, M.M., Hill, G.M., Link, J.E., Raney, N.E., Tempelman, R.J. and Ernst, C.W. 2004. Pharmacological zinc and phytase supplementation enhance metallothionein mRNA abundance and protein concentration in newly weaned pigs. *J. Nutr.*, 134: 538-544.

Martinez, M.M., Link, J.E. and Hill, G.M. 2005. Dietary pharmacological or excess zinc and phytase effects on tissue mineral concentrations, metallothionein, and apparent mineral retention in the newly weaned pig. *Biol. Trace Elem. Res.*, 105: 97-115.

Martini, F.H., Timmons, M.J. and Tallitsch, R.B. 2009. *Human Anatomy*. (6th Édition). San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.

Mathew, A.G., Upchurch, W.G. and Chattin, S.E. 1998. Incidence of antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli* isolated from commercial swine farms. *J. Anim. Sci.*, 76: 429-434.

Mattsby-Baltzer, I., Roseanu, A., Motas, C., Elverfors, J., Engberg, I. and Hanson, L.A. 1996. Lactoferrin of a fragment thereof inhibits the endotoxin-induced interleukin-6 response in human monocytic cells. *Pediatr. Res.* 40: 257-262.

Mayer, H., Tharanathan, R.N. and Weckesser, J. 1985. Analysis of lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria. *Methods Microbiol.*, 18: 157-207.

Mayer, B. and Hemmens, B. 1997. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends in Biochemical Sciences*, 22 (12): 477–481.

McCracken, B.A., Spurlock, M.E., Roos, M.A., Zuckermann, F.A. and Gaskins, H.R. 1999. Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *J. Nutr.*, 129: 613-619.

Miguel, J.C., Rodriguez-Zas, S.L. and Pettigrew, J.E. 2004. Efficacy of Bio-Mos for improving nursery pig performance. *J. Swine Health Prod.*, 12: 296–307.

- Mikkelsen, L.L., Jakobsen, M. and Jensen, B.B. 2003. Effects of dietary oligosaccharides on microbial diversity and fructo-oligosaccharide degrading bacteria in faeces of piglets post-weaning. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 109:133–150.
- Mikkelsen, L.L. and Jensen, B.B. 2004. Effect of fructo-oligosaccharides and transgalacto oligosaccharides on microbial populations and microbial activity in the gastrointestinal tract of piglets post-weaning. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 117:107–119.
- Miller, B.G., Whittemore, C.T., Stokes, C.R. and Telemo, E. 1994. The effect of delayed weaning on the development of oral tolerance to soya-bean protein in pigs. *British Journal of Nutrition*, 71(04): 615-625.
- Miller, B.G. and Skadhauge, E. 1997. Effect of weaning in the pig on ileal Ion transport measured in vitro. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 44: 289–299.
- Modler, H.W., Mckellar, R.C. and Yaguchi, M. 1990. Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 23: 29–41.
- Moeser, A.J., Klok, C.V., Ryan, K.A., Wooten, J.G., Little, D., Cook, V.L. and Blikslager, A.T. 2007. Stress signaling pathways activated by weaning mediate intestinal dysfunction in the pig. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292: 173–181.
- Molbak, L., Thomsen, L.E., Jensen, T.K., Bach Knudsen, K.E. and Boye, M. 2007. Increased amount of *Bifidobacterium thermacidophilum* and *Megasphaera elsdenii* in the colonic microbiota of pigs fed a swine dysentery preventive diet containing chicory roots and sweet lupine. *J. Appl. Microbiol.*, 103: 1853–1867.
- Moncada, S., Palmer, R.M. and Higgs, E.A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology [Review]. *Pharmacol Rev*, 43: 109–42.
- Moncada, D.M., Kammanadiminti, S.J. and Chadee, K. 2003. Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. *Trends in parasitology*, 19(7): 305-311.
- Moore, R., Carlson, S. and Madara, J.L. 1989. Rapid barrier restitution in an in vitro model of intestinal epithelial injury. *Lab Invest*, 60: 237-244.
- Moore, E.A., Broom, D.M. and Simmins, P.H. 1994. Environmental enrichment in flatdeck accommodation for exploratory behaviour in early-weaned piglets. *Applied Animal Behaviour Science*, 41:277-278.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. and O'Garra, A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*, 19 : 683-765.

Morris, S.M. Jr. 2002. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr*, 22:87–105.

Mountzouris, K.C., Balaskas, C., Fava, F., Tuohy, K.M., Gibson, G.R. and Fegeros, K. 2006. Profiling of composition and metabolic activities of the colonic microflora of growing pigs fed diets supplemented with prebiotic oligosaccharides. *Anaerobe*, 12:178–185.

Moura, P., Cabanas, S., Lourenço, P., Gírio, F., Loureiro-Dias, M.C. and Esteves, M.P. 2008. In vitro fermentation of selected xylo-oligosaccharides by piglet intestinal microbiota. *LWT - Food Sci. Technol.*, 41:1952–1961.

Mroz, Z. 2005. Organic acids as potential alternatives to antibiotic growth promoters for pigs. *Advances in pork production*, 16: 169.

Myers, M.J., Farrell, D.E., Palmer, D.C. and Post, L.O. 2003. Inflammatory mediator production in swine following endotoxin challenge with or without co-administration of dexamethasone. *International immunopharmacology*, 3: 571-579.

Nabuurs, M.J., Hoogendoorn, A. and van Zijderveld, F.G. 1994. Effects of weaning and enterotoxigenic *Escherichia coli* on net absorption in the small intestine of pigs. *Research in Veterinary Science*, 56: 379–385.

Nabuurs, M.J.A., Hoogendoorn, A., Vanzijderveld-Van Bommel, A. 1996. Effect of supplementary feeding during the sucking period on net absorption from the small intestine of weaned pigs. *Res. Vet. Sci.*, 61 : 72-77.

Nabuurs, M.J.A. 1998. Weaning Piglets as a Model for Studying Pathophysiology of Diarrhea, Conference Proceedings, Gastro-Intestinal Disorders in Juveniles, Lelystad, Netherlands, 16–17 September, 1997, pp. 42–45.

Newburgs, D.S. 1999. Human milk glycoconjugates that inhibit pathogens. *Curr. Med. Chem.* 6: 117-127.

Newsholme, P., Brennnan, L., Rubi, B. and Maechler, P. 2005. New insights into amino acid metabolism, beta-cell function and diabetes. *Clin Sci*, 108: 185–194.

Nguyen, T.V., Yuan, L., Azevedo, M.S., Jeong, K.I., González, A.M. and Saif, L.J. 2007. Transfer of maternal cytokines to suckling piglets: in vivo and in vitro models with implications for immunomodulation of neonatal immunity. *Veterinary immunology and immunopathology*, 117(3): 236-248.

Nochta, I., Halas, V., Tossenberger, J. and Babinszky, L. 2010. Effect of different levels of mannan oligosaccharide supplementation on the apparent ileal digestibility of nutrients, N-balance and growth performance of weaned piglets. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 94: 747–756.

Novo, E. and Parola, M. 2008. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis and tissue repair*, 1: 1-58.

NRC. 2012. *Nutrient Requirements of Swine: Eleventh Revised Edition*. Washington, DC: The National Academies Press.

Obermeier, F., Gross, V., Scholmerich, J. and Falk, W. 1999. Interleukin-1 production by mouse macrophages is regulated in a feedback fashion by nitric oxide. *Journal of Leukocyte Biology*, 66 (5): 829–836.

Opapeju, F.O., Krause, D.O., Payne, R.L., Rademacher, M. and Nyachoti, C.M. 2009. Effect of dietary protein level on growth performance, indicators of enteric health, and gastrointestinal microbial ecology of weaned pigs induced with postweaning colibacillosis. *J Anim Sci*, 87: 2635– 2643.

Ostrea, E.M., Balun, J.E., Winkler, R. and Porter, T. 1986. Influence of breast-feeding on the restoration of the low serum concentration of vitamin E and β -carotene in the newborn infant. *American journal of obstetrics and gynecology*, 154(5): 1014-1017.

Oswald, I.P. 2006. Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine. *Veterinary research*, 37(3), 359-368.

Pàcha, J. 2000. Development of intestinal transport function in mammals. *Physiological Reviews*, 80: 1633–1667.

Palmer, R.M., Ferrige, A.G. and Moncada, S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327: 524-526.

Palsson-McDermott, E.M. and O'Neill, L.A.J. 2004. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor 4 (review). *Immunology*, 113: 153-162.

Pearce, L.L., Gandley, R.E., Han, W., Wasserloos, K., Stitt, M., Kanai, A.J. and Levitan, E.S. 2000. Role of metallothionein in nitric oxide signaling as revealed by a green fluorescent fusion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(1): 477-482.

Pedersen, L.J., Studnitz, M., Jensen, K.H. and Giersing, A.M. 1998. Suckling behaviour of piglets in relation to accessibility to the sow and the presence of foreign litters. *Applied Animal Behaviour Science*, 58(3-4): 267-279.

Perez-Sala, D., Cernuda-Morollon, E., Diaz-Cazorla, M., Rodriguez-Pascual, F. and Lamas, S. 2001. Posttranscriptional regulation of human iNOS by the NO/cGMP pathway. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 280 (3): F466–F473.

Perez-Vilar J. and Hill R.L. 1999. The structure and assembly of secreted mucins, *J. Biol. Chem.*, 274: 31751–31754.

Petersen H.H., Nielsen J.P. and Heegard P.M.H. 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet. Res.*, 35: 163-187.

Pié S., Lallès J.P. and Oswald I. 2003. Influence of weaning on intestinal pro-inflammatory cytokine patterns in piglets, in: Ball R.O. (Ed.), *Proceedings of the 9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*, Banff, AB, Canada, pp. 99–101.

Pié, S., Lallès, J.P., Blazy, F., Laffitte, J., Sève, B. and Oswald, I.P. 2004. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *J. Nutr.*, 134: 641-647.

Pieper, R., Janczyk, P., Zeyner, A., Smidt, H., Guiard, V. and Souffrant, W.B. 2008. Ecophysiology of the developing total bacterial and *Lactobacillus* communities in the terminal small intestine of weaning piglets. *Microbial Ecology*, 56: 474–483.

Pieper, R., Vahjen, W., Neumann, K., Van Kessel, A. G. and Zentek, J. 2012. Dose-dependent effects of dietary zinc oxide on bacterial communities and metabolic profiles in the ileum of weaned pigs. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 96(5): 825-833.

Pierce, J.L., Cromwell, G.L., Lindemann, M.D. and Coffey R.D. 1995. Assessment of three fractions of spray-dried porcine plasma on performance of early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 73 (Suppl. 1), 81 (résumé).

Pluske, J.R., Williams, I.H. and Aherne, F.X. 1996. Villous height and crypt depth in piglets in response to increases in the intake of cows' milk after weaning. *Animal Science*, 62: 145–158.

Pluske, J.R., Hampson, D.J. and Williams, I.H. 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science*, 51: 215–236.

Posey, W.C., Nelson, H.S., Branch, B. and Pearlman, D.S. 1978. The effects of acute corticosteroid therapy for asthma on serum immunoglobulin levels. *Journal of allergy and clinical immunology*, 62: 340-348.

Poeikhampha, T. and Bunchasak, C. 2011. Comparative Effects of Sodium Gluconate, Mannan Oligosaccharide and Potassium Diformate on Growth Performances and Small Intestinal Morphology of Nursery Pigs. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 24: 844–850.

Poeze, M., Bruins, M.J., Kessels, F., Luiking, Y.C., Lamers, W.H. and Deutz, N.E.P. 2011. Effects of L-arginine pretreatment on nitric oxide metabolism and hepatosplanchnic perfusion during porcine endotoxemia. *American Journal of Clinical Nutrition*, 93: 1237-1247.

- Poroyko, V., White, J.R., Wang, M., Donovan, S., Alverdy, J., Liu, D.C. and Morowitz, M.J. 2010. Gut microbial gene expression in mother-fed and formula-fed piglets. *PLoS ONE*, 5: 12459.
- Poulsen, H.D. 1995. Zinc oxide for weanling piglets. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A – Animal Science*, 45: 159–167.
- Prasad, A.S., Oberleas, D., Wolf, P., Horwitz, J.P., Miller, E.R. and Luecke, R.W. 1969. Changes in trace elements and enzyme activities in tissues of zinc-deficient pigs. *American Journal of Clinical Nutrition*, 22: 628–637.
- Prasad, A.S. and Oberleas, D. 1971. Changes in activities of zinc-dependent enzymes in zinc-deficient tissues of rats. *Journal of Applied Physiology*, 31: 842–846.
- Prasad, A.S. 1998. Zinc in human health: an update. *J. Trace Elem. Exp. Med.*, 11: 63–87.
- Prohaszka, L. and Baron, F. 1980. The predisposing role of high dietary protein supplies in enteropathogenic *E. coli* infections of weaned pigs. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe, B27*: 222–232.
- Pruitt, K.M., Kamau, D.N., Miller, K., Mansson-Rahemtulla, B. and Rahemtulla, F. 1990. Quantitative, standardized assays for determining the concentrations of bovine lactoperoxidase, human salivary peroxidase and human myeloperoxidase. *Anal Biochem*, 191: 278–286.
- Quarterman, J., Jackson, F.A. and Morrison, J.N. 1976. The effect of zinc deficiency on sheep intestinal mucin. *Life Sci*, 19: 979–986.
- Rakhshandeh, A. and De Lange, C. F. M. 2012. Evaluation of chronic immune system stimulation models in growing pigs. *Animal*, 6: 305–310.
- Rao, K.M. 2000. Molecular mechanisms regulating iNOS expression in various cell types. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*, 3 (1): 27–58.
- Reese, D.F., Thaler, R.C., Brumm, M.C., Lewis, A.J., Miller, W.F.P.S. and Libal, G.W. 2000. Swine nutrition guide. University of Nebraska et South Dakota State University, 42 pages.
- Reiter, B. and Härnqvist, G. 1984. Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical applications. *J Food Protect*, 47: 724–732.
- Reth, M. 2002. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat Immun*, 3: 1129–1134.
- Rhee, S.G., Chang, T.S., Bae, Y.S., Lee, S.R. and Kang, S.W. 2003. Cellular regulation by hydrogen peroxide. *J Am Soc Nephrol*, 14: 211–215.

Rietschel, E.T., Kirikae, T., Schade, F.U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A.J., Zahringer, U., Seydel, U. and Di Padova, F. 1994. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function (review). *FASEB J.*, 8: 217-225.

Roberfroid, M. 2007. Prebiotics: the concept revisited. *Journal of nutrition*, 137: 830-837.

Roberfroid, M., Gibson, G.R., Hoyles, L., McCartney, A.L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M.-J., Léotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N.M., Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Meheust, A. 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.*, 104 Suppl:S1–63.

Robert, F., Bebin, K., Garrau, J.M., Gueriot, J.F., Foret, R., Brack, M. and Garrel, C. 2009. Evaluation et correction du stress oxydatif du porcelet en post-sevrage. *Journ. Recher. Porcine France*, 41: 173-178.

Rojkind, M., Dominguez-Rosales, J.A., Nieto, N. and Greenwel, P. 2002. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *Cell Mol Life Sci*, 59: 1872–1891.

Rout, G.R. and Das, P. 2003. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. *Agronomie*, 23:3e11.

Roy, S.K., Behrens, R.H., Haider, R., Akramuzzaman, S.M., Mahalanabis, D., Wahed, M.A. and Tomkins, A.M. 1992. Impact of zinc supplementation on intestinal permeability in Bangladeshi children with acute diarrhoea and persistent diarrhoea syndrome. *J. Pediatr. Gastr. Nutr.*, 15: 289-296.

Rydning, A., Berstad, A., Berstad, T. and Hertenberg, L. 1985. The effect of guar gum and fiber-enriched wheat bran on gastric emptying of a semisolid meal in healthy subjects. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 20: 330–334.

Saetre, T., Hovig, T., Roger, M., Gundersen, Y. and Aasen, A.O. 2001. Hepatocellular damage in porcine endotoxemia: beneficial effects of selective versus non-selection nitric oxide synthase inhibition? *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 61: 503-512.

Sales, J. 2013. Effects of pharmacological concentrations of dietary zinc oxide on growth of post-weaning pigs: a meta-analysis. *Biol. Trace Elem. Res.*, 152: 343-349.

Sargeant, H.R., McDowall, D.J., Miller, H.M. and Shaw, M.A. 2010. Dietary zinc oxide affects the expression of genes associated with inflammation: Transcriptome analysis in piglets challenged with ETEC K88. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 137: 120-129.

Sauerwein, H., Schmitz, S. and Hiss, S. 2005. The acute phase protein haptoglobin and its relation to oxidative status in piglets undergoing weaning-induced stress. *Redox. Report.*, 10: 295-302.

Schanler, R.J. 1989. Human milk for preterm infants: nutritional and immune factors. *Semin Perinatol*, 13: 69–77.

Schletter, J., Heine, H., Ulmer, A.J. and Tietschel, E.T. 1995. Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch. Microbiol.*, 164: 383–389.

Schmidt, M.C., Askew, E.W., Roberts, D.E., Prior, R.L., Ensigh, W.Y. Jr and Hesslink, R.E. Jr. 2002. Oxidative stress in humans training in a cold, moderate altitude environment and their response to a phytochemical antioxidant supplements. *Wilderness Environ. Med.*, 13:94–105.

Schmidt, B., Mulder, I.E., Musk, C.C., Aminov, R.I., Lewis, M., Stokes, C.R., Bailey, M., Prosser, J.I., Gill, B.P., Pluske, J.R. and Kelly, D. 2011. Establishment of normal gut microbiota is compromised under excessive hygiene conditions. *PLoS ONE*, 6: e28284.

Schokker, D., Zhang, J., Zhang, L.L., Vastenhouw, S.A., Heilig, H.G., Smidt, H., Rebel, J.M.J. and Smits, M.A. 2014. Early-life environmental variation affects intestinal microbiota and immune development in new-born piglets. *PLoS ONE*, 9: e100040.

Schroder, N.W., Opitz, B., Lamping, N., Michelsen, K.S., Zahringer, U., Gobel, U.B., Schumann, R.R. 2000. Involvement of lipopolysaccharide binding protein, CD14, and Toll-like receptors in the initiation of innate immune responses by *Treponema* glycolipids. *Journal of Immunology*, 165(5): 2683–2693.

Schroyen, M., Stinckens, A., Verhelst, R., Niewold, T. and Buys, N. 2012. The search for the gene mutations underlying enterotoxigenic *Escherichia coli* F4ab/ac susceptibility in pigs: a review. *Veterinary Research*, 43: 70.

Segal, A.W. 2005. How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.*, 23:197–223.

Servin, A.L. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.*, 28:405–440.

Sharma, R. and Schumacher, U. 1995. The influence of diets and gut microflora on lectin binding patterns of intestinal mucins in rats. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 73(4):558–564.

Shaulian, E. and Karin, M. 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.*, 4:E131–E136.

Shi, G., Leray, V., Scarpignato, C., Bentouimou, N., Varannes, S.B.D., Cherbut, C. and Galmiche, J.P. 1997. Specific adaptation of gastric emptying to diets with differing protein content in the rat: is endogenous cholecystokinin implicated? *Gut*, 41: 612–618.

Shim, S.B., Williams, I.H. and Verstegen, M.W.A. 2005. Effects of dietary fructo-oligosaccharide on villous height and disaccharidase activity of the small intestine, pH,

VFA and ammonia concentrations in the large intestine of weaned pigs. *Acta Agric. Scand. Sect. A* 37–41.

Shin, K., Tomita, M. and Lonnerdal, B. 2000. Identification of lactoperoxidase in mature human milk. *J Nutr Biochem*, 11: 94–102.

Sigma-Aldrich. Lipopolysaccharides. *Glycobiology Analysis Manual*, 2nd Edition. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/glycobiology/lipopolysaccharides.html> Page visitée le 21 avril 2016.

Sinkora, J., Rehakova, Z., Sinkora, M., Cukrowska, B. and Tlaskalova-Hogenova, H. 2002. Early development of immune system in pigs. *Veterinary immunology and immunopathology*, 87(3): 301-306.

Sklan, D. and Donoghue, S. 1982. Vitamin E response to high dietary vitamin A in the chick. *J. Nutr.*, 112:759-765.

Snoeck, V., Huyghebaert, N., Cox, E., Vermeire, A., Saunders, J., Remon, J.P., Verschooten, F., Goddeeris, B.M. 2004. Gastrointestinal transit time of non-disintegrating radio-opaque pellets in suckling and recently weaned piglets. *Journal of Controlled Release*, 94: 143– 153.

Song, Y.S., Martinez-Villaluenga, C. and De Mejia, E.G., 2008a. Quantification of human IgE immunoreactive soybean proteins commercial soy ingredients and products. *J. Food Sci.*, 73: T90–99.

Song, Y.S., Frias, J., Martinez-Villaluenga, C., Vidal-Valverde, C. and González de Mejia, E. 2008b. Immunoreactivity reduction of soybean meal by fermentation, effect on amino acid composition and antigenicity of commercial soy. *Food Chem.*, 180: 571–581.

Southon, S., Gee, J.M., Bayliss, C.E., Wyatt, G.M., Horn, N. and Johnson, I.T. 1986. Intestinal microflora, morphology and enzyme activity in zinc-deficient and Zn-supplemented rats. *Br J Nutr*, 55: 603-611.

Spahl, D.U., Berendji-Grün, D., Suschek, C.V., Kolb-Bachofen, V. and Kröncke, K.D. 2003. Regulation of zinc homeostasis by inducible NO synthase-derived NO: nuclear metallothionein translocation and intranuclear Zn²⁺ release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24): 13952-13957.

Spreeuwenberg, M.A., Verdonk, J.M., Gaskins, H.R. and Verstegen, M.W. 2001. Small intestine epithelial barrier function is compromised in pigs with low feed intake at weaning. *Journal of Nutrition*, 131: 1520-1527.

Spring, P. 1999. Mannan-oligosaccharides as an alternative to antibiotic use in Europe. *Zootechnica Int.*, 22: 38–41.

Starke, I.C., Zentek, J. and Vahjen, W. 2013. Ex vivo -growth response of porcine small intestinal bacterial communities to pharmacological doses of dietary zinc oxide. PLoS One, 8: e56405.

Starke, I.C., Pieper, R., Neumann, K., Zentek, J. and Vahjen, W. 2014. The impact of high dietary zinc oxide on the development of the intestinal microbiota in weaned piglets. FEMS microbiology ecology, 87(2): 416-427.

Statistique Canada, 2016. Tableau CANSIM 002-0001. Page consultée en octobre 2018.

St-Croix, C.M., Wasserloos, K.J., Dineley, K.E., Reynolds, I.J., Levitan, E.S. and Pitt, B.R. 2002. Nitric oxide-induced changes in intracellular zinc homeostasis are mediated by metallothionein/thionein. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 282(2): L185-L192.

St-Croix, C.M., Leelavaninchkul, K., Watkins, S.C., Kagan, V.E. and Pitt, B.R. 2005. Nitric oxide and zinc homeostasis in acute lung injury. Proceedings of the American Thoracic Society, 2(3): 236-242.

Stokes, C.R., Bailey, M., Haverson, K., Harris, C., Jones, P., Inman, C., Pié, S., Oswald, I.P., Williams, B.A., Akkermans, A.D.L., Sowa, E., Rothkötter, H.J., Miller, B.G. 2004. Postnatal development of intestinal immune system in piglets: implications for the process of weaning. Anim. Res., 53: 325–334.

Stoll, B., Henry, J., Reeds, P.J., Yu, H., Jahoor, F. and Burrin, D.G. 1998. Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. J. Nutr., 128: 606-614.

Stone, J.R. and Collins, T. 2002. The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. Endothelium, 9: 231–238.

Stuehr, D.J., Kwon, N.S., Nathan, C.F., Griffith, O.W., Feldman, P.L. and Wiseman, J. 1991. N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. Journal of Biological Chemistry, 266 (10): 6259–6263.

Sun, P., Li, D.F., Dong, B., Qiao, S.Y. and Ma, X. 2008a. Effects of soybean glycinin on performance and immune function in early weaned pigs. Arch. Anim. Nutr., 62: 313–321.

Sun, P., Li, D.F., Li, Z.J., Dong, B. and Wang, F.L. 2008b. Effects of glycinin on IgE-mediated increase of mast cell numbers and histamine release in the small intestine. J. Nutr. Biochem., 19: 627–633.

Sun, X., Yang, H., Nose, K., Nose, S., Haxhija, E.Q., Koga, H., Feng, Y. and Teitelbaum, D.H. 2008c. Decline in intestinal mucosal IL-10 expression and decreased intestinal barrier function in a mouse model of total parenteral nutrition. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 294(1): G139-G147.

- Sung, M.A., Fleming, K., Chen, H.A. and Matthews, S. 2001. The solution structure of PapGII from uropathogenic *Escherichia coli* and its recognition of glycolipid receptors. *EMBO Rep*, 2(7):621–7.
- Talukder, M.J.R. and Harada, E. 2007. Bovine lactoferrin protects lipopolysaccharide-induced diarrhea modulating nitric oxide and prostaglandin E2 in mice. *Can. J. Physio. Pharmacol.*, 85: 200-208.
- Tan, S.S.L. and Shackleton, D.M. 1990. Effects of mixing unfamiliar individuals and of azaperone on the social behaviour of finishing pigs. *Applied Animal Behaviour Science*, 26: 157-168.
- Tan, B., Li, X.G., Kong, X., Huang, R., Ruan, Z., Yao, K., Deng, Z., Xie, M., Shinzato, I., Yin, Y. and Wu, G. 2009. Dietary L-arginine supplementation enhances the immune status in early-weaned piglets. *Amino Acids*, 37: 323-331.
- Taylor, B.S., Kim, Y.-M., Wang, Q., Shapiro, R.A., Billiar, T.R. and Geller, D.A. 1997. Nitric Oxide Down-regulates Hepatocyte-Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Expression. *Arch Surg.*, 132: 1177-1183.
- Telemo, E., Batley, M., Miller, B.G., Stokes, C.R. and Bourne, F.J. 1991. Dietary antigen handling by mother and offspring. *Scandinavian journal of immunology*, 34(6): 689-696.
- Thomas, K., Heroriet-Guicheney, C., Ladics, G., Bannon, G., Cockburn, A., Crevel, R., Fitzpatrick, J., Mills, C., Privalle, L. and Vieths, S. 2007. Evaluating the effect of food processing on the potential human allergenicity of novel proteins: International workshop report. *Food Chem. Toxicol.*, 45: 1116–1122.
- Thompson, C.L., Wang, B., and Holmes, A.J. 2008. The immediate environment during postnatal development has long-term impact on gut community structure in pigs. *ISME J*, 2: 739–748.
- Thomsen, L.E., Knudsen, K.E.B., Jensen, T.K., Christensen, A.S., Møller, K. and Roepstorff, A. 2007. The effect of fermentable carbohydrates on experimental swine dysentery and whip worm infections in pigs. *Vet. Microbiol.*, 119:152–163.
- Tizard, I.R. 2004. *Veterinary Immunology: An Introduction*. Saunders, Philadelphia.
- Tokach, M.D., Dritz, S.S., Goodband, R.D. and Nelssen, J.L. 1997. Starter pig recommendations. Kansas State University, 12 p.
- Tokach, M.D., Dritz, S.S. et Goodband, R.D. 2003. Nutritional requirements of the weaned pig. In Pluske, J.R., Le Dividich, J. et Verstegen M.W.A. (Éd.). *Weaning the pig, concepts and consequences*, p. 259-299. Wageningen Academic Publishers.

Turner, A., Chen, S.-N., Joike, M.K., Pendland, S.L., Pauli, G.F. and Farnsworth, N.R. 2005. Inhibition of Uropathogenic. *Escherichia Coli* by cranberry Juice: A New Antiadherence Assay. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 8940-8947.

Vahjen, W., Pieper, R. and Zentek, J. 2010. Bar-coded pyrosequencing of 16S rRNA gene amplicons reveals changes in ileal porcine bacterial communities due to high dietary zinc intake. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 6689–6691.

Vahjen, W., Pieper, R. and Zentek, J. 2011. High level of dietary zinc oxide change the bacterial core and enterobacterial composition in the ileum of piglets. *Journal of Animal Science*, 89: 2340–2439.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M. and Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 39:44–84.

van Beers-Schreurs, H.M., Vellenga, L., Wensing, T. and Breukink, H.J. 1992. The pathogenesis of the postweaning syndrome in weaned piglets: a review. *Veterinary Quarterly*, 14(2): 9–34.

van Beers-Schreurs, H.M., Nabuurs, M.J., Vellenga, L., Kalsbeek-van der Valk, H.J., Wensing, T. and Breukink, H.J. 1998. Weaning and the weanling diet influence the villous height and crypt depth in the small intestine of pigs and alter the concentrations of short-chain fatty acids in the large intestine and blood. *Journal of Nutrition*, 128: 947–953.

van den Broeck, W., Cox, E., Oudega, B. and Goddeeris, B.M. 2000. The F4 fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors. *Vet Microbiol*, 71(3–4):223–44

van der Peet-Schwering, C.M.C., Jansman, A.J.M., Smidt, H. and Yoon, I. 2007. Effect of yeast culture on performance, gut integrity, and blood cell composition of weanling pigs. *J. Anim. Sci.*, 85: 3099–3109.

van Dijk, A.J., Everts, H., Nabuurs, M.J.A., Margry, R.J.C.F. and Beynen, A.C. 2001. Growth performance of weaning pigs fed spray-dried animal plasma; a review. *Livestock Production Science.*, 68: 263-274.

van Gerven, N., de Greve, H. and Hernalsteens, J.P. 2008. Inactivated *Salmonella* expressing the receptor-binding domain of bacterial adhesins elicit antibodies inhibiting hemagglutination. *Vet Microbiol*, 131(3–4):369–75.

Vega-Lopez, M.A., Bailey, M., Telemo, E. and Stokes, C.R. 1995. Effect of early weaning on the development of immune cells in the pig small intestine. *Veterinary immunology and immunopathology*, 44: 319-327.

Viaene, J. and W. Verbeke. 1999. Economic feasibility of the use of feed additives. *Pig Progress* 14(3): 11-14.

Wagstrom, E.A., Yoon, K.J. and Zimmerman, J.J. 2000. Immune components in porcine mammary secretions. *Viral Immunol* 13: 383-397.

Wang, J.E., Dahle, M.K., McDonald, M., Foster, S.J., Aasen, A.O. and Thiernemann, C. 2003. Peptidoglycan and lipoteichoic acid in gram-positive bacterial sepsis: receptors, signal transduction, biological effects, and synergism. *Shock*, 20(5):402-14.

Wang, Y.Z., Xu, Z.R., Lin, W.X., Huang, H.Q. and Wang, Z.Q. 2004a. Developmental gene expression of antimicrobial peptide PR-39 and effect of zinc oxide on gene regulation of PR-39 in piglets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 17: 1635-1640.

Wang, J., Zhu, Y. and Li, D. 2004b. In vitro fermentation of various fiber and starch sources by pig fecal inocula. *J. Anim. Sci.*, 82:2615-2622.

Wang, J., Chen, L., Li, P., Li, X., Zhou, H., Wang, F., Li, D., Yin, Y. and Wu, G. 2008. Gene expression is altered in piglet small intestine by weaning and dietary glutamine supplementation. *J. Nutr.*, 138: 1025-1032.

Wang, X., Ou, D., Yin, J. and Wang, J. 2009. Proteomic analysis reveals altered expression of proteins related to glutathione metabolism and apoptosis in the small intestine of zinc oxide-supplemented. *Amino Acids*, 37: 209-218.

Wapnir, R.A. 2000. Zinc deficiency, malnutrition and the gastrointestinal tract. *J Nutr*, 130: 1388-1392.

Wapnir, R.A. and Teichberg, S. 2002. Regulation mechanisms of intestinal secretion: implications in nutrient absorption. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 190-199.

Webel, D.M., Finck, B.N., Baker, D.H. and Johnson, R.W. 1997. Time course of increased plasma cytokines, cortisol, and urea nitrogen in pigs following intraperitoneal injection of lipopolysaccharide. *Journal of animal science*, 75: 1514-1520.

Weissmann, N. 2008. Nitric Oxide-Mediated Zinc Release A New (Modulatory) Pathway in Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction. *Circulation research*, 102(12): 1451-1454.

West, C.E., Gothefors, L., Granstrom, M., Kayhty, H., Hammarstrom, M.L. and Hernell, O. 2008. Effects of feeding probiotics during weaning on infections and antibody responses to diphtheria, tetanus and Hib vaccines. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 19:53-60.

Westerlund-Wikstrom, B., Korhonen, T.K. 2005. Molecular structure of adhesin domains in *Escherichia coli* fimbriae. *Int J Med Microbiol: IJMM*, 295(6-7):479-86.

White, L.A., Newman, M.C., Cromwell, G.I. and Lindemann, M.D. 2001. Efficacy of brewers dried yeast as a source of mannan-oligosaccharides without and with organic acids and carbadox on performance and intestinal bacterial population of weanling pigs. *J. Anim. Sci.*, 79 (Suppl. 2): 78.

Wiesinger, H. 2001. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Progress in neurobiology*, 64: 365-391.

Willing, B.P and Van Kessel, A.G. 2010. Host pathways for recognition: establishing gastrointestinal microbiota as relevant in animal health and nutrition. *Livestock Science*, 133: 82–91.

Wisemann, D.A., Wells, S.M., Hubbard, M., Welker, J.E. and Black, S.M. 2007. Alterations in zinc homeostasis underlie endothelial cell death induced by oxidative stress from acute exposure to hydrogen peroxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 292:165-177.

White, F., Wenham, G., Sharman, G.A., Jones, A.S., Rattray, E.A. and McDonald, I. 1969. Stomach function in relation to a scour syndrome in the piglet. *British Journal of Nutrition*, 23: 847–858.

Whittemore, C.T. and Green, D.M. 2006. Growth of the young weaned pig. In: *The Weaner Pig*, edited by Varley, M.A. and Wiseman, J. Wallingford, UK: CAB, p. 1-15.

Wijtten, P.J.A., van der Meulen, J. and Verstegen, W.A. 2011. Intestinal barrier function and absorption in pigs after weaning: a review. *Br. J. Nutr.*, 105: 967-981.

Williams, B.A., Verstegen, M.W.A. and Tamminga, S. 2001. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutrition Research Reviews*, 14: 207–227.

Windisch, W. 2002. Interaction of chemical species with biological regulation of the metabolism of essential trace elements. *Anal Bioanal Chem*, 372:421e5.

Wiseman, D.A., Wells, S.M., Wilham, J., Hubbard, M., Welker, J.E. and Black, S.M. 2006. Endothelial response to stress from exogenous Zn²⁺ resembles that of NO-mediated nitrosative stress, and is protected by MT-1 overexpression. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 291: 555-568.

Wright, K.J., Balaji, R., Hill, C.M., Dritz, S.S., Knoppel, E.L. and Minton, J.E. 2000. Integrated adrenal, somatotrophic, and immune responses of growing pigs to treatment with lipopolysaccharide. *Journal of Animal Science*, 78(7): 1892-1899.

Wu, G., Knabe, D.A. and Flynn, N.E. 1994a. Synthesis of citrulline from glutamine in pig enterocytes. *Biochem. J.*, 299: 115–121

Wu, G., Borbolla, A.G. and Knabe, D.A. 1994b. The uptake of glutamine and release of arginine, citrulline and proline by the small intestine of developing pigs. *J. Nutr.*, 124: 2437-2444.

Wu, G. and Knabe, D.A. 1995. Arginine synthesis in enterocytes of neonatal pigs. *Am. J. Physiol.*, 269: R621–R629.

Wu, G., Meier, S.A. and Knabe, D.A. 1996. Dietary glutamine supplementation prevents jejunal atrophy in weaned pigs. *J Nutr*, 126:2578–2584.

Wu, G. 1997. Synthesis of citrulline and arginine from proline in enterocytes of postnatal pigs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 272: 1382–1390.

Wu, G. and Morris, S.M. 1998. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J*, 336: 1-17.

Wu, G. 1998. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J Nutr*, 128: 1249–1252.

Wu, G., Meininger, C.J., Knabe, D.A., Bazer, F.W. and Rhoads, J.M. 2000a. Arginine nutrition in development, health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 3: 59–66.

Wu, G., Flynn, N.E., Knabe, D.A. and Jaeger, L.A. 2000b. A cortisol surge mediates the enhanced polyamine synthesis in porcine enterocytes during weaning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279: 554–559.

Wu, G. and Meininger, C.J. 2002. Regulation of nitric oxide synthesis by dietary factors. *Annu Rev Nutr*, 22: 61–86.

Wu, G., Knabe, D.A. and Kim, S.W. 2004. Arginine: nutrition in neonatal pigs. *J Nutr*, 134: 2783–2790.

Wu, G., Bazer, F.B., Davis, T.A., Kim, S.W., Li, P., Rhoads, J.M., Satterfield, M.C., Smith, S.B., Spencer, T.E. and Yin, Y. 2009. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids*, 37(1): 153–168.

Wu, X., Ruan, Z., Gao, Y., Yin, Y., Zhou, X., Wang, L., Geng, M., Hou, Y. and Wu, G. 2010. Dietary supplementation with L-arginine or N-carbamylglutamate enhances intestinal growth and heat shock protein-70 expression in weanling pigs fed a corn- and soybean meal-based diet. *Amino Acids*, 39: 831-839.

Wuana, R.A. and Okieimen, F.E. 2011. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecol*. Article ID 402647.

Wyns, H., Plessers, E., De Backer, P., Meyer, E. and Croubels, S. 2015. In vivo porcine lipopolysaccharide inflammation models to study immunomodulation of drugs. *Veterinary immunology and immunopathology*, 166: 58-69.

- Xia, Y.F., Liu, L.P., Zhong, C.P., Geng, J.G. 2001. NF-kappaB activation for constitutive expression of VCAM-1 and ICAM-1 on B lymphocytes and plasma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289 (4): 851–856.
- Xia, P., Zou, Y., Wang, Y., Song, Y., Liu, W., Francis, D. H. and Zhu, G. 2015. Receptor for the F4 fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Applied microbiology and biotechnology*, 99(12): 4953-4959.
- Xiang, P., Baird, L.M., Jung, R., Zeece, M.G., Markwell, J. and Sarath, G. 2008. P39, a novel soybean protein allergen, belongs to a plant-specific protein family and is present in protein storage vacuoles. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 2266–2272.
- Xu, R.J. 2003. Gastrointestinal secretory function. In: R. J. Xu, P. D. Cranwell (eds), *The Neonatal Pig: Gastrointestinal Physiology and Nutrition*. Nottingham University Press, Thrumpton, Nottingham, pp. 117.
- Yamaoka, J., Kume, T., Akaike, A. and Miyachi, Y. 2000. Suppressive effect of zinc ion on iNOS expression induced by interferon-gamma or tumor necrosis factor-alpha in murine keratinocytes. *J Dermatol Sci.*, 23(1):27-35.
- Yang, F., Wang, A., Zeng, X., Hou, C., Liu, H. and Qiao, S. 2015. *Lactobacillus reuteri* I5007 modulates tight junction protein expression in IPEC-J2 cells with LPS stimulation and in newborn piglets under normal conditions. *BMC microbiology*, 15(1): 32.
- Yao, K., Yin, Y.L., Chu, W.Y., Liu, Z.Q., Deng, D., Li, T.J., Huang, R.L., Zhang, J.S., Tan, B.E., Wang, W. and Wu, G. 2008. Dietary arginine supplementation increases mTOR signaling activity in skeletal muscle of neonatal pigs. *J Nutr*, 138:867–872.
- Yao, K., Guan, S., Li, T., Huang, R., Wu, G., Ruan, Z. and Yin, Y. 2011. Dietary L-arginine supplementation enhances intestinal development and expression of vascular endothelial growth factor in weanling piglets. *Brit. J. Nutr.*, 105: 703-709.
- Yen, J. 2000. Anatomy of the digestive system and nutritional physiology. In: A. J. Lewis, L. L. Southern (eds), *Swine Nutrition*. CRC Press, Florida, USA, pp. 32.
- Yin, J., Li, X., Li, D., Yue, T., Fang, Q., Ni, J., Zhou, X. and Wu, G. 2008. Dietary supplementation with zinc oxide stimulates ghrelin secretion from the stomach of young pigs. *J. Nutr. Biochem.*, 10: 783-790.
- Yin, J., Wu, M.M., Xiao, H., Ren, W.K., Duan, J.L., Yang, G., Li, T.J. and Yin, Y.L. 2014. Development of an antioxidant system after early weaning in piglets. *Journal of animal science*, 92(2): 612-619.
- Zhang, Y. and Xu, R.J. 2003. Anatomy and histology of the gastrointestinal tract. In: R. J. Xu, P. D. Cranwell (eds), *The Neonatal Pig: Gastrointestinal Physiology and Nutrition*. Nottingham University Press, Thrumpton, Nottingham, UK, pp. 1.

Zhang, B. and Guo, Y. 2009. Supplemental zinc reduced intestinal permeability by enhancing occludin and zonula occludens protein-1 (ZO-1) expression in weaning piglets. *British journal of nutrition*, 102(05): 687-693.

Zhao, Y., Qin, G., Sun, Z., Zhang, X., Bao, N., Wang, T., Zhang, B., Zhang, B., Zhu, D., Sun, L., 2008. Disappearance of immunoreactive glycinin and beta-conglycinin in the digestive tract of piglets. *Arch. Anim. Nutr.*, 62: 322–330.

Zhu, L.H., Zhao, K.L., Chen, X.L. and Xu, J.X. 2012. Impact of weaning and an antioxidant blend on intestinal barrier function and antioxidant status in pigs. *J. Anim. Sci.*, 90: 2581-2589.