

ÉVALUATION *IN VIVO* ET *IN VITRO* DE DEUX SOURCES DE CUIVRE POUR POULETS DE CHAIR

Hamdi Manel¹, Solà-Oriol David¹, Franco-Rosselló Rosa¹, Durosoy Stéphane², Roméo
Agathe² and Perez José Francisco¹

¹*Service de Nutrition et Bien-être Animal (SNiBA) - Université Autonome de Barcelone -
08193 BELLATERRA, Espagne*

²*ANIMINE – 74330 SILLINGY, France
aromeo@animine.eu*

RÉSUMÉ

Hors Europe, le cuivre (Cu) peut être utilisé à haute dose (entre 125 et 250 ppm) pour améliorer la santé et les performances des volailles, mais s'ils sont mal maîtrisés, ces dosages élevés peuvent détériorer la croissance des animaux et amplifier les interactions avec d'autres nutriments. Dans l'Union Européenne, plusieurs sources de cuivre sont autorisées à niveau nutritionnel dans les aliments pour volailles, mais elles ne sont pas toutes aussi efficaces. Notre étude comparait un sulfate de cuivre (CuSO₄) et un oxyde de cuivre (I) (Cu₂O, CoRouge®) à trois niveaux d'inclusion (15, 150, 300 ppm) ; 576 poulets mâles ont été répartis dans 48 cages (8 cages x 6 traitements), par groupes de 12. Au terme de l'essai, un poulet par cage a été euthanasié, pour mesurer la concentration de cuivre dans différents tissus. Une étude *in vitro* a également été conduite pour évaluer l'impact de la source de cuivre et de son dosage sur sa solubilité et l'hydrolyse du phosphore phytique (PP), à différents pH (2,5 ; 4,5 ; 6,5). Les résultats *in vivo* étaient équivalents pour les deux sources, excepté à 300 ppm : CuSO₄ diminuait significativement ($P < 0,01$) le poids vif des animaux, dégradait ($P < 0,01$) l'indice de consommation et augmentait ($P < 0,05$) le taux de cuivre dans le foie, comparé à Cu₂O. *In vitro*, la solubilité de Cu₂O diminuait quand le pH et la dose augmentaient. Avec 300 ppm de Cu₂O, la solubilité du PP était moins réduite qu'avec 300 ppm de CuSO₄ (97,4% vs. 68,7%). Augmenter la dose de cuivre avec les deux sources réduisait l'hydrolyse du PP à pH 4,5 et 6,5. En conclusion, l'oxyde de cuivre (I) peut être utilisé pour répondre aux besoins du poulet à niveau nutritionnel, et limiter les problèmes rencontrés à haute dose.

ABSTRACT

In vivo and in vitro assessment of two copper sources for broilers

Copper supplementation (125 to 250 mg Cu/kg) in poultry diets is a common practice in many non-EU countries to enhance bird health, but high doses of Cu may affect animal performance and interact with other nutrients. However, these effects could directly depend on the Cu source. The objective of the trial was to compare effects of copper sulphate (CuSO₄) and dicopper oxide (Cu₂O, CoRouge®) at 3 levels in the diets (15, 150, 300 ppm). A total of 576 one-day male broilers were randomly distributed into 6 groups (8 pens per treatment, 12 birds per pen). On d35, 1 bird per pen was euthanized, skin fat and breast muscle were sampled, and liver and kidney were collected and weighted for Cu determination. Cu sources were also evaluated *in vitro* to measure Cu solubility and PP (phytic phosphorus) hydrolysis by phytase at pH 2.5, 4.5 and 6.5. The use of 300 ppm Cu from CuSO₄ decreased ($P < 0.01$) BW and increased ($P < 0.05$) liver Cu content in comparison with the use of 300 ppm Cu from Cu₂O. Feed conversion ratio increased ($P < 0.01$) for chicken fed with 300 ppm Cu from CuSO₄ in comparison to those fed with 300 ppm Cu from Cu₂O. Solubility of Cu from Cu₂O decreased when the pH and the Cu level increased. Including a level of 300 ppm Cu from CuSO₄ reduced PP solubility (68.7%) in comparison to Cu₂O (97.4%). Increasing the levels of Cu with both sources reduced PP hydrolysis by phytase at pH=4.5 and 6.5. It can be concluded that dietary levels of 150 and 300 ppm Cu from Cu₂O do not induce negative effects on broiler growth and health in comparison to CuSO₄.

INTRODUCTION

Impliqué dans de nombreuses réactions enzymatiques et dans d'autres processus biologiques, y compris le bon fonctionnement du système cardiovasculaire (Jegade et al., 2011), le cuivre est un oligo-élément essentiel pour la volaille. Comme la concentration de cuivre des matières premières végétales peut être faible, cet élément est souvent ajouté aux aliments des poulets, en général sous forme sulfate.

Selon la réglementation de l'Union Européenne, il ne doit pas dépasser la concentration de 25 mg/kg dans les aliments pour volailles, mais hors Europe, comme aux Etats-Unis, il peut excéder 125 mg/kg ; en effet, à haute dose, le cuivre est un promoteur de croissance (Arias et Koutsos, 2006). Néanmoins, au-delà de 250 mg/kg, le cuivre peut au contraire limiter la croissance des animaux, et amplifier les interactions avec d'autres minéraux (Karimi et al., 2011).

Notre étude visait à comparer deux sources de cuivre, un sulfate (CuSO_4) et un oxyde de dicuivre (Cu_2O) à trois niveaux d'inclusion : 15, 150 et 300 ppm. Les animaux ont été suivis jusqu'à l'âge de l'abattage, 35 jours, puis des études *in vitro* ont été menées pour déterminer l'effet des deux sources de cuivre sur la libération du phosphore phytique par la phytase : on sait en effet qu'une dose élevée de cuivre peut former des complexes insolubles avec le phytate dans le milieu intestinal, et que ces complexes peuvent être résistants à l'action enzymatique des phytases (Persson et al., 1998), diminuant de ce fait le relargage d'autres éléments, comme le phosphore.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux et aliments expérimentaux

L'étude a été menée sur 576 poulets mâles (Ross 308), répartis dans 48 cages (12 poulets par cage, avec 0,09 m² par poulet) en fonction de leur poids. L'essai a duré 35 jours, de l'éclosion à l'abattage.

Les animaux ont consommé *ad libitum* trois aliments (démarrage, croissance, finition) à base de maïs, de blé et de tourteaux de soja (PB 21% et EM 3000 kcal/kg au démarrage ; PB 21% et EM 3100 kcal/kg en croissance, puis PB 20% et EM 3100 kcal/kg en finition). Les teneurs en cuivre ont été mesurées pour obtenir 15 (niveau nutritionnel en Europe), 150 (dose utilisée pour promouvoir la croissance hors Europe) et 300 mg/kg de cuivre supplémenté dans les aliments complets, en utilisant deux sources différentes : un sulfate de cuivre (CuSO_4) et un oxyde de cuivre (I) (Cu_2O , CoRouge®).

Tableau 1. Liste des traitements expérimentaux

	Source utilisée	Cu ajouté
T1	Sulfate	15 ppm
T2	Sulfate	150 ppm
T3	Sulfate	300 ppm
T4	Oxyde (I)	15 ppm
T5	Oxyde (I)	150 ppm
T6	Oxyde (I)	300 ppm

Les autres nutriments étaient ajustés pour satisfaire les besoins des volailles, selon les recommandations nutritionnelles pour la souche Ross 308 : par exemple, 1,20% (démarrage), 1,12% (croissance) et 1,06% (finition) pour la lysine digestible, 0,44% (démarrage), 0,43% (croissance) et 0,40% (finition) pour la méthionine digestible.

1.2. Mesures de la phase *in vivo*

Les poulets ont été pesés au moment des transitions alimentaires et à la fin de l'essai, à 14 jours, à 28 jours et à 35 jours. Simultanément, la consommation d'aliment au sein de chaque cage a été mesurée.

A J35, un poulet par cage a été euthanasié, et plusieurs prélèvements ont été effectués : gras sous-cutané, filets, foie, reins, sang. La concentration de cuivre a été déterminée dans les tissus et les organes, avec la méthode ICP-OES. Un hémogramme a été réalisé avec l'échantillon de sang ; plusieurs biomarqueurs du cuivre, comme la teneur en céruloplasmine et la cuprémie, ont également été mesurés.

1.3. Analyses statistiques

Il s'agissait de pesées collectives, l'unité expérimentale pour les performances de croissance était une cage de 12 poulets. Les données ont été analysées par la méthode ANOVA, en utilisant la procédure GLM de SAS, puis par le test de Tukey, pour comparer les moyennes entre elles. Les facteurs évalués étaient la source de cuivre, le dosage et leurs interactions. Les différences étaient considérées significatives avec $P < 0,05$.

1.4. Étude complémentaire *in vitro*

La solubilité des deux sources de cuivre a été évaluée à une concentration de 0, 15, 150 et 300 mg/L dans 200 mM de solution tampon à base de glycine (pH 2,5) ou d'acétate de sodium (pH 4,5 et 6,5), afin de simuler l'évolution du pH dans le tractus gastro-intestinal, du plus acide (estomac) au plus neutre (partie proximale de l'intestin grêle). Chaque solution ainsi préparée a été mélangée à 20 ml de solution tampon avec ou sans phytate (2,9 mM) avant d'être incubée 1h à 41°C. Les concentrations de cuivre et de phosphore phytique (PP) soluble ont ensuite été mesurées par spectrométrie d'absorption atomique.

(AAS). Les valeurs obtenues pour le PP soluble étaient comparées avec le résultat mesuré en l'absence de cuivre, pour obtenir un pourcentage relatif.

L'effet des deux sources de cuivre sur l'hydrolyse du phosphore phytique (PP) par la 6-phytase a également été évalué, avec un protocole inspiré de l'étude de Pang et Applegate (2006). Des solutions contenant les différentes concentrations de cuivre (0, 15, 150 ou 300 mg/L de Cu) et 2,9 mM de phytate ont à nouveau été utilisées. Elles ont été mélangées à une solution préparée avec la phytase, de telle sorte que 0,1 ml correspondait à 500 FTU/kg (activité équivalente à celle mesurée de l'aliment de l'essai *in vivo*) une fois ajouté à 3 ml des solutions testées. Les solutions obtenues (à pH 2,5 ; 4,5 ou 6,5) ont été incubées 1h à 41°C. La réaction a ensuite été stoppée avec de l'ammonium molybdate metavanadate, et la quantité de PP libéré a été mesurée avec une méthode de dosage colorimétrique, à 410 nm, en utilisant le P inorganique comme standard.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Résultats *in vivo*

Dès la première pesée, à J14, les poulets ayant consommé 300 ppm de sulfate (T3) ont montré des résultats de croissance significativement inférieurs à ceux des autres groupes. Sur la période 0-35, ils ont obtenu en moyenne -9,4% pour le GMQ et +17,6% pour l'IC. Cette dégradation des performances n'a pas été observée avec l'oxyde à 300 ppm.

Le GMQ le plus élevé (70,6 g/j) et l'IC le plus bas (1,58) ont été obtenus avec le groupe nourri avec 150 ppm d'oxyde (T5). Sur le gain de poids, ce groupe présentait non seulement une différence significative avec le groupe T3, mais également avec le groupe qui a consommé 15 ppm d'oxyde (T4). Les deux sources de cuivre utilisées n'ont pas montré de différences significatives à doses équivalentes, à 15 et à 150 ppm.

La concentration de cuivre s'est révélée indépendante de la source, mais dépendante de la dose dans le rein, le filet, le gras sous-cutané et le sérum : elle augmentait avec le niveau de cuivre alimentaire. Les groupes nourris avec 300 ppm de cuivre présentaient les résultats les plus élevés ; les différences avec les autres groupes étaient significatives pour le rein et le filet.

Une interaction source x dose a été observée pour la concentration en cuivre du foie. Une forte augmentation de la teneur en cuivre a en effet été mesurée dans le foie des animaux du groupe T3. Le niveau de cuivre hépatique a augmenté avec la dose pour les deux sources, mais la différence était

uniquement numérique à 300 ppm pour l'oxyde, alors qu'elle devenait significative pour le sulfate.

Concernant les paramètres sanguins, aucune différence significative n'a été relevée.

2.2. Résultats *in vitro*

Les solubilités des deux sources de cuivre étaient similaires, indépendamment de la dose et de la présence de phytate, à pH 2,5. Quand le pH et la dose augmentaient, la solubilité de l'oxyde diminuait, avec ou sans phytate. Concernant le sulfate, sa solubilité n'a pas été impactée par l'augmentation du pH ou de la dose sans phytate ; en présence de phytate, elle diminuait quand le pH et la dose augmentaient. La quantité de PP solubilisé diminuait quand le pH et la dose de CuSO₄ augmentaient (68,7% à pH 6,5 et 300 ppm), alors qu'elle était très peu affectée par Cu₂O (97,4% à 300 ppm et pH 6,5).

Le pourcentage de PP relargué, comparé à la quantité relarguée en l'absence de cuivre, traduisait l'activité de la phytase. Il était indépendant de la dose et de la source à pH 2,5. Une diminution était observée à pH 4,5 et 6,5 quand la dose de cuivre augmentait ; cette diminution était globalement plus prononcée avec le sulfate : à pH 4,5 par exemple, -12,4% à 150 mg/L et -11,6% à 300 mg/L comparés aux résultats de l'oxyde de cuivre (I).

2.3. Discussion

Actuellement, le cuivre ajouté aux aliments pour volailles correspond souvent à la forme sulfate, mais d'autres sources existent sur le marché européen. Ces sources présentent différentes caractéristiques physico-chimiques et leurs biodisponibilités estimées sont très variables : comparées au sulfate, certaines approchent de 100%, alors que d'autres, comme l'oxyde de cuivre (II), ne dépassent pas 24% (EMFEMA, 2002).

Malgré une solubilité réduite en milieu acide, l'oxyde de cuivre (I) est estimé aussi biodisponible que le sulfate dans certains articles (Baker et al., 1991 ; Aoyagi et Baker, 1993), ce que notre étude confirme à niveau nutritionnel et à dose élevée. Cette source de cuivre ne présente pas d'effets négatifs sur la croissance des poulets ou sur le foie au-delà de 250 ppm, contrairement au sulfate, qui dégrade les performances, comme dans d'autres études antérieures (Karimi, 2011). Le ralentissement de la croissance et l'accumulation de cuivre dans le foie laissent penser à un début de toxicité. Il est également possible que le sulfate ait eu un effet négatif sur d'autres nutriments ; étant très soluble, il serait susceptible d'interagir avec eux dans le tractus gastrointestinal, comme avec la vitamine E (Lu et al., 2010).

Une interaction entre le phytate et le sulfate de cuivre a d'ailleurs été observée *in vitro*, alors que la solubilité de l'oxyde de cuivre (I) semblait indépendante de la présence ou de l'absence de phytate.

Il existe très peu d'études récentes sur l'oxyde de cuivre (I) et l'action des ions cuivreux Cu^+ dans l'alimentation animale ; d'autres recherches sont nécessaires pour avoir une idée plus précise de ses caractéristiques, et de ses différences avec la forme sulfate.

CONCLUSION

La source d'oxyde de cuivre (I) présente les mêmes effets que le sulfate de cuivre sur les performances des poulets, ainsi que sur l'accumulation du cuivre

dans les organes et les tissus à dose nutritionnelle ; les biodisponibilités de ces deux sources sont donc équivalentes.

En sus, à dose plus élevée, des différences ont été observées *in vivo* sur la croissance des poulets, et *in vitro* sur les interactions entre ces deux sources de cuivre et le phytate : alors que le sulfate semble interagir avec le phytate et diminuer l'action de la phytase sur la libération du PP, l'action de l'oxyde de cuivre (I) est réduite. L'oxyde de cuivre (I) est donc une source de cuivre efficace pour les poulets de chair, avec des propriétés physico-chimiques différentes de celles du sulfate, qui peuvent mener à des interactions différentes avec les autres composants de la ration.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aoyagi S., Baker D. H., 1993, Poult. Sci., (72), 165-171
Arias V.J., Koutsos E. A., 2006, Poult. Sci., (85), 999-1007
Baker D.H., Odle J., Funk M. A., Wieland T. M., 1991, Poult. Sci., (70), 177-179
EMFEMA, Bioavailability of major and trace minerals, 2002
Jegade A. V., Oduguwa O. O., Bamgbose A. M., Fanimu A. O., Nollet L., 2011, Poult. Sci., (52), 133-139
Karimi A., Sadeghi Gh., Vaziry A., 2011, J. Appl. Poult. Res., (20), 203-209
Lu L., Wang R. L., Zhang Z. J., Steward F. A., Luo X., Liu B., 2010, Biol. Trace Elem. Res., (138), 181-189
Pang Y., Applegate T. J., 2006, J. Agric. Food Chem., (54), 1792-1796
Persson H., Turk M., Nyman M., Sandberg A. S., 1998, J. Agric. Food Chem., (46), 3194-3200

Tableau 1. Performances de croissance (0-35 jours)

Source	Cu (ppm)	Poids (g)			GMQ (g/j)			IC		
		d 14	d 28	d 35	d0-14	d14-28	d28-35	d0-14	d14-28	d28-35
CuSO₄	15	481 ^a	1672 ^a	2444 ^{ab}	31,48 ^a	85,1 ^a	110,3 ^{ab}	1,37 ^b	1,55 ^b	1,86 ^b
	150	463 ^a	1634 ^a	2448 ^{ab}	30,16 ^a	83,7 ^a	116,2 ^a	1,41 ^{ab}	1,54 ^b	1,86 ^b
	300	429 ^b	1481 ^b	2221 ^c	27,72 ^b	75,1 ^b	105,7 ^b	1,53 ^a	1,87 ^a	2,19 ^a
Cu₂O	15	458 ^a	1614 ^a	2361 ^b	29,38 ^a	82,1 ^a	106,7 ^{ab}	1,41 ^{ab}	1,60 ^b	2,03 ^{ab}
	150	481 ^a	1704 ^a	2512 ^a	31,44 ^a	87,3 ^a	115,4 ^{ab}	1,37 ^b	1,50 ^b	1,81 ^b
	300	464 ^a	1655 ^a	2463 ^{ab}	30,21 ^a	85,1 ^a	115,5 ^{ab}	1,42 ^{ab}	1,57 ^b	1,84 ^b
SEM		6,6	22,6	31,1	0,4	1,4	2,4	0,03	0,04	0,06
<i>P value</i>										
Source		<0,1	<0,01	<0,01	<0,1	<0,01	NS	NS	<0,01	NS
Dose		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05	<0,05	<0,01	<0,05
Source* Dose		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05	<0,1	<0,01	<0,01

Tableau 2. Concentration en cuivre des organes et du sérum de poulets abattus à 35 jours

Source	Cu (ppm)	Sérum (mg/L)	Foie (µg/g)	Rein (µg/g)	Filet (µg/g)	Gras sous- cutané (µg/g)
CuSO₄	15	0,16	2,69 ^b	1,96	0,31	0,31
	150	0,14	3,41 ^b	2,06	0,40	0,48
	300	0,16	7,91 ^a	2,18	0,51	0,73
Cu₂O	15	0,14	2,71 ^b	1,94	0,33	0,35
	150	0,15	2,97 ^b	1,90	0,34	0,21
	300	0,16	4,63 ^b	2,16	0,48	0,50
SEM		0,013	0,759	0,064	0,032	0,145
<i>P value</i>						
Source		NS	<0,05	NS	NS	NS
Dose		NS	<0,01	<0,01	<0,01	<0,1
Source*Dose		NS	<0,05	NS	NS	NS

Figure 1. Effet des sources et doses de cuivre sur l'activité de la phytase à pH 4,5

