

La Tributyrine : des effets biologiques permettant l'amélioration des performances et favorisant l'intégrité du tractus gastro-intestinal chez le porc

Koen SCHWARZER(1) et Jenny BJORK (2)

(1) Perstorp BV, Industrieweg 8, Waspik, Pays-Bas

(2) Perstorp AB, Perstorp Industriepark, Suède

Koen.schwarzer@perstorp.com

Tributyryl : biological effects to stimulate animal performance and the integrity of the intestinal tract in pigs.

Tributyryl (TBU) is a triglyceride which not only supplies energy, but also provides butyric acid for the development and maintenance of the epithelium of the intestinal tract. Two tests *in vitro* and *in vivo* support the hypothesis that Tributyrin, via diet supplementation, is not significantly hydrolyzed under stomach conditions. The *in vitro* test also demonstrates that pancreatic lipase splits of two butyric acid molecules, while one butyric acid molecules remains bound to glycerol, forming Monobutyryl.

INTRODUCTION

La Tributyrine (TBU) constitue un apport original d'acide butyrique et développe des effets bénéfiques sur la morphologie intestinale. L'acide butyrique pur ou les sels d'acide butyrique sont absorbés dans l'estomac. En revanche, apportée via le bol alimentaire, la TBU, issue de la réaction d'estérification entre l'acide butyrique et le glycérol, n'est pas altérée dans l'estomac. Elle peut donc atteindre l'intestin grêle (Hou *et al.*, 2014). Les essais présentés ici valident l'hypothèse que cette supplémentation alimentaire en TBU passe l'estomac sans déperdition et libère de l'acide butyrique dans l'intestin. Le test *in vitro* est basé sur les méthodes d'incubation simulant les conditions de l'estomac et de l'intestin grêle. Le test *in vivo* mesure chez les porcelets l'effet de régimes supplémentés en TBU, en prélevant certaines parties d'intestin et en mesurant l'acide butyrique en l'état ou après hydrolyse.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Protocole *in vitro*

1.1.1. Incubation (Boisen *et al.*, 1997)

Pour la première incubation (modèle stomacal), un échantillon de 0,36 g a été pesé et dissous dans 25 ml de tampon de phosphate 0,1 M, pH 6. Ont ensuite été ajoutés à cette solution 10 ml de HCl 0,2 M, le pH étant ajusté à $2,0 \pm 0,05$, puis 1 ml de solution de pepsine (25 mg/ml, Sigma P7000). La solution a été incubée à 39° C sous agitation. Les échantillons pour analyse par chromatographie en phase liquide ont été prélevés après 30, 60 et 120 mn d'incubation. Pour la seconde incubation (modèle intestinal), 10 ml de phosphate (pH 6,8) et 5 ml de NaOH 0,6 M ont été ajoutés à la

solution précédente. Le pH est ajusté à $6,8 \pm 0,05$ avec une solution de NaOH 1M ou HCl; enfin 1 ml de solution de pancréatine (100 mg/ml, Sigma P1750) a été ajouté. La solution a été incubée à 39° C sous agitation. Les échantillons pour analyse par chromatographie en phase liquide ont été prélevés après 30, 60, 120 et 240 mn d'incubation.

1.1.2. Chromatographie en phase liquide

Les échantillons sont injectés dans une chromatographe équipée d'une colonne de type Genesis C18 (150*4 4µm) et d'un détecteur en UV à 210 nm. Les esters et l'acide butyrique sont élués par deux éluants; l'éluant A: 95% du tampon phosphate pH 2,3/ 5% Acétonitrile, et l'éluant B: 10% eau/90% Acétonitrile, avec un débit de 1,0 ml.

1.2. Protocole expérimental *in vivo*

1.2.1. Protocole sur animaux

Dix porcelets de 4 semaines ont été logés individuellement et nourris deux fois par jour. Pendant la semaine suivant la mise en place, période d'adaptation, tous les porcelets ont reçu l'aliment témoin (19,0 % de MAT et 10,39 MJ EN). Les 2 semaines suivantes, cinq porcelets ont reçu le régime témoin et cinq porcelets le régime supplémenté à la TBU (ProPhorce SR sous forme de poudre, soit 4 kg TBU/tonne d'aliment). Après 3 semaines, tous les porcelets ont été sacrifiés et leurs digesta ont été échantillonnés, à raison, après congélation, de 10 points de prélèvement entre le duodénum et le côlon distal.

1.2.2. Les analyses d'acide butyrique libre et lié

Les échantillons congelés fournis au laboratoire Alimetrix (Finlande), ont été décongelés. L'hydrolyse de la TBU dans le tube digestif a été suivie par analyse de l'acide butyrique libre dans les échantillons de digesta, suivant la méthode publiée par Holben *et al.* (2002). Les échantillons de digesta sont hydrolysés afin de libérer tout l'acide butyrique lié au glycérol.

Dix millilitres de KOH (7 M) ont été mélangés à 1 g d'échantillon de digesta et incubés durant 6 h à 65 °C. Puis l'hydrolyse a été arrêtée en neutralisant le mélange. A partir de cette étape, le protocole suit à nouveau la méthode utilisée pour l'analyse des acides libres (ci-dessus). La teneur en acide butyrique total contenue dans l'échantillon, comparée à celle en acide butyrique libre avant hydrolyse, permet de calculer la concentration en acide butyrique libre ou lié dans l'échantillon. Les concentrations en acide butyrique (avant et après hydrolyse) ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse

1.3. Analyse statistique

L'analyse statistique s'appuyait sur le test t-Student pour tous les paramètres mesurés. Les tests ont été effectués contre le traitement du contrôle selon les tests post-hoc de Dunnett.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Protocole *in vitro*

Pendant la première incubation (simulation de l'environnement stomacal), les niveaux de TBU et d'acide butyrique sont demeurés inchangés : cela signifie que l'estomac a un impact très limité sur l'hydrolyse de la TBU. Au cours de la seconde incubation (remontée du pH et ajout de la solution de pancréatine), on observe rapidement que deux tiers de l'acide butyrique sont libérés et que de la Monobutyryne est formée (Figure 1).

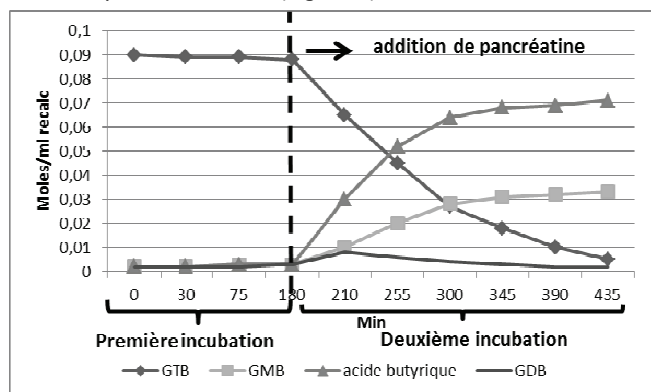


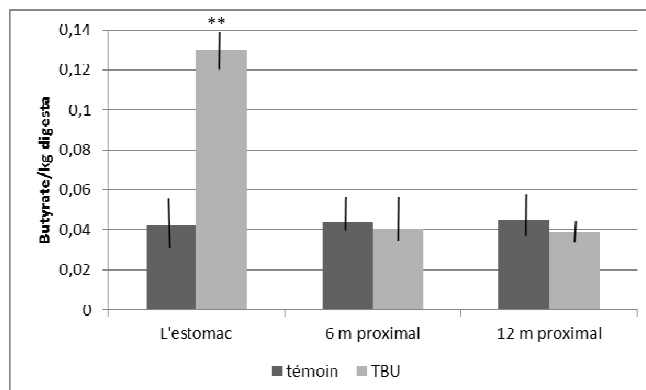
Figure 1 – Hydrolyse de Tributyrine. Concentrations en Tributyrine (GTB), Monobutyryne (GMB), Dibutyryne (GDB) et acide butyrique au cours des deux phases d'incubation

2.2. Protocole *in vivo*

L'acide butyrique est présent dans l'estomac sous forme de TBU ; en effet, la différence de concentration en acide butyrique entre les échantillons hydrolysés et ceux non-hydrolysés est significativement ($P < 0,01$) plus élevée chez les porcs supplémentés que chez les témoins (Figure 2)

Aucune différence de concentration en acide butyrique entre les traitements TBU et témoin n'a été observée dans des échantillons prélevés à plus de 6 m dans l'intestin grêle ainsi que dans les échantillons prélevés plus en aval.

Ces résultats suggèrent fortement que la TBU est hydrolysée en acide butyrique et absorbée très en amont dans l'intestin grêle.



Les colonnes indiquent la différence de concentration de l'acide butyrique avant et après l'étape d'hydrolyse. Les barres dans les colonnes sont les erreurs-types entre cinq échantillons répétés. Le double astérisque signale une différence statistique (test T – Student, $P < 0,01$)

Figure 2 – Hydrolyse de l'acide butyrique dans le tube digestif.

CONCLUSION

Les deux tests, *in vitro* et *in vivo*, confortent l'hypothèse que la TBU n'est dégradée significativement que dans la première portion de l'intestin.

La méthode *in vitro* montre aussi que deux molécules d'acide butyrique sont libérées à partir de la TBU par la lipase et une molécule reste liée au glycérol, formant la Monobutyryne.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Boisen S., Fernandez J.A. et al, 1997. Prediction of total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by *in vitro* analyses. Anim. Feed Sci. Technol., 68, 277-286.
- Holben W.E., Williams P., Gilbert M.A., Saarinen M., Sarkilahti L.K., Apajalahti J.H.A., 2002. Phylogenetic analysis of intestinal microflora indicates a novel Mycoplasma phylotype in farmed and wild salmon. Microb. Ecol., 44, 175-85.
- Hou Y., Wang L., Yi D., Ding B., Chen X., Wang O., Zhu H., Liu Y., Yin J., Gong J. and Wu G., 2014. Dietary supplementation with tributyrin alleviates intestinal injury in piglets challenged with intrarectal administration of acetic acid. British J. Nutr., 11, 1748-1758.