



Profil des acides biliaires chez les porcs consommant du cuivre de différentes sources et à différentes doses

Maria GARBE (1), Gerald RIMBACH (1), Laia BLAVI (2), Hans STEIN (3), Agathe ROMÉO (4),
Alessandra MONTEIRO (4), Ignacio IPHARRAGUERRE (1)

(1) Université de Kiel, Christian-Albrechts-Platz 4, 24118 Kiel, Allemagne

(2) AB Neo, PL Fraga C/ Comunidad de Murcia parc. LIE 1-03, 22520 Fraga, Espagne

(3) Université d'Illinois, 1207 West Gregory Drive, 61801 Illinois, Etats-Unis

(4) Animine, 10 rue Léon Rey Grange, 74960 Annecy, France

aromeo@animine.eu

Bile acid profile in pigs fed different levels and sources of copper

Bile acids (BA) are synthesized in the liver (primary BA), conjugated to glycine or taurine (conjugated BA), and released in the intestine. In their conjugated form, they are efficient emulsifiers that improve lipid digestion. However, they can be deconjugated by the gut microbiota via the enzyme bile salt hydrolase (BSH). The objective of this study was to explore whether high levels of Cu from different sources have differential impacts on BA metabolism and BSH activity in finishing pigs. Samples of colon and liver were obtained from a study in which 120 pigs were randomly allotted to 3 treatments (8 pens/treatment) for 120 days. Treatments were a negative control diet (NC, 25 mg Cu/kg) plus the NC diet supplemented with 250 mg/kg of Cu from either CuSO₄ or Cu₂O. On day 120, 8 pigs/treatment were sacrificed to obtain samples of tissues and colonic digesta that were later used to quantify BA via UPLC-MS. In addition, an *in vitro* enzymatic assay was performed to examine the impact of different Cu sources (CuSO₄, CuCl₂, Cu₂O, CuO) on BSH activity. Compared to the other two treatments, feeding Cu₂O increased ($P < 0.009$) the concentrations of conjugated BA in colonic digesta. Feeding Cu₂O reduced the concentration of secondary BA (lithocholic acid) compared to the CuSO₄ group: significantly ($P < 0.05$) in the liver. Regarding the enzymatic assay, compared to the control, all tested compounds reduced ($P < 0.01$) the activity of rBSH. The highest rBSH inhibition was observed for the Cu₂O source. These results demonstrate that high levels of Cu alter BA profiles, most likely by modifying intestinal BSH activity.

INTRODUCTION

Les acides biliaires (AB) sont des molécules essentielles pour l'émulsification et la digestion des lipides. Ils sont synthétisés dans les hépatocytes (AB primaires), conjugués à la glycine ou à la taurine (AB conjugués), stockés dans la vésicule biliaire, puis libérés dans l'intestin (Joyce *et al.*, 2014). Ils peuvent être déconjugés par une enzyme, l'hydrolase des sels biliaires (Bile Salt Hydrolase BSH), produite par le microbiote intestinal (Ipharraguerre *et al.*, 2018). Les bactéries peuvent ensuite convertir les AB déconjugés en AB secondaires (Alnouti, 2009). Les AB déconjugés sont inefficaces pour l'émulsification des lipides. Pour cette raison, les additifs capables de réduire l'activité de la BSH peuvent promouvoir la croissance des animaux grâce à la meilleure utilisation des matières grasses (Lin *et al.*, 2014).

La supplémentation en cuivre (Cu) peut agir sur le métabolisme du cholestérol, un des précurseurs des AB (Lei *et al.*, 2017). Par ailleurs, cet élément pourrait avoir un effet inhibiteur sur la BSH (Wang *et al.*, 2012), et donc modifier indirectement le profil des AB dans le tractus gastro-intestinal. L'objectif de notre étude était de tester l'impact de différentes doses et sources de cuivre sur le métabolisme des AB.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Tests sur des échantillons de foie et de colon

Des échantillons de foie et de colon ont été obtenus sur des porcs (L 359 x Camborough, mâles et femelles) après un essai mené aux États-Unis. Les animaux avaient été étudiés pendant 17 semaines, de deux semaines après le sevrage (35 jours d'âge) jusqu'à l'abattage (environ 120 jours). Ils avaient consommé un aliment de base avec 25 mg/kg Cu apportés par un sulfate de cuivre, CuSO₄, ou un aliment expérimental avec 250 mg/kg Cu, apportés par CuSO₄ ou par un cuivre monovalent (Cu₂O, CoRouge®). Le cuivre monovalent avait significativement augmenté le poids des porcs (Blavi *et al.*, 2021).

Les échantillons de tissus (foie et colon) ont été prélevés à la fin de l'essai, sur huit porcs par traitement. Ils ont été envoyés à l'Université de Kiel, en Allemagne, où ils ont été homogénéisés dans un TissueLyser II (Qiagen, Germany), dilués et centrifugés. Les AB ont été quantifiés par UPLC-MC.

1.2. Essai *in vitro* : évaluation de l'activité de la BSH

Une étude *in vitro* a été menée avec plusieurs sources de cuivre pour mesurer leur effet sur l'activité enzymatique de la BSH :

10 µl d'une BSH recombinante rBSH (1 µg/µl) ont été ajoutés à 96 milieux contenant du sulfoxyde de diméthyle (DMSO), avec 35 µl de tampon phosphate salin et 5 µl des produits testés. Quatre sources de cuivre ont été évaluées (CuSO₄, CuCl₂, Cu₂O, CuO), avec KIO₃ et KIO₄ comme contrôles. La concentration finale des produits était 2 mM Cu (équivalent à 250 ppm Cu dans l'aliment). Ensuite, 50 µl d'acide chénodésoxycholique (CDCA) « luciferin-caged » ont été ajoutés et les échantillons ont été incubés 1 h à 37 °C.

L'activité de la rBSH a été mesurée par bioluminescence. L'inhibition de l'activité est calculée relativement à l'activité du DMSO, puis multipliée par 100.

1.3. Analyses statistiques

Le logiciel GraphPad (version 9.3.1) a été utilisé. Les données ont été analysées par ANOVA, puis avec le test de Tukey si le test ANOVA indiquait des différences entre les traitements. Les différences étaient considérées significatives avec $P < 0,05$.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

La source Cu₂O a réduit la concentration d'AB secondaires (acide lithocolique, LCA) comparé à CuSO₄ dans le foie ($P < 0,05$). Ces LCA correspondent à des AB réabsorbés par l'intestin : 95 % des AB sont réinjectés dans le cycle entéro-hépatique (Chiang, 2013).

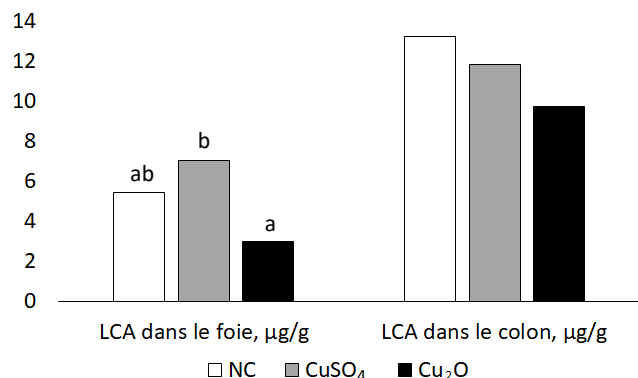


Figure 1 – Concentration d'acide lithocolique (LCA) dans le foie et dans le colon

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

Comparé avec le contrôle négatif et la source standard CuSO₄, le cuivre monovalent a augmenté ($P < 0,01$) les concentrations d'AB conjugués dans le contenu du colon : 5,0 µg/g versus 3,5 µg/g pour le contrôle et 2,7 µg/g pour CuSO₄. En ce qui concerne le test sur l'activité enzymatique, toutes les sources ont réduit ($P < 0,01$) l'activité de la BSH. Le plus grand pouvoir inhibiteur a été mesuré avec Cu₂O.

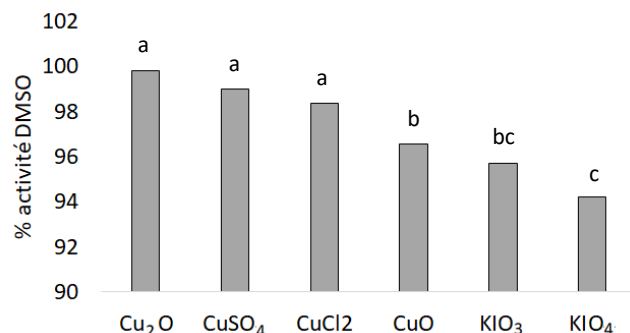


Figure 2 – Mesure *in vitro* de l'inhibition de la rBSH par quatre sources de cuivre et deux contrôles (KIO₃ et KIO₄)

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

L'action de la BSH aboutit à une déconjugaison et à une déshydroxylation des AB conjugués, et à la formation d'AB secondaires avec une propriété détergente réduite (Knarreborg et al., 2002), ce qui affecte l'absorption des matières grasses dans l'intestin. L'effet positif de l'élément Cu sur le gain de poids pourrait être lié à son action inhibitrice sur la BSH.

Le Cu monovalent a amélioré la croissance des porcs dans des études antérieures, avec une accumulation réduite de Cu dans le foie (Roméo et al., 2018). Son action pourrait être partiellement expliquée par son effet sur le métabolisme des AB, et notamment par son effet sur la BSH.

CONCLUSION

En conclusion, ces résultats montrent que des niveaux élevés de Cu peuvent affecter le métabolisme des AB, notamment en modifiant l'activité de la BSH intestinale. Les propriétés antimicrobiennes du Cu, qui pourraient affecter directement les bactéries productrices de BSH, constituent également une hypothèse intéressante à étudier.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alnouti Y., 2009. Bile Acid sulfation: a pathway of bile acid elimination and detoxification. *Toxicol. Sci.*, 108, 225-246.
- Blavi L., Solà D., Monteiro A., Pérez J. P., Stein H. H., 2021. Inclusion of dicopper oxide instead of copper sulfate in diets for growing-finishing pigs results in greater final body weight and bone mineralization, but reduced accumulation of copper in the liver. *J. Anim. Sci.*, 99, 1-8.
- Chiang J.Y., 2013. Bile acid metabolism and signaling. *Comp. Physiol.*, 3, 1191-212.
- Ipharraguerre I. R., Pastor J. J., Gavaldà-Navarro A., Villarroya F., Mereu A., 2018. Antimicrobial promotion of pig growth is associated with tissue-specific remodeling of bile acid signature and signaling. *Sci. Rep.*, 8, 13671.
- Joyce S. A., MacSharry J., Casey P. G., Kinsella M., Murphy E. F., Shanahan F., Hill C., Gahan C. G. M., 2014. Regulation of host weight gain and lipid metabolism by bacterial bile acid modification in the gut. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 111, 7421-7426.
- Knarreborg A., Engberg R. M., Jensen S. K., Jensen B. B., 2002. Quantitative determination of bile salt hydrolase activity in bacteria isolated from the small intestine of chickens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 6425-6428.
- Lei L., Xiaoyi S., Fuchang L., 2017. Effect of dietary copper addition on lipid metabolism in rabbits. *Food Nutr. Res.*, 61, 1348866.
- Lin J., 2014. Antibiotic growth promoters enhance animal production by targeting intestinal bile salt hydrolase and its producers. *Front. Microbiol.*, 5, 1-4.
- Roméo A., Durosoy S., van Baal J., Bikker P., 2018. Effet de deux sources de cuivre sur les performances et le statut en cuivre de porcelets sevrés. *Journées Rech. Porcine*, 50, 131-136.
- Wang Z., Zeng X., Mo Y., Smith K., Guo Y., Lin J., 2012. Identification and characterization of a bile salt hydrolase from *Lactobacillus salivarius* for development of novel alternatives to antibiotic growth promoters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78, 8795-8802.