

**EFFETS DE DOSES CROISSANTES D'UNE NOUVELLE 6-PHYTASE
MICROBIENNE SUR L'UTILISATION TOTALE APPARENTE DE PHOSPHORE
ET SUR LA MINÉRALISATION OSSEUSE CHEZ LE POULET DE CHAIR**

Aureli Raffaella¹, Umar Faruk Murtala¹, Broz Jiri² et Fru Fidelis²

¹*DSM Nutritional Products France, Centre de Recherche en Nutrition Animale, BP 170,
68305 SAINT-LOUIS Cedex, France,* ²*DSM Nutritional Products Ltd, BP 3255, CH-4303
KAISERAUGST, Suisse*

raffaella.aureli@dsm.com

RÉSUMÉ

Les effets de l'addition de doses croissantes d'une 6-phytase microbienne sur les performances de croissance, l'utilisation apparente de phosphore (UAP) et de calcium (Ca), et la minéralisation osseuse ont été testés chez le poulet de chair. Pour cela, les animaux ont été nourris avec un aliment de base (maïs/tourteau de soja) déficient en P (témoin négatif, TN) avec 3,2 g P total/kg d'aliment) auquel 250, 500, 1000, 2000, 4000 et 8000 unités de phytase (par kg d'aliment) ont été ajoutées. L'aliment de base a également été supplémenté avec 1,5 gde P non phytique par kg d'aliment pour former un traitement témoin positif (TP). Le gain de poids (GP) et l'indice de consommation (IC) ont été déterminés entre J8 et J22. Les excréments ont été récoltés entre J14 et J17 afin de déterminer la teneur en P et Ca. Le taux de cendres des tibias et des phalanges a également été mesuré.

Quelle que soit la dose, le GP et l'IC ont été significativement améliorés avec l'addition de phytase. De plus, l'utilisation apparente de P et Ca a été significativement améliorée de façon dose-dépendante. Ceci a été confirmé par une réduction significative de l'excrétion phosphorée d'environ 4,4 g/kg par rapport à TN. Une relation non linéaire dose-dépendante a été établie pour le taux de cendres des tibias et des phalanges. Le taux de cendres a été significativement amélioré de 52 % et 73 % respectivement pour les tibias et les phalanges avec l'addition de 8000 unités de phytase /kg d'aliment par rapport à TN. Dans cette étude le GP, l'UAP et les taux de cendres ont été les indicateurs les plus sensibles à l'addition de phytase avec des coefficients de corrélation pouvant atteindre 0,99 pour chacune des régressions non linéaires établies. L'ensemble des résultats suggèrent que cette nouvelle phytase permet la libération de P phytique entraînant une amélioration consistante de l'utilisation digestive du P et de la minéralisation osseuse ainsi qu'une réduction très importante de l'excrétion de P.

ABSTRACT

Effects of graded inclusion levels of a novel bacterial 6-phytase on apparent utilization of phosphorus and bone mineralization in broiler chickens

A 21 days experiment was conducted to evaluate the efficacy of a novel bacterial 6-phytase in broiler chickens fed a low-phosphorus diet (3.2 g total P /kg feed) based on maize and soybean meal. The birds received the diet either unsupplemented or supplemented with phytase at 250, 500, 1000, 2000, 4000 and 8000 U per kg. One positive control treatment was included and consisted in the low-phosphorus diet supplemented with 1.5 g/kg non phytic phosphorus from DCP. The results demonstrated that the supplementation of the low-P diet with phytase significantly improved both the weight gain and FCR of broiler chickens. A significant and dose-related improvement of P utilization was observed in phytase-supplemented treatments and consequently the amount of P in excreta was significantly reduced. Phytase supplementation also significantly increased tibia and toe ash percentage by 52 % and 73 % respectively with 8000 U of phytase. In this study, body weight gain, P utilization and bone ash percentage were the most sensitive criteria that consistently showed high R² in the non-linear response equations for graded levels of phytase in the diet. Even at relatively low dosages the novel bacterial 6-phytase resulted in higher availability of phytate-P and in a significant reduction of P-excretion.

INTRODUCTION

Le phosphore (P) est un minéral essentiel à la croissance des volailles. En effet, l'apport insuffisant de P dans la ration alimentaire provoque le rachitisme chez le poussin. Les céréales comme le maïs et les tourteaux d'oléagineux comme le tourteau de soja constituent la majeure partie de la ration alimentaire distribuée aux animaux monogastriques. Cependant, entre 60 % et 80 % du P des plantes est sous forme de P phytique, pas ou peu utilisable par les animaux monogastriques (Waldroup, 1999) puisque ces derniers ne possèdent pas le matériel enzymatique nécessaire à l'hydrolyse des phytates et à la libération du P. De ce fait, du P minéral est souvent ajouté à la ration alimentaire afin de répondre aux besoins en P des animaux, et cela en dépit des coûts associés à cet usage.

De nombreux chercheurs ont montré l'intérêt de l'addition de phytases microbiennes dans les régimes alimentaires pour volailles afin de diminuer l'apport en P inorganique (Ravindran *et al.*, 2000). En effet, l'utilisation de phytase permet de valoriser les ressources végétales de P tout en diminuant l'apport de P minéral, en réduisant l'excrétion phosphorée et en améliorant les performances de croissance et la minéralisation osseuse (Aureli *et al.*, 2011). Au cours de ces vingt dernières années, différentes phytases microbiennes, présentant des modes d'action et des efficacités différentes, ont été développées par plusieurs entreprises de biotechnologies.

Cette étude propose de tester les effets de l'addition de doses croissantes d'une nouvelle 6-phytase microbienne sur les performances de croissance, l'utilisation apparente de P, et la minéralisation osseuse chez le poulet de chair nourris avec un aliment déficient en P.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux

L'étude a été réalisée au Centre de Recherche en Nutrition Animale de DSM Nutritional Products France sur des poulets de chair (PM3). 512 sujets ont été élevés de un à huit jours d'âge, dans des cages superposées dans une salle où la température était adaptée aux besoins spécifiques des poussins. Les animaux avaient accès à l'eau et à l'aliment *ad libitum*. A 8 jours, les animaux ont été répartis en fonction de leur poids en groupes de 8. Huit groupes d'animaux ont été attribués à chaque traitement (soit 64 sujets/traitement). Les animaux et les aliments consommés ont été pesés à 8, 15 et 22 jours afin de calculer le gain de poids (GP) des animaux entre J8 et J22 ainsi que l'indice de consommation (IC).

Une collecte d'excréta a été réalisée entre J14 et J17. Les excréta de quatre groupes d'animaux par traitement ont été collectés en totalité pendant les quatre jours du bilan. Les excréta récoltés chaque jour ont été congelés afin de réduire les pertes gazeuses. Les animaux ainsi que l'aliment ont été pesés au début et à la fin du bilan. La quantité d'excréta récoltée a été pesée à J17 afin de déterminer la quantité totale de phosphore et de calcium excrétée durant cette période. A la fin de l'essai (J22), les animaux ont été sacrifiés et le tibia droit de quatre animaux provenant des mêmes groupes que ceux utilisés pour le bilan fécal a été prélevé et disséqué ainsi que la phalange du milieu (entre le deuxième et le troisième tarse à partir de l'extrémité distale) de la patte gauche.

1.2. Aliment

Les animaux ont été nourris de J1 à J8 avec un aliment de base en miettes principalement composé de maïs et de tourteau de soja présentant tous deux un taux faible en phytase endogène. Afin d'induire un état de carence en P et en calcium (Ca), l'aliment a été formulé avec 4,4 g de P total et 5,6 g de Ca par kg d'aliment. A J8, les animaux ont été nourris avec le même aliment de base sous forme de granulés dont la teneur en P totale a été réduite à 4,1 g par kg d'aliment pour constituer le traitement témoin négatif (TN), et auquel 250, 500, 1000, 2000, 4000 et 8000 U de phytase RONOZYME® HiPhos (GT) (*Citrobacter Braakii* 6-phytase) ont été ajoutées par kg d'aliment (Tableau 1). L'aliment de base a également été supplémenté avec 1,5 g de P non phytique (nPP) par kg d'aliment provenant du phosphate bicalcique (DCP) pour former un traitement témoin positif (TP). Les produits ainsi que le phosphore ont été ajoutés à l'aliment de base afin de constituer les différents traitements. Chaque traitement a été granulé par passage dans une presse à granulés (température de granulation 70°C. filière 3x 25mm).

1.3. Analyses biochimiques

Les analyses des nutriments dans l'aliment ont été réalisées en suivant les méthodes standards classiques de détermination (VDLUF, 1976).

Après décongélation, les excréta récoltés au cours du bilan fécal ont été homogénéisés par groupe et des aliquotes représentatives ont été prélevées pour la détermination de la matière sèche (MS) et de la concentration en P et Ca. La détermination de la teneur en Ca et P dans l'aliment et dans les échantillons d'excréta a été réalisée par spectrométrie d'émission plasma (DIN EN ISO 1998) après une minéralisation H₂SO₄/Na₂SO₄. La quantité d'aliment ingérée et d'excréta récoltée à la fin du bilan ont permis de déterminer l'utilisation totale apparente du P et du Ca (UAP et UACa),

définie comme la différence entre la quantité de P ou de Ca ingérée et celle excrétée, en pourcentage de la quantité de P ou de Ca ingérée.

Les tibias prélevés ont été congelés à -20°C jusqu'à l'analyse. Sur chaque tibia, un fragment de 2 cm de la partie centrale de la diaphyse de l'os a été découpé. Ce fragment a été démoellé et utilisé pour déterminer la résistance osseuse définie comme la force d'écrasement à appliquer au fragment pour atteindre le point de rupture (mesuré en Newton), grâce à un appareil de type Instron (Lloyd LR10K). Le pourcentage de cendres des os a été déterminé après dégraissage des fragments d'os (tibia et phalange) dans l'éthanol et dans l'éther, séchage à l'étuve à 105°C et incinération à 550°C dans un four à moufle.

1.4. Analyses statistiques

Une analyse de variance à un facteur (ANOVA 1) a été utilisée afin d'évaluer statistiquement les performances de croissance (GP et IC), l'UAP et l'UACa, la résistance osseuse et le pourcentage de cendres dans les tibias, grâce au logiciel Stat box V.5 (Grimmersoft, 1995). Les moyennes significativement différentes ($P < 0,05$) ont été comparées grâce au test de Newman Keuls.

Des équations de régression non linéaire en réponse à l'addition de phytase, du type $y = a + b(1 - e^{-kx})$, ont été établies pour chacun des paramètres étudiés en fonction des valeurs en activité phytasique analysées dans l'aliment.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les animaux ont été nourris, après analyse, avec un aliment contenant 210 g de protéines brutes, 12,3 MJ par kg d'aliment d'énergie métabolisable et 3,2 g P total par kg d'aliment (TN) (Tableau 1). La teneur en P totale a été inférieure à celle souhaitée et les différences de teneur en P entre le témoin positif et le témoin négatif a été de 1,7 g au lieu de 1,5 g/kg d'aliment. Les résultats d'analyse de l'activité phytasique dans les différents traitements alimentaires ont montré que la phytase native présente dans l'aliment de base granulé était inférieure à la limite de détection, et que l'activité phytasique mesurée dans les traitements supplémentés en phytase correspondait à l'activité attendue (Tableau 2).

Les résultats des performances de croissance des poulets de chair entre le jour 8 et le jour 22 sont présentés dans le Tableau 3. L'addition de nPP (traitement TP) dans un aliment déficient en P a significativement amélioré le GP et l'IC des animaux, indiquant clairement une déficience phosphorée de l'aliment de base (traitement TN). L'addition de phytase jusqu'à 1000 U/kg a eu un effet positif significatif sur le GP (entre 55 et 86 %

et l'IC (entre 14 et 8 %) des animaux par rapport à TN. Au-delà de l'addition de 1000 U de phytase par kg d'aliment, il n'y a plus d'effets significatifs. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Yan *et al.* (2000). Même à un faible niveau d'inclusion la phytase a permis de corriger la diminution de croissance.

Les résultats de l'UAP et de l'UACa sont détaillés dans le Tableau 3. L'UAP a été significativement amélioré (entre 14 et 86 %) par l'addition de dose croissante de phytase par rapport à TN. De plus, la régression non linéaire ($y = 34,9 + 30,5(1 - e^{-0,0017x})$, $R^2 = 0,99$) a démontré clairement l'effet dose dépendante de l'addition de phytase sur l'utilisation du P. Ces effets sont en accord avec ceux obtenus par Aureli *et al.* (2011). Les effets de l'addition de phytase sur l'UAP ont été confirmés par une réduction significative de la teneur en P des excréta d'environ 4,4 g/kg MS par rapport à TN. L'amélioration de l'utilisation du P indique que du P phytique a été libéré sous l'action de la phytase. En additionnant de la phytase, le P des plantes a été valorisé et l'excrétion phosphorée réduite (Bahadoran *et al.* 2011, Angel *et al.* 2005). L'UAP du témoin positif a été plus faible que celle des autres groupes supplémentés en phytase, indiquant que la plupart du P minéral ajouté a été utilisé par les animaux et que du P phytique a été excrété, puisqu'une augmentation significative de la teneur en P dans les excréta a été enregistrée.

L'UACa a aussi été significativement amélioré par l'addition de dose croissante de phytase par rapport à TN. L'UACa du groupe témoin négatif était de 25% et a été augmenté jusqu'à une valeur asymptotique estimée à 50,5 % avec l'addition de dose croissante de phytase. L'addition de phytase a donc permis, en plus, d'augmenter la disponibilité et la rétention du calcium

Les effets de l'addition de phytases sur les paramètres de la minéralisation osseuse ont également été enregistrés. La déficience en P a été caractérisée par une réduction du pourcentage de cendres des os (Sebastian *et al.*, 1996). Quelle que soit la dose de phytase ajoutée, les pourcentages de cendres des tibias et des phalanges ont été améliorés de manière significative par rapport à TN. Une relation exponentielle dose dépendante a été établie pour le taux de cendres des tibias ($y = 34,8 + 17,7(1 - e^{-0,0028x})$, $R^2 = 0,99$) et des phalanges ($y = 22,9 + 15,4(1 - e^{-0,0038x})$, $R^2 = 0,99$). Le taux de cendres a été significativement amélioré entre 27 et 52 %, et entre 38 et 73 % respectivement pour les tibias et les phalanges avec l'addition de dose croissante de phytase rapport à TN. Dans cette étude, le GP, l'UAP et les taux de cendres ont été les indicateurs les plus sensibles à l'addition de phytase avec des coefficients de corrélation pouvant atteindre 0,99 (Adedokun *et al.*, 2004).

CONCLUSION

L'ensemble des résultats suggèrent que cette nouvelle phytase permet la libération de P phytique entraînant une amélioration consistante de l'utilisation digestive du P et de la minéralisation

osseuse ainsi qu'une réduction très importante de l'excrétion de P. Les effets ont été visibles au niveau d'inclusion les plus bas et ont été supérieurs à ceux obtenus avec l'addition de 1,5 g de nPP sous la forme de phosphate bicalcique par kg d'aliment.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adedokun S.A., Sands J.S., Adeola O., 2004. Can. J. Anim. Sci. 84:437-444
 Angel, R., Saylor W. W., Dhandu A. S., Powers W., Applegate T. J., 2005. Poult. Sci. 84:1031-1044.
 Aureli R., Umar Faruk M., Cechova I., Pedersen P.B., Elvig-Joergensen S.G., Fru F., Broz J., 2011. Int. J. Poult. Sci. 10(2):160-168
 Bahadoran R., Ghisari A., Toghyan M., 2011. African Journal of Biotechnology Vol. 10(34), pp. 6655-6662
 Ravindran V., Cabahug S., Ravindran G., Selle PH., Bryden WL., 2000. Br. Poult. Sci. 41: 193-200.
 Sebastian S., Touchburn S.P., Chavez E.R., Lague P.C., 1996. Poult. Sci., 75: 1516-1523
 Waldroup W., 1999. Poult. Sci. 78 :683-691
 Yan F., Kersey J. H., Fritts C. A., Waldroup P. W., Stilborn H. L., Crumm R. C., Jr., Rice D.W., Raboy V., 2000. Poult. Sci. 79:1282-1289.

Tableau 1 : Composition de l'aliment de base

Ingrédients (%)	Régime de base
Tourteau de soja	36,00
Maïs	58,70
Huile de soja	1,8
DL-Méthionine	0,20
Phosphate bicalcique	0,30
Carbonate de calcium	0,69
NaCl	0,10
Sable	1,15
Prémix vitaminique	1,0
Anticoccidien	0,06
Teneurs analysées	
Energie métabolisable (MJ/kg) ¹	12,3
Protéines brute (g/kg)	210
Phosphore total (g/kg)	3,2
Calcium total (g/kg)	5,4

¹ calculée à partir des valeurs analysées en nutriments

Tableau 2: Effets de l'addition de phytase sur les performances de croissance (J8-J22), sur l'utilisation apparente du phosphore et du calcium (UAP, UACa) et sur la minéralisation osseuse

	Phytase analysé	P total	Gain de poids	FCR	UAP	UACa	P dans excreta	Cendres	
					P	Ca		Tibia	Phalange
	U/kg	g/kg	g/a	g:g	% ingestion		g/kg MS	%	
TN	<LOD	3,2	414 ^e	1,714 ^a	35,1 ^c	25,1 ^c	9,2 ^b	34,4 ^d	22,9 ^d
TN + PHY250	218	3,2	640 ^d	1,480 ^b	40,2 ^c	29,4 ^c	8,3 ^c	43,8 ^c	31,7 ^c
TN + PHY500	426	3,2	688 ^{bcd}	1,455 ^b	50,4 ^b	41,8 ^b	6,9 ^d	48,1 ^b	36,1 ^{ab}
TN + PHY1000	993	3,2	721 ^{abc}	1,416 ^b	59,8 ^a	50,4 ^a	5,6 ^e	51,0 ^a	37,6 ^{ab}
TN + PHY2000	2281	3,2	751 ^{ab}	1,419 ^b	64,0 ^a	54,2 ^a	5,0 ^e	51,4 ^a	37,1 ^{ab}
TN + PHY4000	4043	3,2	771 ^a	1,420 ^b	65,3 ^a	54,8 ^a	4,9 ^e	52,9 ^a	39,5 ^a
TN + PHY8000	7824	3,2	769 ^a	1,408 ^b	64,1 ^a	50,5 ^a	5,1 ^e	52,5 ^a	39,4 ^a
TP	<LOD	4,9	659 ^{cd}	1,459 ^b	40,3 ^c	25,3 ^c	12,4 ^a	45,6 ^{bc}	34,8 ^b
ES(M) ¹			1,38	0,04	0,88	0,89	0,41	0,62	0,58
P			<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

a,b: les valeurs marquées avec différentes lettres sont significativement différentes ($p < 0.05$) LOD : limite de détection

¹ES(M) : erreur standard de la moyenne