



# Suivi de minéraux de la solubilisation à l'absorption : un modèle de digestion *in vitro* complet

Edouard COUDERT (1), Eva DUPUIS (1), Lun Jing (2), Frank JAMOIS (2)

(1) Centre Mondial de l'Innovation Roullier, Nutrition Animale, 18 av. Franklin Roosevelt, 35400 Saint-Malo, France

(2) Centre Mondial de l'Innovation Roullier, Plateformes Analytiques de Recherche, 18 av. Franklin Roosevelt, 35400 Saint-Malo, France

edouard.coudert@roullier.com

## From solubilization to intestinal absorption of minerals: a complete *in vitro* digestion model

Screening new ingredients for animal nutrition is the first key step before developing new products. The most effective approach is to conduct *in vivo* assays, but because they can assess only a few samples and animals at once, several *in vitro* assays are necessary to better choose the prototypes and concentrations to be tested. We developed a complete *in vitro* digestion model from gastric solubilization to intestinal absorption. Our assay was divided into two main steps: solubilization (of a complete diet formulated *in silico* with increasing supplementation with magnesium oxide (MgO), based on the literature and adjusted to improve efficiency and repeatability), and absorption (by differentiated Caco-2 cells cultivated on inserts). Before each absorption test, integrity of the intestinal membrane was assessed by TransEpithelial and Endothelial Resistance (TEER). Samples of the liquid phase containing solubilized minerals obtained during two phases of digestion (gastric and intestinal) were withdrawn. These samples were then tested at different concentrations with a differentiated intestinal barrier in the apical phase, representing the intestinal lumen. After a given time, the basal phase, representing post-absorption/blood, was withdrawn. Each sample, from diets, solubilization phases and the post-absorption test, was analysed by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-OES) to measure mineral concentration. The results obtained by ICP-OES were analysed using R software (Student's t-test, ANOVA). Our results screened each mineral and trace element (focusing on Mg in this paper) and were able to differentiate the most or least effective dose before an *in vivo* assay. We developed a complete new *in vitro* model to mimic monogastric digestion. This method can be used before *in vivo* assays as an effective way to meet animal-use restrictions by drastically reducing animal numbers in assays.

## INTRODUCTION

Les minéraux représentent un faible pourcentage massique de la ration alimentaire de la filière porcine (troupe, porcelet, porc) mais ont des fonctions importantes et variées pour l'animal. Parmi ces minéraux, le magnésium (Mg) est un macro-élément présent en faible quantité dans l'organisme (autour de 0,05%, dont 60% dans les os) (Jahnen-Dechent and Ketteler, 2012). Le Mg est un cofacteur de centaines de réactions enzymatiques, impliquées notamment dans le métabolisme des glucides et des lipides, la synthèse protéique et le métabolisme énergétique en général. Les apports en Mg nécessaires pour le porc se situent autour de 0,04% de l'aliment. De nombreuses études ont cependant montré qu'une supplémentation en Mg dans la ration améliorerait la qualité de la viande, avec une réduction de la perte en eau et une meilleure couleur des produits (D'Souza *et al.*, 1998), et permettait également de réduire le stress des animaux, particulièrement des truies et des porcelets avant et après le sevrage (Bushby *et al.*, 2021). La biodisponibilité du Mg dans l'aliment et au cours de la digestion représente un enjeu majeur de cette filière. Cet article a ainsi pour but de présenter une méthode efficace et fiable pour déterminer la solubilisation du Mg provenant d'une supplémentation en MgO (oxyde de magnésium) dans un modèle de digestion *in vitro* et son absorption par une membrane cellulaire intestinale de Caco-2, différenciée en cellules intestinales polarisées mimant

fidèlement la membrane cellulaire intestinale riche en villosités, jonctions serrées, et transporteurs spécifiques (Lea, 2015).

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Echantillons

Un total de quatre échantillons a été utilisé pour cet essai : un aliment porc charcutier complet (T), l'aliment T supplémenté avec 0,10% de MgO (S0,1), l'aliment T avec 0,25% de MgO (S0,25), et l'aliment T supplémenté avec 0,50% de MgO (S0,5). Cet effet-dose permet de suivre la solubilisation du Mg au cours des phases digestives tout en évitant la saturation des transporteurs cellulaires dans les cellules Caco-2.

### 1.2. Modèle de digestion *in vitro*

Notre modèle de digestion *in vitro* est un modèle à trois étapes (pré-gastrique, gastrique, intestinale) basé sur des travaux déjà publiés (Chen *et al.*, 2019) avec des modifications améliorant la répétabilité et la précision des mesures. 1 g de chaque échantillon a été placé sous agitation à 37°C pendant 30 minutes dans une solution pré-gastrique de pH 7,0 contenant de l'alpha-amylase ; puis pendant 120 minutes dans une solution gastrique de pH 2,0 contenant de la pepsine ; puis pendant 170 minutes dans une solution intestinale de pH 7,0 contenant de la pancréatine et des sels biliaires. A l'issue de

cette digestion *in vitro*, les échantillons ont été séparés par centrifugation. La partie surnageante, le jus iléal, contient l'ensemble des molécules solubilisées disponibles dans l'estomac ou l'intestin, tandis que le culot, le digestat, contient toutes les molécules non solubilisées, potentiellement non disponibles à l'absorption intestinale. Les jus iléaux et digestats ont été récupérés à la fin de la phase gastrique et à la fin de la phase intestinale pour analyses par ICP-OES (voir 1.4).

### 1.3. Modèle cellulaire intestinal (Caco-2) d'absorption minérale

La lignée cellulaire Caco-2 a été achetée à l'ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures, UK) et cultivée sur inserts (0,4 µm) dans du milieu complet (DMEM, 10% Sérum de Veau Foetal, 1% d'acides aminés non essentiels, 1% d'antibiotiques). Une fois ces cellules pleinement différenciées et validées par une mesure de la TEER (trans epithelial endothelial resistance), le jus iléal récupéré de la digestion *in vitro* (phase intestinale) a été placé dans le pôle apical de l'insert pendant 180 minutes, puis les milieux des pôles basal et apical ont été prélevés pour analyse par ICP-OES (voir 1.4).

### 1.4. Mesures analytiques

L'ICP-OES (Spectroscopie d'Emission Optique par Plasma à Couplage Inductif) est une technique permettant de détecter les minéraux (Mg) dans des solutions ou des culots après une attaque acide. Ces analyses sont faites sur les jus iléaux et digestats de la digestion *in vitro* et sur les prélèvements des pôles apicaux et basaux des cultures Caco-2. Les résultats de dosage du Mg sont réalisés en triplicat d'échantillon (3 répétitions par modalités en digestion *in vitro* et sur cellules Caco-2) et d'analyse (3 répétitions d'analyses par échantillon, donc 9 répétitions par modalités). Les analyses statistiques sont faites par tests ANOVA et t-test à l'aide du logiciel R®, en s'intéressant à l'effet de la concentration en MgO sur la solubilisation (DIV) et l'absorption (Caco-2) du Mg dans notre modèle.

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

### 2.1. Digestion *in vitro*

Les résultats de digestion présentés dans le tableau 1 montrent la quantité de Mg solubilisé à chaque phase digestive (gastrique et intestinale) des différentes concentrations de MgO supplémentées dans l'aliment. L'effet-dose de concentration de Mg testé est directement retrouvé dans la quantité de Mg solubilisé ( $r^2 = 0,99$  pour la phase gastrique,  $r^2=0,99$  pour la phase intestinale). Ces résultats démontrent l'absence de

saturation du modèle *in vitro* à de telles concentrations et l'efficacité de ce modèle pour mimer la solubilisation du Mg *in vivo*.

**Tableau 1** – Quantité de Mg solubilisé lors de la digestion *in vitro* (mg/kg)

Aliment	Phase gastrique	Phase intestinale
T	33,8 ± 0,2 <sup>d</sup>	31,34 ± 0,4 <sup>d</sup>
S0,1	40,01 ± 0,6 <sup>c</sup>	35,9 ± 0,5 <sup>c</sup>
S0,25	47,3 ± 0,4 <sup>b</sup>	43,23 ± 1,6 <sup>b</sup>
S0,5	59,8 ± 2,3 <sup>a</sup>	55,6 ± 1,9 <sup>a</sup>
P-value	0,0001	0,0001

### 2.2. Absorption *in vitro*

L'effet-dose de MgO supplémenté dans l'aliment, déjà retrouvé pour la solubilisation du Mg, se retrouve également pour la quantité de Mg absorbé par la membrane cellulaire intestinale différenciée de Caco2 (Tableau 2). Ces quantités absorbées correspondent à un taux d'environ 20% d'absorption du Mg total disponible pour les cellules, un ordre de grandeur représentatif de ce qui a déjà été montré *in vivo* (de Baaij *et al.*, 2012). Cette correspondance avec la littérature *in vivo* soulignerait la validité de notre modèle *in vitro* de digestion monogastrique complète, jusqu'à l'absorption des nutriments ; en attendant des comparaisons *in vitro/in vivo*.

**Tableau 2** – Absorption du Mg solubilisé par une monocouche intestinale différenciée de Caco2

Aliment	Mg absorbé (mg/L)
T	1,8 ± 0,1 <sup>c</sup>
S0,1	2,0 ± 0,0 <sup>bc</sup>
S0,25	2,0 ± 0,0 <sup>b</sup>
S0,5	2,5 ± 0,1 <sup>a</sup>
P-value	0,0077

## CONCLUSION

Cette nouvelle méthode permet de suivre le parcours complet d'éléments nutritifs, de la solubilisation de minéraux d'intérêt grâce à un modèle de digestion *in vitro* en allant jusqu'au suivi de l'absorption de ces minéraux solubilisés directement sur une membrane intestinale différenciée. Cette méthode peut être utilisée pour tester *in vitro* un large panel de matières premières pour ne sélectionner que les plus intéressantes pour un essai *in vivo*. Une telle méthode répond aux demandes de la filière pour valoriser des criblages de matières premières en amont des essais terrain, mieux gérer les ressources et rejets et permettre des essais-terrain plus efficaces tout en réduisant le nombre d'animaux nécessaires.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bushby E.V., Dye L., Collins, L.M. 2021. Is magnesium supplementation an effective nutritional method to reduce stress in domestic pigs? A systematic review. *Front Vet Sci.* 7.
- Chen, H., Wierenga, P.A., Hendriks, W.H., Jansman, A.J.M., 2019. In vitro protein digestion kinetics of protein sources for pigs. *Animal* 13, 1154–1164. <https://doi.org/10.1017/S1751731118002811>
- de Baaij, J.H.F., Hoenderop, J.G.J., Bindels, R.J.M., 2012. Regulation of magnesium balance: lessons learned from human genetic disease. *Clin Kid J.* 5, i15–i24. <https://doi.org/10.1093/ndtplus/sfr164>
- D'Souza, D.N., Warner, R.D., Leury, B.J., Dunshea, F.R., 1998. The effect of dietary magnesium aspartate supplementation on pork quality. *Journal of Animal Science.* 76, 104–109. <https://doi.org/10.2527/1998.761104x>
- Jahnen-Dechent W., Ketteler M. 2012. Magnesium basics. *Clin Kidney J.* 2012 Feb;5(Suppl 1):i3-i14. doi: 10.1093/ndtplus/sfr163.
- Lea T. 2015. Caco-2 Cell Line. In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, et al., editors. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models.* Springer Chapter 10. doi: 10.1007/978-3-319-16104-4\_10