LA MONOBUTYRINE: UN PROMOTEUR DE CROISSANCE ET PRODUIT DE PRÉVENTION ET THÉRAPIE CONTRE LES INFECTIONS ENTÉRIQUES COMMUNES DES POULETS DE CHAIR

Antongiovanni Mauro [1], Massi Paola [2], Tosi Giovanni [2], Parini Manuela [3], Buccioni Arianna [1], Tempesta Bruno [4], Minieri Sara [1]

[1]Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Sez. Scienze Animali, Università di Firenze, via delle Cascine, 5 - 50144 FIRENZE, ITALIE
[2]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, via G. Marchini, 1 - 47100 FORLÌ, ITALIE
[3]SILO S.p.A., via S. Bartolo a Cintoia, 104 - 50142 FIRENZE, ITALIE
[4] Nutritionniste free-lance, via Sicilia, 57 – 31033 CASTELFRANCO VENETO-TREVISO, ITALIE
mauro.antongiovanni@unifi.it

RESUME

L'acide butyrique a des propriétés de promoteur de croissance étant donné qu'il stimule le développement de la muqueuse intestinale, augmente la taille des villosités et est un agent antimicrobien sélectif envers certains micro-organismes pathogènes intestinaux. L'objectif de cette étude était de vérifier l'action de promoteur de croissance de la monobutyrine sur la volaille, et son action antimicrobienne contre la *Salmonella* Typhimurium. Il est reconnu que l'action antibactérienne des monoglycérides n'est pas conditionnée par le pH de l'environnement ; ceci étant démontré par leur activité à pH acide comme à pH 7. En outre, la monoglycéride ne se dissocie pas dans l'estomac mais, bien qu'elle exerce là-aussi une action antibactérienne, arrive dans l'intestin où elle continue d'agir. Pour pouvoir en vérifier l'action *in vivo,* des essais ont été réalisés, un de « performance » sur des poulets de chair, avec monobutyrine à 3 niveaux de concentration (0.4 ; 0.8 et 1.6%) et deux tests microbiologiques sur des poulets infectés avec *Salmonella* typhimurium par voie œsophagienne à différents moments (7 et 10 jours), à différents niveaux (10^3 et 10^7 CFU/ml), avec des traitements de durée différentes (de 5 à 34 jours), à des moments différents (de 0 à 25 jours) et à divers niveaux (de 0.3 à 1.4% de monobutyrine) dans différents supports (aliment ou eau de boisson). Les résultats ont fourni les indications suivantes : i) la monobutyrine a induit des meilleures croissances chez les poulets traités avec des indices de consommation comparables ; ii) la monobutyrine a réduit les CFU de *Salmonella* dans le caeca jusqu'à zéro.

ABSTRACT

Monobutyrin: a growth promoter and an agent for prevention and treatment of common gut infections of broiler chickens.

Butyric acid is a well-known growth promoting factor because of its double action as a stimulator of the development of intestinal mucosa and of the growth of villi and as a selective antimicrobial agent against some pathogenic intestinal microorganisms. Aim of the present study was to verify both the growth promoting action of monobutyrin and its antimicrobial action against *Salmonella* Typhimurium. It is a well-known fact that the antibacterial action of monoglycerides is not conditioned by the environmental pH; in fact, such activity is exerted both at acid pH values and at pH 7. Moreover, the monoglyceride doesn't dissociate in the stomach and, even exerting there its antibacterial action, reaches the intestine where it keeps working. In order to verify these actions in vivo, some trials have been designed: one growth performance trial with broilers, with monobutyrin at 3 concentration levels (0.4; 0.8 and 1.6%) and two microbiological tests with challenged birds, infected with *Salmonella* typhimurium via oesophagus, at different ages (7 and 10 days), at different levels (10^3 et 10^7 CFU/ml), at different treatment durations (from 5 to 34 days), starting from different ages (from 0 to 25 days) and at different concentrations (from 0.3 to 1.4% of monobutyrin) on different vehicles (feed or drinking water). The results provided the following information: i) monobutyrin promoted better growths in treated birds, with comparable feed/gain ratios; ii) monobutyrin resulted efficient in reducing down to zero the CFU's of *Salmonella* in the birds' caeca.

INTRODUCTION

L'acide butyrique est un acide gras volatile produit naturellement dans le tube digestif par fermentation microbienne des hydrates de carbone présents dans les aliments. Diverses propriétés importantes ont été reconnues à l'acide butyrique :
- il est considéré comme essentiel chez les nouveau-né pour le développement correct des cellules épithéliales de la muqueuse du tube digestif et en particulier des villosités (Sakata, 1987; Pryde et al., 2002);
- il stimule le système immunitaire au niveau intestinal (Friedman et Bar-Shira, 2005);
- il améliore l'absorption des éléments nutritifs et le rendu en carcasse des poulets (Leeson et al., 2005 ; Antongiovanni et al., 2007 ; 2010)
- comme d'autres acides gras à chaîne courte, il exerce une action antimicrobienne sélective envers certains pathogènes intestinaux communs parmi lesquels les Salmonelles (Kwan et Ricke, 1998; Van der Wielen et al., 2000; Jósefiac et al., 2004).

La forme sous laquelle l'acide butyrique agit le plus efficacement est sous la forme non dissociée (Van der Wielen, 2002). L'acide butyrique, come les autres acides organiques, agit plus efficacement quand il est présent sous forme indissociée (Van der Wielen, 2002). Pour être sous forme indissociée, il doit se trouver en milieu acide ; pH compris entre 1 et 5,5. Toutefois, dans l'intestin, où le pH est compris entre 6 et 7, l'acide butyrique est présent sous forme essentiellement dissociée, ce qui limite son action antibactérienne.

De nombreuses études ont démontré que les monoglycérides des acides gras peuvent exercer une action antibactérienne plus forte des acides gras eux-mêmes, même à pH compris entre 6 et 7 (Kabara et al. 1972 ; Thormar et al. 2006).

Le monoglycéride de l'acide butyrique, la monobutyrine, est chimiquement stable à pH compris entre 1 et 7, et exerce, comme les autres monoglycérides, une activité antibactérienne à pH compris entre 1 et 7.

Le but de ce travail a été double : d'une part vérifier l'action de promoteur de croissance de la monobutyrine dans les conditions d'élevage expérimental contrôlé de poulets, en absence d'infection induite et, d'autre part, mesurer l'efficacité de l'action antibactérienne de la monobutyrine envers *Salmonella* Typhimurium, sur des poussins infectés par voie œsophagienne.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Essai de performance

L'essai de performance, dont le but était de vérifier l'action de promoteur de croissance du produit commercial « Monobutyrine Hydro C4 », fourni par SILO S.p.A., Florence (Italie), chez des animaux non infectés artificiellement, a été effectué sur l'élevage expérimental du Département de Biotechnologies agraires, section Sciences animales, de l'Université de Florence. L'essai a porté sur 80 poulets Ross 708 mâles, divisés en 4 groupes expérimentaux de 20 sujets chacun. Les unités statistiques étaient représentées par des cages, dans chacune desquelles se trouvaient 5 poulets. Par conséquent ont eu lieu 4 répétitions par traitement. L'essai a duré 5 semaines. L'alimentation se divise en deux types d'aliments : un « démarrage » avec 24.5% de protéine brute, administré durant les deux premières semaines de vie, et un « croissance-finition » avec 21.1% de protéine brute, durant les trois autres semaines.

Les traitements ont été les suivants : au groupe de contrôle, aucun traitement ; au groupe T1, intégration de 0.4% de monobutyrine ; au groupe T2 0.8% et au groupe T3 1.6%. Pour les groupes expérimentaux T1, T2 et T3, l'intégration à l'aliment a eu lieu seulement durant les deux premières semaines de vie, c'est-à-dire seulement dans l'aliment « démarrage ».

Les mesures effectuées ont été les poids et les consommations alimentaires moyennes des cages, relevés hebdomadairement. Les indices de consommation alimentaire ont été calculés à partir de ces dernières.

A la fin de la cinquième semaine tous les sujets ont été abattus et quelques mesures ont été faites sur les carcasses (rendu, poitrine, cuisses, foie, gras abdominal).

1.2. Essai d'infection avec Salmonella

Les essais avec *Salmonella* Typhimurium ont été menés auprès de l'Institut Zooprophylactique Expérimental de la Lombardie et de l'Emilie-Romagne, Section de Forlì. Deux essais ont été effectués sur des poussins dans des isolateurs. Dans chaque essai ont été utilisé des groupes de 30 poussins par traitement. Trente poussins ont été en revanche soumis à un prélèvement sanguin pour vérifier l'absence d'anticorps contre la *Salmonella* Typhimurium au moyen du test ELISA Biocheck®.

Pour l'infection expérimentale, dans tous les essais, une souche de *Salmonella* Typhimurium isolée des poulets et identifiée auprès de l'Institut de Forlì (souche n° 156034/2010) a été utilisée. La souche bactérienne a été reconstituée, contrôlée pour vérifier l'absence de tout microorganisme polluant et titrée sur XLD agar.

Pour le premier essai des poulets SPF White Leghorn ont été utilisés ; pour le deuxième des poulets SPF Ross 308.

Pour mieux comprendre le schéma expérimental de l'essai microbiologique le tableau 2 a été préparé. Dans le premier essai tous les poussins ont été infectés au $7^{ème}$ jour de vie par 1 ml d'un inoculum contenant 10^7 CFU/ml. Le groupe de contrôle n'a reçu aucun traitement, alors que le groupe 2 a été traité avec 1.4% de monobutyrine dans l'aliment a partir du $14^{ème}$ jour de vie (traitement post-infection). Le

groupe 3 et le groupe 4 ont été traités dès le premier jour de vie avec respectivement 0.3 et 1.0% de monobutyrine dans l'aliment. Dans chaque groupe ont été prélevés et abattus 10 sujets au 14ème jour de vie, 10 sujets au 24ème et 10 sujets au 34ème jour de vie. Les contenus des caeca ont été analysés pour compter les CFU/g de *Salmonella*.

Dans le deuxième essai les deux groupes de poussins ont été infectés au 10ème jour de vie avec 1 ml d'un inoculum contenant, cette fois, 10^3 CFU/ml. Le premier groupe n'a pas été traité jusqu'au 15ème jour et puis, 0.5% de monobutyrine lui a été administré, dans l'eau de boisson. L'autre groupe n'a reçu aucun traitement jusqu'au 25ème jour de vie des animaux et, puis du 26ème au 30ème jour, lui a été administré 1.0% de monobutyrine toujours dans l'eau de boisson (traitement pré-abattage). Dans chaque groupe ont été sacrifiés 10 sujets au 20ème jour de vie, 10 au 25ème et 10 sujets au 30ème jour et les contenus des caeca et des foies ont été examinés pour compter les CFU/g de *Salmonella*.

1.3. Analyses statistiques des données

Le projet de l'essai de « performance » a complètement été du type randomisé avec la singulière cage (5 sujets par cage) pris comme unité expérimentale. En ce qui concerne les essais qui ont prévu l'infection avec *Salmonella*, l'unité expérimentale statistique, considérée dans le but de calculs, a été constituée par l'animal individuel, sacrifié à différents moments, comme indiqué par le tableau 1.

Les comptages sont donnés en $\log_{10}$. Tous les résultats ont été analysés avec le test ANOVA à une voie et avec la confrontation par paires avec le test « t » de Student, en utilisant la procédure SAS (1999), en prenant le facteur « traitement » comme facteur fixe.

2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2.1. Essai de performance

Le tableau 1 reporte les relevés des poids moyens des cages, effectués hebdomadairement et les valeurs calculées des indices de consommation alimentaire. A la fin des deux premières semaines les poids des différents groupes étaient comparables. A partir de la troisième semaine, le groupe T2, avec 0.8% de monobutyrine dans l'aliment, a commencé à avoir le dessus sur les autres, avec un différentiel de 64 g en plus par rapport au contrôle ($P<0.01$). Un tel avantage a été maintenu jusqu'à la fin de la cinquième semaine. Ces résultats sont la confirmation du fait bien connu que le développement des villosités et de la muqueuse intestinale est pratiquement complété au 14ème jour de vie et les effets commencent à se noter à partir de la troisième semaine (Pryde et al., 2002).

Les indices de consommation alimentaires, toujours très bas, grâce aux conditions extrêmement contrôlées de l'élevage expérimental, continuent statistiquement à ne pas être différents. En ce qui concerne les données reportées sur les rendus des différentes parties de la carcasse, il est possible d'affirmer que le traitement à 0.8% dans l'aliment, reçu par les sujets du groupe T2, a donné les meilleurs résultats, en confirmant les résultats des croissances et des consommations alimentaires.

2.2. Essai d'infection avec *Salmonella*

Les résultats des comptages de *Salmonella* Typhimurium sont reportés dans les tableaux 3 et 4.

Premier essai : face à des niveaux très élevés de *Salmonella* dans le groupe de contrôle (infecté et non traité), une réduction progressive de l'infection a été observée dans les groupes traités ($P<0.01$ à 14 jours le groupe 1,0% ; à 24 jours également le groupe 0,3% et, finalement, à 34 jours le groupe 1,4%, traité à partir du 14ème jour). Le résultat est certainement dû au fait que le traitement a été commencé précocement et avec un niveau plus élevé de monobutyrine ; il y a bien mise en évidence d'un effet dose-réponse.

Deuxième essai : Les poussins ont été infectés au 10ème jour de vie, trois jours plus tard que ceux du premier essai, avec un inoculum 10^3 CFU/ml. Le groupe 1 a été traité pendant 15 jours du 15ème au 30ème, avec 0.5% du produit dans l'eau de boisson. Le groupe 2 a été traité pendant seulement 5 jours, du 25ème au 30ème, avec 1% de monobutyrine dans l'eau de boisson. Dans le groupe traité avec 1% de monobutyrine dans l'eau pendant 5 jours, les caeca positifs passent de 10 sur 10 à 2 sur 10, et les foies passent de 6 positifs sur 10 à 0 positif sur 10. Dans le groupe traité avec 0,5% de monobutyrine dans l'eau pendant 15 jours, les caeca positifs à la *Salmonella* passent de 4 sur 10 à 0 sur 10, et les foies passent de 2 sur 10 à 0 sur 10. (Tableau 4).

CONCLUSIONS

Les conclusions peuvent être synthétisées comme ci-dessous indiquées :

- la monobutyrine a exprimé positivement ses qualité de promoteur de croissance en absence d'infection avec *Salmonella*, déjà à une concentration à 0.4% dans l'aliment a permis d'obtenir des poids plus élevés d'environ 4.5% par rapport aux poulets non traités ;
- la monobutyrine a également bien exprimé son action antibactérienne contre l'infection avec *Salmonella* Typhimurium, qu'elle soit intégré à l'aliment, comme à l'eau de boisson ;
- l'utilisation de la monobutyrine permet d'obtenir d'importantes réductions de la concentration de Salmonelle, jusqu'à 100% dans les caeca et dans les foies ; le traitement précoce permet de prévenir la prolifération de Salmonelle dans les caeca et dans les foies, et d'en réduire le nombre en CFU avec des quantités mineures de produit par rapport aux

traitements commencés lorsque l'infection est déjà effective.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Antongiovanni, M., Buccioni, A., Petacchi, F., Leeson, S., Minieri, S., Martini, A., Cecchi, R., 2007. Ital. J. Anim. Sci., 6, 19-25.
Antongiovanni, M., Buccioni, A., Minieri S., Galigani, I., Rapaccini, S., 2010. Ital. J. Anim. Sci., 9, 369-371.
Friedman, A., Bar-Shira, E., 2005. Proc. 15th Symp. Poultry Nutr., Balatonfüred, Hungary, 234-242.
Kabara, J. J., Swieczkowski, A.J. Conley, J.P. Truant, 1972. Antimicr. Agents and Chemioth. 2-1, 23-28.
Kwan, Y.M., Ricke, S.C., 1998. Appl. Environ. Microbiol., 64, 3458-3463.
Leeson, S., Namkung, H., Antongiovanni, M., Lee, E.H., 2005. Poultry Sci., 84, 1418-1422.
Jósefiac, D., Rutkowski, A., Martin, S.A., 2004. Anim. Feed Sci. Technol., 113, 1-15.
Pryde, S.E., Duncan, S.H., Hold, G.L., Stewart, C.S., Flint, H.J., 2002. FEMS Microbiol. Lett., 217, 133-139.
Thormar, H., H. Hilmarsson, and G. Bergsson, 2006. Appl. Environ. Microbiol. 72, 522–526
SAS User's Guide: Statistics, Version 8.0. Edition 1999. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA
Sakata, T., 1987. Brit. J. Nutr., 58, 95-103.
Van der Wielen, P.W.J., Biesterveld, S., Notermans, S., Hofstra, H., Urlings, A., Vankapen, F., 2000. Appl. Environ. Microbiol., 66, 2536-2540.
Van der Wielen, P.W.J., 2002. In Nutrition and Health of the Gastrontestinal Tract. M.C. Blok, H.A. pp. 37-60.

Tableau 1. Poids (g) et indices de conversion alimentaires relatifs aux échéances hebdomadaires.

Poids					
	Contrôle	**T1**	**T2**	**T3**	**SEM**
7 jours	164	164	165	163	1.50
14 jours	474	461	471	463	4.88
21 jours	925 Aa	950	989 B	958 b	9.24
28 jours	1532	1554	1598	1584	15.35
35 jours	2220 Aa	2301 b	2322 B	2280	19.73
Indices de consommation					
	Contrôle	**T1**	**T2**	**T3**	**SEM**
7 jours	1.34	1.40	1.29	1.41	0.05
14 jours	1.43	1.40	1.39	1.41	0.07
21 jours	1.49	1.47	1.45	1.48	0.03
28 jours	1.62	1.60	1.58	1.61	0.03
35 jours	1.82	1.79	1.78	1.76	0.03
0-35 jours	1.58	1.56	1.54	1.56	0.02
Caractéristiques des carcasses					
	Contrôle	**T1**	**T2**	**T3**	**SEM**
Rendu, %	80.2	81.8	80.2	80.5	0.38
Poitrine, g	397 Aa	415 ABb	452 Bc	323 C	11.22
Cuisses, g	401 ABab	406 Ab	435 Aa	351 Bc	8.19
Foie, g	28 A	17 B	40 C	38 C	2.22
Gras abdom., %	17 a	37 b	31 b	22	2.51

Les diverses lettres minuscules indiquent des différences significatives pour $P<0.05$; les diverses lettres majuscules indiquent des différences significatives pour $P<0.01$.

Tableau 2. Schéma expérimental de l'essai microbiologique avec la *Salmonella* Typhimurium.

Essai	Groupe n.	Âge (j) infection	CFU/ml inoculum	Traité (j)	Concentration %	Sacrifié (j)
Premier	1	7	10^7	-	-	14, 24, 34
	2	7	10^7	14-34	1.4, aliment	14, 24, 34
	3	7	10^7	0-34	0.3, aliment	14, 24, 34
	4	7	10^7	0-34	1.0, aliment	14, 24, 34
Deuxième	1	10	10^3	15-30	0.5, eau	20, 25, 30
	2	10	10^3	25-30	1.0, eau	20, 25, 30

Légende: aliment = dans l'aliment; eau = dans l'eau de boisson.

Tableau 3. Résultats de l'essai avec *Salmonella* Typhimurium, comptage des CFU/g dans les caeca (log_{10})

Premier essai		**Contrôle**	**1.4%/ali**	**0.3%/ali**	**1.0%/ali**	**SEM**
Infection (jour)		7	7	7	7	
Concentration (CFU/ml)	inoculum	10^7	10^7	10^7	10^7	
Traitement (jours)		-	14-34	0-34	0-34	
Comptage 14 jours		6,6 Aa	6,3 a	6,1 b	5,7 Bb	0,1
Comptage 24 jours		6,7 A	5,8 A	5,0 B	3,9 B	0,2
Comptage 34 jours		5.1 A	2,6 Ba	2,4 Ba	2,0 Bb	0,1

Deuxième essai		**0.5%/eau**	**1.0%/eau**	**SEM**
Infection (jour)		10	10	
Concentration (CFU/ml)	inoculum	10^3	10^3	
Traitement (jours)		15-30	25-30	
Comptage 20 jours		2,3 A	3,3 B	0,1
Comptage 25 jours		2,1 A	3,1 B	0,0
Comptage 30 jours *		- *	1,1	

Les diverses lettres minuscules indiquent des différences significatives pour $P<0.05$; les diverses lettres majuscules indiquent des différences significatives pour $P<0.01$.
* à 30 jours le comptage dans les caeca du groupe 0.5% étaient nul (voir tableau 4)

Tableau 4. Résultats du deuxième essai avec *Salmonella* Typhimurium, nombre de sujets positifs

Caeca	**Traitement**	**20 jours**	**25 jours**	**30 jours**
0.5% dans l'eau	15-30 jours	4/10	2/10	0/10
1.0% dans l'eau	25-30 jours	10/10	10/10	2/10

Foies	**Traitement**	**20 jours**	**25 jours**	**30 jours**
0.5% dans l'eau	15-30 jours	2/10	1/10	0/10
1.0% dans l'eau	25-30 jours	5/10	6/10	0/10