

PHYTASE DE NOUVELLE GENERATION : EVALUATION D'UNE DOSE STANDARD ET DU SUPERDOSING CHEZ LES ANIMAUX REPRODUCTEURS

Rousseau Xavière¹, Michard Jacky², Alleno Christophe³, Gomes Gilson¹

¹ AB VISTA, Marlborough Business Park, SN8 4AN – MARLBOROUGH, Angleterre

² HUBBARD - Mauguierand, 22800 – LE FOEIL, France

³ ZOOTECHS – Parc Technologique du Zoopôle – 22440 PLOUFRAGAN, France

Xaviere.rousseau@abvista.com

RÉSUMÉ

La formulation des aliments chez les animaux reproducteurs représente un enjeu crucial en termes de coût alimentaire et de performances. L'utilisation de phytase de nouvelle génération PhyNG représente un levier non négligeable pour répondre à ces enjeux. Dans cette étude, 3 régimes ont été testés : 1) régime témoin-CTR (phytase *E.coli* à 500 FTU/kg avec une contribution de 0,10% de P disponible et 0,10% de calcium), 2) régime supplémenté avec 300 FTU/kg d'une phytase de nouvelle génération-PhyNG300 (avec une contribution de 0,15% de P disponible et 0,165% de calcium) et 3) régime 2+1000 FTU/kg-PhyNG1300 (même contribution que PhyNG300). Un total de 1080 femelles Hubbard (grands-parentaux) de 41 semaines ont été placées en cages de 4 animaux ainsi que 168 reproducteurs mâles Hubbard de 40 semaines en cages individuelles. Les performances des pondeuses ont été mesurées à 45, 52 et 61 semaines alors que le sperme de 150 mâles a été collecté à 51 et 60 semaines pour en évaluer la quantité et qualité. Les données ont été traitées par ANOVA avec une comparaison des moyennes en utilisant le test de t-Student. Les poules avec PhyNG 300 avaient un meilleur taux de ponte ($P<0,05$) que le CTR et le PhyNG1300. L'utilisation de 1300 FTU/kg a entraîné une augmentation du poids d'œuf ($P=0,04$) et de hauteur d'albumen ($P=0,03$) ainsi qu'une amélioration de la fertilité des œufs comparé au RC ($P<0,10$) et une proportion de poussins de 1^{ère} qualité améliorée ($P=0,037$). L'utilisation de 1300 FTU/kg a permis d'augmenter la quantité de sperme ($P=0,039$) comparé au CTR (+13,9%) et au régime PhyNG300 (+11,0%). L'utilisation de PhyNG permet avec une dose plus faible et une meilleure valorisation d'améliorer les performances tout en réduisant considérablement le coût alimentaire alors que l'utilisation de doses plus élevées sans valorisation pourrait être un outil pour limiter les effets négatifs lié à l'âge sur la qualité du sperme.

ABSTRACT

New generation phytase: evaluation of standard dose and superdosing in breeders

Feed formulation for breeders represents a crucial challenge in terms of dietary cost and performance. New generation phytase PhyNG can be a substantial way to cope with. This study tested 3 dietary treatments: 1) control diet – CTR (*E.Coli* phytase at 500 FTU/kg with a contribution of 0.10% available P and 0.10% of calcium), 2) diet supplemented with 300 FTU/kg of a new generation phytase-PhyNG300 (with a contribution of 0.15% available P and 0.165% calcium) and 3) treatment 2 +1000 FTU/kg – PhyNG1300 (with the same contribution as PhyNG300). A total of 1080 Hubbard females (grandparents) at 41 weeks were placed 4 per cages and 168 Hubbard roosters at 40 weeks were placed in individual cages. Laying hens performance were measured at 45, 52 and 61 weeks whereas sperm was collected on 150 males at 51 and 60 weeks to evaluate quantity and quality. Data were analysed in using ANOVA and treatments means were separated using Student's T-test. Females with PhyNG300 had a better laying rate ($P<0.05$) than CTR and PhyNG1300. An increase of egg weight ($P=0.04$) and albumen height ($P=0.03$) was observed with the use of 1300 FTU/kg with a concomitant improvement of egg fertility compared to CTR ($P<0.10$) and of 1st chick's quality proportion of ($P=0.037$). The quantity of sperm was increased ($P=0.039$) by the use of PhyNG1300 compared to CTR (+13.9%) and PhyNG300 (+11.0%). PhyNG allow using a lower dose with a higher matrix contribution with better performance in reducing considerably the dietary cost whereas using high dose without any valorisation could serve as a tool to mitigate negative effects related to the age on sperm quality

INTRODUCTION

La formulation des aliments chez les animaux reproducteurs représente un enjeu crucial en termes de coût alimentaire et de performances. L'utilisation de phytase de nouvelle génération (**PhyNG**) représente un levier non négligeable pour répondre à ces enjeux. En effet, il est aujourd'hui reconnu que la supplémentation en phytase est un outil d'épargne des phosphates inorganiques et de nombreuses études ont été menées pour les différentes productions avicoles permettant de donner des valeurs matricielles robustes aux phytases en termes de phosphore, calcium et autres nutriments. Le concept de « superdosing » (i.e utilisation de la phytase sans valorisation matricielle) permet en dégradant de façon optimale les différents esters de phytates (IP6, IP5, IP4, IP3, IP2) d'épargner en partie les effets négatifs que peuvent avoir ces derniers. En effet, les phytates représentent un réservoir de phosphore quasiment indisponible sans phytase exogène chez les monogastriques mais peuvent aussi apparaître comme facteurs antinutritionnels. En effet, les différents esters de phytate ont des effets négatifs liés à leur capacité de chélation des cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , etc.). Ces phytates, mêmes présents à faibles concentrations, diminuent aussi l'activité de certaines enzymes digestives (Yu et al., 2012 ; Liu et al., 2009) et augmentent les pertes endogènes (Cowieson et Ravindran, 2017). Le superdosing est un concept visant à s'affranchir de l'ensemble de ces effets négatifs au-delà de la réponse au phosphore (Walk et al., 2013) pour libérer les nutriments possiblement chélatés (Selle et al., 2012), diminuer les pertes endogènes (Cowieson et Ravindran, 2007 ; Zouaoui et al., 2018) et potentialiser la production d'inositol (Laird et al., 2016 ; Lee et al., 2017) afin d'augmenter les performances de croissance (Walk et al., 2013). Si les effets et l'intérêt de ce concept apparaissent clairs chez les poulets de chair, l'information sur son utilisation chez les animaux reproducteurs est rare voire inexistante.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1 Traitements expérimentaux

Trois traitements alimentaires expérimentaux ont été évalués (Tableau 1) : 1) régime témoin-CTR (phytase *E.coli* à 500 FTU/kg avec une contribution de 0,10% de P disponible et 0,10% de calcium), 2)

régime supplémenté avec 300 FTU/kg d'une phytase de nouvelle génération-**PhyNG300** (Quantum Blue, AB Vista, formulée en accord avec les valeurs matricielles minérales recommandées ; 0,15% de P disponible et 0,165% de calcium) et 3) régime 2+1000 FTU/kg-**PhyNG1300** (Quantum Blue, AB Vista, total 1300 FTU/kg ; avec une contribution de 0,15% de P disponible et 0,165% de calcium).

L'essai a été mené par Zootests dans une ferme commerciale adaptée pour des études en conditions de terrain.

1.2 Dispositif et mesures : Femelles grands-parentales

Un total de 1080 femelles (Hubbard) grands-parentales, âgées de 41 semaines au début de l'essai ont été placées dans 270 cages comprenant 4 oiseaux par cage. Une unité expérimentale était constituée de 6 cages et chaque traitement répété 14 fois (84 cages par traitement). Une répétition de 6 cages par traitement (18 cages) a été conservée comme tampon pour pouvoir maintenir l'équité en nombre d'animaux par cage. L'aliment était distribué à raison de 155g/poule/jour et ce pour les 14 répétitions. L'aliment se présentait sous forme de farine grossière après traitement thermique à 80°C pendant 2 minutes. Les performances ont été suivies pendant les 140 jours d'essai (poules de 61 semaines à la fin de l'essai). La mortalité (journalière), le taux de ponte (journalier) et la qualité des œufs ont été évalués à 45, 52 et 61 semaines. L'évaluation de la qualité des œufs a été effectuée à partir de 28 œufs/traitement à 50 et 60 semaines pour déterminer la hauteur d'albumen et le calcul de l'unité Haugh. La qualité de coquille a été évaluée à l'aide d'une machine à compression MTS Synergie 200. L'insémination artificielle a été adoptée pendant l'essai et les mâles ont reçu le même aliment que les femelles. A 51 (1800 œufs/trt), 57 (1800 œufs/trt) et 60 semaines (900 œufs/trt), les œufs ont été envoyés dans un couvoir commercial où les mesures suivantes ont été effectuées : fertilité, taux d'éclosion, % de poussins de 1^{ère} et 2nd qualité (Les principaux critères de classification sont la présence d'ombilics noirs, semaine d'éclosion, autres défauts morphologiques).

1.3 Dispositif et mesures : Mâles grands-parentaux

Un total de 168 mâles reproducteurs (Hubbard) de 40 semaines ont été placés en cages individuelles (56

oiseaux par traitement). La distribution d'aliment était restreinte à 120 g/oiseau/jour. A 51 et 60 semaines, le sperme a été collecté sur 150 mâles (50 oiseaux/traitement). La qualité du sperme a été évaluée pour chaque mâle. L'animal est donc considéré comme unité expérimentale. Les critères d'évaluation étaient la quantité de sperme, la concentration, la motilité (évaluer visuellement sous microscope : 1 (non motile) à 8 (motilité excellente)) et le pourcentage de spermatozoïdes vivants.

Les données ont été soumises à une analyse de variance ANOVA (JMP 13.0, SAS). Les moyennes par traitements ont été comparées via un test de Student. La significativité a été acceptée pour des valeurs de $P \leq 0,05$ et les tendances analysées pour des valeurs de $P \leq 0,10$.

2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats d'analyse phytasique étaient en accord avec les valeurs attendues pour les 3 lots de fabrication (en moyenne 472, 446 et 1187 FTU/kg pour CTR, PhyNG300 et PhyNG1300 respectivement).

Les résultats de cet essai ont logiquement montré un effet délétère de l'âge quel que soit le critère considéré. Les poules nourries avec le régime PhyNG300 ont montré un meilleur taux de ponte ($P < 0,05$) que les animaux ayant reçu le régime CTR supplémenté avec 500 FTU/kg d'*E.Coli* phytase ou le régime PhyNG1300 (Tableau 2).

Tableau 2. Performance des femelles grands-parentales

Traitement	Taux de ponte, % (moyenne/écart-type)
CTR, E.Coli 500FTU/kg	51,5 ^b ±12.9
PhyNG 300	53,2 ^a ±12.1
PhyNG 1300	52,0 ^b ±12.9
P-value	
Effet régime	0,001
Effet semaine	< 0,001
Interaction régime*semaine	0,571

Les moyennes par colonne suivies de lettres différentes sont statistiquement différentes

Les poules nourries avec l'aliment « superdosing », PhyNG1300 montrent un poids d'œuf ($P = 0,044$), une hauteur d'albumen ($P = 0,027$) et unité Haugh ($P = 0,025$) plus élevés. Ceci est probablement lié à une digestibilité améliorée des protéines et acides aminés de l'aliment via la dégradation plus importante des phytates comme observé par Walk et

Rama Rao (2018) chez le poulet de chair et par le travail de méta-analyse de Zouaoui et al. (2018) chez le porc (Tableau 3).

Tableau 3. Performance des femelles grands-parentales

Traitement	Poids œuf, g	Jaune, %	Albumen, %	Hauteur Albumen, mm	Unité Haugh
CTR	69,3 ^{ab}	31,6 ^{AB}	59,8 ^B	6,47 ^b	76,4 ^b
PhyNG 300	68,7 ^b	31,0 ^B	60,5 ^A	6,44 ^b	76,3 ^b
PhyNG 1300	69,5 ^a	31,6 ^A	59,9 ^{AB}	6,66 ^a	77,9 ^a
Régime, P-value	0,044	0,075	0,075	0,027	0,025

Les moyennes par colonne suivies de lettres différentes sont statistiquement différentes (^{a-b} $P < 0,05$ et ^{A-B} $P < 0,10$)

En effet, plusieurs auteurs ont démontré que l'utilisation de phytase de nouvelle génération, à hautes doses, permettait d'améliorer la digestibilité des acides aminés engendrant un meilleur gain de poids et un meilleur IC chez le poulet de chair (Walk et al., 2013) ou encore chez le porc (Cordero et al., 2014). Il est à noter qu'il y eu dans cette étude un effet de l'âge ($P < 0,001$) sur tous les paramètres d'évaluation de la qualité des œufs mesurés où le poids des œufs devient de plus en plus lourd avec relativement plus de jaune et moins d'albumen (données non montrées).

Cependant, il n'a pas été observé d'interaction entre le régime et les semaines ($P > 0,010$, données non montrées). La fertilité des œufs (Tableau 4) des poules ayant reçu le régime PhyNG1300 (63,8%) tendent à être meilleure que les animaux ayant reçu le régime CTR (59,3%) alors que les animaux ayant reçu le régime PhyNG300 présente un niveau intermédiaire (63,4%, $P = 0,082$) (Tableau 4).

Tableau 4. Résultats des paramètres d'éclosion

Traitement	Fertilité, %	Taux d'éclosion, %	Poussin de 1 ^{ère} qualité, %	Poussin de 2 ^{ème} qualité, %
CTR	59,3 ^B	60,1	71,0 ^b	29,0 ^a
PhyNG* 300	63,4 ^{AB}	62,2	77,0 ^a	23,0 ^b
PhyNG* 1300	63,8 ^A	62,3	74,3 ^{ab}	25,7 ^{ab}
Régime, P-value	0,082	0,577	0,037	0,037

Les moyennes par colonne suivies de lettres différentes sont statistiquement différentes (^{a-b} $P < 0,05$ et ^{A-B} $P < 0,10$)

Un effet de l'âge a pu aussi être noté sur tous les paramètres évalués concernant le taux d'éclosion ($P < 0,01$) avec, en général, un déclin de la fertilité, du taux d'éclosion et de la qualité des poussins

(données non montrées). Aucune interaction n'a été montrée entre les régimes et les semaines ($P > 0,10$). Les animaux ayant reçu le PhyNG300 ont montré de meilleures performances et, numériquement, un meilleur taux d'éclosion comparé au régime CTR représentant 3 poussins de plus par poule et 5 poussins gradés de 1^{ère} qualité supplémentaire (données non montrées). Le régime PhyNG1300 a montré des performances intermédiaires. Une destruction plus importante des phytates avec l'utilisation de 1300 FTU/kg de cette nouvelle génération de phytase a probablement engendré le poids d'œuf plus important qui par conséquent a pu affecter les performances de ponte.

Concernant les mâles, un effet de l'âge sur l'ensemble des paramètres de qualité du sperme a été noté ($P \leq 0,05$) (Tableau 5). La quantité de sperme et la viabilité ont été positivement influencées avec le régime PhyNG1300 ($P \leq 0,05$). Une interaction entre le régime et l'âge a été observée sur la viabilité du sperme ($P = 0,006$). A 51 semaines d'âge, le pourcentage de spermatozoïdes vivants du régime CTR était inférieur (50,0%) comparé aux régimes

supplémentés avec la phytase de nouvelle génération (69,0% et 63,4% pour PhyNG300 et PhyNG1300 respectivement). A 60 semaines le régime « superdosing » PhyNG1300 montre un pourcentage de spermatozoïdes vivants supérieur comparé au pourcentage à 51 semaines observé avec le régime CTR (+7 points).

CONCLUSIONS

L'utilisation de 300 FTU/kg de la phytase de nouvelle génération améliore les performances et réduit le coût de l'aliment en comparaison au régime CTR via la meilleure valorisation matricielle. Le superdosing à 1300 FTU/kg en augmentant la destruction des phytates améliore la disponibilité des nutriments ce qui pourrait augmenter la taille des œufs. L'utilisation de phytase à haute dose devrait donc être prise en compte et valorisée en termes de formulation. Cependant, le concept de superdosing pourrait servir d'outil pour modérer les effets néfastes de l'âge sur la qualité du sperme et améliorer potentiellement la fertilité de ces derniers.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cordero C., Rousseau X., Philipps P., Walk C., Wilcock P., 2014. Journées de la Recherche Porcine, Paris 04-05 Février 2014.
- Cowieson A.J. et Ravindran V., 2007. Br.J.Nutr. 98 :745-752.
- Laird S., Kühn I., Wilcock P., and H.M. Miller., 2016. J. Anim. Sci. 2016.94:142-145.
- Lee S.A., Nagalakshmi D., Raju M.V.L.N, Rama Rao S.V., Bedford M.R., 2017. Animal Nutrition Journal 2017, doi :10.1016/j.aninu.2017.07.002.
- Liu N., Ru Y.J., Li F.D., Wang J. and Lei X., 2009. Arch. Anim. Nutr. 63 :292-303.
- Selle P.H., Cowieson A.J., Cowieson N.P., Ravindran V., 2012. Nutr. Res. Rev. 13,255-278.
- Walk C.L., Bedford M.R., Santos T.S., Paiva D., Bradley J.R., Wlodecki H., Honaker C., and McElroy A.P., 2013. Poult. Sci. 92 :719-725.
- Walk C.L. and Rama Rao S.V., 2018. Poult. Sci. 0 :1-12.
- Yu S., Cowieson A., Gilbert C., Plumstead P. and Dalsgaard S., 2012. J. Anim. Sci. 90 :1824-1832.
- Zouaoui M., Létourneau-Montminy M.P., Guay F., 2018. Anim. Feed Sci. And Tech. 238 :18-28.

Tableau 1. Composition des traitements alimentaires expérimentaux

Ingrédients (g/kg)	CTR	PhyNG300	PhyNG1300
Maïs	422	420	420
Blé	250	250	250
Tourteau tournesol 36%	90	90	90
Tourteau de soja 48%	62	61	61
Drêches de maïs	30	30	30
Son de blé	23	28	28
Limestone (grossier)	54,8	55,1	55,1
Limestone (fin)	20	20	20
DiCalcium Phosphate	7,8	5,3	5,3
E.Coli phytase	0,1		
Quantum Blue 5G		0,06	0,06
Nutriments			
Calcium, %*	3,4	3,4	3,4
Phosphore, %	0,5	0,46	0,46
Phosphore disponible, %*	0,36	0,36	0,36
EMA, kcal/kg	2700	2700	2700

*les valeurs représentent les valeurs formulées obtenues pour les aliments non supplémentés en phytase

Tableau 5. Evaluation de la qualité du sperme

Traitement	Semaine	Quantité de sperme, mg	Concentration x10 ⁶ /mg	Score de motilité	spermatozoïde vivant,%
CTR	51	641	6,63	3,1	50,0 ^c
PhyNG300*		614	7,40	3,0	69,0 ^a
PhyNG1300*		684	7,23	3,2	63,4 ^{ab}
CTR	60	480	6,19	2,6	52,3 ^c
PhyNG300*		546	5,90	2,6	47,9 ^c
PhyNG1300*		621	6,68	2,8	57,0 ^{bc}
Effet régime					
CTR		563 ^b	6,42	2,9	51,1 ^b
PhyNG300*		582 ^{ab}	6,68	2,8	58,6 ^a
PhyNG1300*		654 ^a	6,97	3,0	60,3 ^a
Effet âge					
	51	646	7,09	3,1	60,8
	60	549	6,26	2,7	52,2
Régime		0,039	0,141	0,628	0,033
Semaine		0,002	<0,0001	0,006	0,005
Régime*semaine		0,350	0,113	0,965	0,006

Les moyennes par colonne suivies de lettres différentes sont statistiquement différentes

EXPRESSION DE GÈNES CANDIDATS DE L'ABSORPTION INTESTINALE DE CA CHEZ LA POULE LORS DE LA MATURITE SEXUELLE

**Audrey Gloux¹, Nathalie Le Roy¹, Aurélien Brionne¹, Emilie Bonin², Amélie Juanchich¹,
Gaëlle Benzoni³, Yves Nys¹, Joël Gautron¹, Agnès Narcy¹, Michel J. Duclos¹**

1 BOA, INRA, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France

2 GeT PlaGe INRA Auzeville 31326 Castanet Tolosan Cedex,

3 Neovia, Saint-Nolff, France

Michel.Duclos@inra.fr

RÉSUMÉ

Chez la poule en ponte, un équilibre optimal entre l'absorption intestinale de calcium (Ca) et la mobilisation osseuse doit être maintenu pour permettre la biominéralisation de la coquille. L'absorption intestinale de Ca implique deux voies majeures, l'une transcellulaire et l'autre paracellulaire. La première impliquant la calbindine-D 28K (CALB1) a été bien décrite chez *Gallus gallus*, à la différence de la seconde. Chez la poule, la protéine CALB1 et son ARNm augmentent avec l'accroissement du transfert de Ca intestinal induit à la maturité sexuelle. Cependant, la voie transcellulaire pourrait s'avérer insuffisante lorsque l'ingéré calcique est très élevé en période de ponte, avec une absorption de Ca majoritaire dans le duodénum et le jéjunum. L'objectif de cette étude est de quantifier le niveau d'expression de gènes cibles des voies transcellulaire et paracellulaire de captation du Ca dans les parties proximales de l'intestin (duodénum, jéjunum, iléum) chez la poule à la maturité sexuelle. La quantification des ARNm obtenus à partir d'échantillons de muqueuse intestinale (duodénum, jéjunum et iléum) a été réalisée par une technique de RT-qPCR microfluidique à haut-débit (BioMark HD system) sur la base des gènes candidats sélectionnés. A maturité sexuelle, les gènes de la voie transcellulaire sont fortement exprimés dans le duodénum et le jéjunum pour la CALB1, uniquement dans le duodénum pour TRPM7, ATP2B1 et ATP2B2, à des niveaux intermédiaires dans le jéjunum pour TRPM7 et ATP2B1, et sont finalement faiblement exprimés dans l'iléon. D'autre part, cette étude montre pour la première fois que les gènes de la voie paracellulaire tels que CLDN2, ZO1 et ZO2 sont induits dans les trois tissus à 23 semaines d'âge. L'ensemble des résultats suggèrent que, chez la poule pondeuse, la forte absorption intestinale de Ca est soutenue par les gènes des voies transcellulaire et paracellulaire dans le duodénum et le jéjunum. Ce travail ouvre des perspectives pour une meilleure maîtrise de l'alimentation calcique de la poule pondeuse.

ABSTRACT

Expression of candidate genes of intestinal Ca absorption in laying hen at sexual maturity

In laying hen, an optimal balance between intestinal calcium (Ca) absorption and bone mobilization must be maintained for the eggshell biomineralization. Intestinal Ca absorption involves two major pathways, one transcellular and one paracellular. The first involving calbindin-D 28K (CALB1) was well described in *Gallus gallus*, in contrast to the second pathway. In hen, quantity of CALB1 protein and transcript increases with the enhanced intestinal Ca transfer induced at sexual maturity. However, the transcellular pathway may be insufficient when calcium intake is very high during this transition period, with Ca uptake predominating in the duodenum and jejunum. The aim of this study is to investigate the expression level of genes of the transcellular and paracellular Ca absorption pathways in the proximal parts of the intestine (duodenum, jejunum, and ileum) in hen at sexual maturity. The quantification of mRNAs of selected candidate genes was performed on each intestinal mucosal samples (duodenum, jejunum and ileum) using a high throughput microfluidic qRT-PCR technique (BioMark HD system). At sexual maturity, genes of the transcellular pathway are highly expressed in duodenum and jejunum for CALB1, only in duodenum for TRPM7, ATP2B1 and ATP2B2, at intermediate levels in the jejunum for TRPM7 and ATP2B1, and at low level in the ileum. Additionally, this study highlights for the first time that genes of the paracellular pathway such as CLDN2, ZO1 and ZO2 are induced in the three tissues at 23 weeks of age. Based on these results, we suggest that the high intestinal Ca absorption is supported by genes involved in the transcellular and paracellular pathways in the duodenum and jejunum. This work opens perspectives to optimize dietary Ca nutrition of the laying hen.

INTRODUCTION

Chez la poule en ponte, la formation de la coquille dans l'utérus, est un processus très rapide se déroulant principalement la nuit, lorsque la poule ne peut accéder à son alimentation. De fortes quantités de calcium (Ca) sont exportées quotidiennement, (environ 2 g) par la glande utérine. Pour faire face à ce besoin exacerbé en Ca, la poule adapte sa physiologie à différents niveaux, en augmentant son appétit calcique quelques heures avant l'extinction de la lumière, et la sécrétion acide dans le gésier favorisant la solubilisation du Ca au cours de la période précédant la calcification (Nys, 1990, Jonchère et *al.*, 2012). Ces processus digestifs concourent à doubler l'absorption intestinale de Ca au début de la calcification de la coquille (Hurwitz et *al.*, 1973). Cette augmentation de la captation digestive de Ca chez la poule mature fait aussi intervenir le métabolisme de la vitamine D à travers la régulation de l'expression de gènes impliqués dans ce transfert de Ca (Nys et *al.*, 1992).

Deux voies d'absorption du Ca sont connues chez les mammifères : la voie transcellulaire impliquant un transport actif et une autre paracellulaire permise par une diffusion passive de Ca au niveau des jonctions intercellulaires entre les entérocytes. Des gènes distincts interviennent dans ces deux voies. Chez *Gallus gallus*, seule une partie des acteurs de la voie transcellulaire a été étudiée dont l'identification dans les entérocytes de poussin d'une protéine induite par la vitamine D, la Calcium Binding Protein aussi appelée Calbindine (CALB1) (Wasserman et Taylor, 1966). Chez la poule, une induction des niveaux d'expression du gène CALB1 et de production de sa protéine a été observée simultanément à l'augmentation de l'absorption intestinale de Ca, à la maturité sexuelle (Nys et *al.*, 1986 et 1992). Les ARNm des acteurs intervenant dans l'entrée (TRPV6) et la sortie (ATP2B1, ATP2B2, ATP2B4) transcellulaires ont également été détectés dans le duodénum de la poule (Jonchère et *al.*, 2012). A l'inverse les acteurs de la voie paracellulaire n'ont pas été étudiés jusqu'alors.

L'objectif de cette étude est de proposer une description plus complète des gènes impliqués dans les voies transcellulaire et paracellulaire d'absorption du Ca, dans les parties proximales de l'intestin (duodénum, jéjunum, iléum) chez la poule pondeuse à la maturité sexuelle. Les travaux de Bar et Hurwitz (1966, 1968) ont montré une implication différente de ces trois segments intestinaux dans l'absorption de Ca, en proposant que la majorité du Ca est absorbé avant l'iléon. Dans ce contexte, la présente étude vise à mesurer les niveaux d'expression des gènes candidats dans les trois segments de l'intestin grêle chez des poules prélevées à un stade immature (12 semaines d'âge) et mature (23 semaines d'âge).

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Dispositif expérimental et prélèvements intestinaux

L'expérimentation a été conduite au Pôle Expérimental Avicole de Tours à l'INRA de Nouzilly, et validée par le comité d'éthique régional ainsi que le ministère français de l'éducation et de la recherche (Paris, France, autorisation : 10043). Les poules immatures (Isa Brown, Hendrix Ploufragan) ont été élevées en cages collectives à partir de 10 semaines d'âge jusqu'à l'âge d'abattage, selon les conditions environnementales préconisées par le sélectionneur. En parallèle, les poules matures ont été installées dans des cages individuelles équipées de capteurs d'enregistrement d'heures de ponte. Le programme lumineux était de 14h de lumière et 10h de nuit. Les animaux ont reçu un aliment du commerce contenant 1% et 3,5% de Ca total pour les poules immatures et matures, respectivement. Pour chacun des deux lots, six animaux ont été mis à mort au stade 9-10h post-ovulation, par injection intraveineuse de Dolethal® (182 mg/ml, pentobarbital sodium, Vetoquinol, France) au niveau du sinus occipital. Le duodénum, le jéjunum et l'iléon ont été prélevés et rincés dans une solution de tampon phosphate salin, puis un échantillon proximal de muqueuse a été gratté pour chaque segment. Les échantillons ont ensuite été instantanément congelés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C.

1.2. Préparation des cDNA et analyses des données

Les ARN totaux ont été extraits des échantillons de muqueuse, selon la méthode décrite par Chomczynski and Sacchi (1987) à l'aide du kit RNeasy (Qiagen, Saint-Quentin en Yvelines, France). La concentration et la qualité des ARN extraits ont ensuite été contrôlées à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop 1000 spectrophotometer, Nanodrop Technology, Wilmington, DE). Pour chaque échantillon, 5 µg d'ARN totaux ont été soumis à un traitement par la DNase (DNAfree, Invitrogen™) avant d'être rétro-transcrits en ADNc grâce à la RNase H-MMLV reverse transcriptase (Superscript II, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) à partir d'amorces aléatoires hexamères (Amersham, Orsay, France). Sur la base des gènes sélectionnés, les amorces ont été réalisées (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), testées (RT-qPCR) et les produits de PCR séquencés (Genewiz, United Kingdom). La mesure des niveaux d'ARNm dans chaque échantillon a été faite par RT-qPCR avec la technologie Fluidigm BioMark HD system à la plateforme GeT-Plage (INRA Auzeville, Castanet-Tolosan). La quantification relative des ARNm a été réalisée avec la méthode de calcul des $\Delta\Delta C_t$ proposée par Pfaffl et *al.* (2001). Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R, les niveaux relatifs d'ARNm pour chaque gène ont été comparés avec un modèle linéaire à effets mixtes à

deux facteurs (Age x Segment intestinal) en considérant la poule comme effet aléatoire avec l'aide de la fonction lme du package nlme (version 3.1-137). Lorsqu'une différence statistique est observée au seuil de 5%, les comparaisons deux à deux ont été réalisées avec la fonction emmeans du package emmeans (version 1.2.1)

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Deux gènes candidats pour l'entrée de Ca dans l'entérocyte ont été identifiés dans cette étude : TRPV2, canal ionique facilitant l'entrée de Ca dans la cellule (Kanzaki et al., 1999) et TRPM7, canal à cation divalent (Owsianik et al., 2006 et Chubnov et al., 2004). Le niveau d'expression de TRPV2 tend à diminuer dans le jéjunum à la maturité sexuelle, conduisant à des niveaux similaires à 23 semaines pour les trois segments (Tableau 1). TRPM7 voit son expression augmenter significativement à la maturité sexuelle dans le jéjunum, ce qui conduit une expression similaire à 23 semaines d'âge dans les trois segments (Tableau 1). Ces résultats permettent de proposer TRPM7 comme un gène candidat responsable de l'entrée de Ca dans le duodénum et le jéjunum, car sa régulation est similaire dans ces deux portions intestinales alors qu'il varie peu dans l'iléon. Les ARNm codant pour TRPV6 n'ont pas été détectés dans cette étude, malgré l'utilisation d'amorces validées dans le rein. Ce gène ne semble donc pas être impliqué dans l'entrée de Ca dans l'entérocyte dans le modèle physiologique définit. La CALB1 est responsable du transit du Ca du pôle apical vers le pôle basal de l'entérocyte. Son expression est significativement stimulée à 23 semaines dans le duodénum et le jéjunum confirmant les travaux de Nys et al. (1992) pour le duodénum (Tableau 1). Pour les gènes responsables de la sortie de Ca au pôle basal de l'entérocyte, ATP2B1 augmente significativement entre 12 et 23 semaines d'âges dans tous les segments et a le niveau d'expression le plus élevé dans le duodénum (Tableau 1). ATP2B2 et ATP2B4 semblent aussi contribuer à ce mécanisme, mais de façon spécifique par rapport à l'âge et au segment considéré. Une forte expression d'ATP2B2 est observée à 23 semaines d'âge dans le duodénum (Tableau 1). L'expression d'ATP2B4 diminue dans le jéjunum entre 12 et 23 semaines d'âge, mais augmente dans l'iléon à la maturité sexuelle (Tableau 1). Cette augmentation dans l'iléon pourrait donc compenser la faible expression d'ATP2B1 observée. Ces résultats confirment ceux obtenus par Jonchère et al. (2012) dans le duodénum de poule et les étendent aux segments distaux. Le transport de Ca dans l'espace intercellulaire (*i.e* entre les entérocytes) se déroule à travers les jonctions serrées (Suzuki, 2013), qui sont composées de différentes protéines transmembranaires et cytosoliques facilitant la formation de pores perméables aux ions et à l'eau (Suzuki, 2013). La Claudin-2 (CLDN2) qui est

transmembranaire a été identifiée comme perméable au Ca^{2+} dans des cellules épithéliales intestinales (Fujita et al., 2008). Dans notre étude, son expression augmente significativement entre 12 et 23 semaines d'âge dans les deux premiers segments intestinaux (Tableau 2). Ce résultat suggère que la régulation de la CLDN2 est fortement induite dans le duodénum et le jéjunum entre 12 et 23 semaines d'âge parallèlement à l'augmentation de l'absorption de Ca provoquée par l'entrée en ponte. La CLDN2 est ancrée au cytosol par les protéines des jonctions serrées, zonula occludens ZO1, ZO2 et ZO3 (Suzuki, 2013). Les niveaux d'expression de ZO1 et ZO2 augmentent avec l'âge dans les trois segments, alors que pour ZO3 son expression ne semble pas être régulée en fonction de l'âge, mais plutôt en fonction du segment intestinal avec un niveau élevé dans le jéjunum et l'iléon (Tableau 2). ZO1 et ZO2 pourraient contribuer fortement à l'ancrage des protéines transmembranaires au cours de l'augmentation de l'absorption de Ca lors de la maturité sexuelle dans les trois segments, alors que ZO3 est régulée au niveau tissulaire. Le métabolisme de la vitamine D est fortement induit à la maturité sexuelle en raison de la forte augmentation de la concentration plasmatique de la forme hormonale de la vitamine D, le $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Nys et al., 1992). L'expression du récepteur nucléaire de la Vitamine D (VDR) activée par son ligand $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Dusso et al., 2005), est induite significativement dans le jéjunum entre 12 et 23 semaines d'âge (Tableau 2).

CONCLUSION

Les travaux de Hurwitz et Bar (1966 et 1968) ont permis de montrer que l'absorption de Ca chez la poule intervient majoritairement dans le duodénum et le jéjunum, et de manière plus modeste dans l'iléon. Ces trois segments présentent des capacités d'absorption de Ca différentes car la quantité de Ca ultrafiltrable (ionisé et non ionisé), la fraction de Ca actif ainsi que la différence de potentiel électrique sont supérieures dans le duodénum par rapport au jéjunum et très faible dans l'iléon.

La forte capacité d'absorption du Ca par le jéjunum résulte du temps de transit plus long dans ce compartiment par rapport au duodénum. Les différences de capacité d'absorption du Ca dans ces trois tissus peuvent aussi être expliquées par l'implication à différents niveaux d'acteurs moléculaires comme le propose cette étude. Les acteurs moléculaires de la voie transcellulaire sont fortement exprimés dans le duodénum et le jéjunum pour la CALB1, dans le duodénum pour TRPM7, ATP2B1 et ATP2B2, à des niveaux intermédiaires dans le jéjunum pour TRPM7 et ATP2B1, et faiblement exprimés dans l'iléon sauf pour ATP2B4. Ce travail montre pour la première fois que les gènes de la voie paracellulaire, dont ceux codant pour la CLDN2, ZO1 et ZO2, sont induits dans les trois

segments à 23 semaines. D'après ces résultats, il semblerait que la forte absorption intestinale de Ca soit soutenue par les gènes des voies transcellulaire et paracellulaire dans le duodénum et le jéjunum.

.com / fr /). Les auteurs remercient Maryse Leconte et Nathalie Mème (UMR BOA INRA Université de Tours) pour leur assistance technique, Philippe Didier (UE PEAT INRA) pour le suivi des expérimentations, et Christelle Hennequet-Antier (UMR BOA INRA Université de Tours) pour son expertise sur l'analyse statistique.

REMERCIEMENTS

Le projet s'inscrit dans le cadre de l'Institut Carnot France Futur Elevage (<http://www.francefuturelevage>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chubanov V, Waldegger S, Schnitzler Mm, Vitzthum H, Sassen MC, Seyberth HW, et al., 2004. Proc Natl Acad Sci U S A. 101: 2894–2899.
- Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E., 2005. Am J Physiol Ren Physiol. 289: F8--F28.
- Fujita, Sugimoto K, Inatomi S, Maeda T, Osanai M, Uchiyama Y, Yamamoto Y, Wada T, Kojima T, Yokozaki H, Yamashita T, Kato S, Sawada N C., 2008. Mol Biol Cell. 19: 1912–1921.
- Owsianik G, Talavera K, Voets T, Nilius B 2006. Annu. Rev. Physiol., 68, 685-717.
- Hurwitz S, Bar A., 1968. The Journal of nutrition, 95(4), 647-654.
- Hurwitz S, Bar A., 1966. The Journal of nutrition, 89(3), 311-316.
- Hurwitz S, Bar A, Cohen I., 1973. American Journal of Physiology-Legacy Content, 225(1), 150-154.
- Jonchère, V., Brionne, A., Gautron, J., & Nys, Y., 2012. BMC physiology, 12(1), 10.
- Kanzaki, M., Zhang, Y. Q., Mashima, H., Li, L., Shibata, H., & Kojima, I., 1999. Nature cell biology, 1(3), 165.
- Nys, Y., 1990. Doctoral dissertation, Paris 6.
- Nys, Y., Parkes, C. O., & Thomasset, M. 1986. General and comparative endocrinology, 64(2), 293-299.
- Nys, Y., Baker, K., Bouillon, R., Van Baelen, H., & Lawson, D. E. M., 1992. General and comparative endocrinology, 86(3), 460-468.
- Pfaffl, M. W., 2001. Nucleic acids research, 29(9), e45-e45.
- Suzuki, T., 2013. Cellular and molecular life sciences, 70(4), 631-659.
- Wasserman, R. H., & Taylor, A. N., 1966. Science, 152(3723), 791-793.

Tableau 1. Effet de l'âge et du segment intestinal sur les niveaux d'expression d'ARNm des gènes de la voie transcellulaire (moyenne $\pm$ écart-type).

	TRPV2	TRPM7	CALB1	ATP2B1	APT2B2	ATP2B4
12 Duodénum	0,43 $\pm$ 0,14 b	0,61 $\pm$ 0,07 abc	0,16 $\pm$ 0,14 b	0,43 $\pm$ 0,1	0,46 $\pm$ 0,48 b	0,19 $\pm$ 0,07 c
Jéjunum	1,18 $\pm$ 0,13 a	0,38 $\pm$ 0,07 c	0 $\pm$ 0,15 b	0,11 $\pm$ 0,1	0,64 $\pm$ 0,48 b	1,04 $\pm$ 0,07 a
Iléon	0,54 $\pm$ 0,13 b	0,56 $\pm$ 0,07 bc	0,01 $\pm$ 0,14 b	0,24 $\pm$ 0,1	0,39 $\pm$ 0,48 b	0,51 $\pm$ 0,07 b
23 Duodénum	0,74 $\pm$ 0,12 ab	0,88 $\pm$ 0,07 a	1,43 $\pm$ 0,13 a	0,96 $\pm$ 0,1	3,81 $\pm$ 0,44 a	0,31 $\pm$ 0,06 bc
Jéjunum	0,7 $\pm$ 0,12 ab	0,86 $\pm$ 0,07 ab	1,09 $\pm$ 0,14 a	0,78 $\pm$ 0,1	0,53 $\pm$ 0,44 b	0,54 $\pm$ 0,06 b
Iléon	0,61 $\pm$ 0,12 b	0,57 $\pm$ 0,07 abc	0,47 $\pm$ 0,13 b	0,51 $\pm$ 0,1	0,75 $\pm$ 0,44 b	0,91 $\pm$ 0,06 a
12	0,71 $\pm$ 0,08	0,51 $\pm$ 0,04	0,06 $\pm$ 0,11	0,26 $\pm$ 0,06 b	0,50 $\pm$ 0,31	0,58 $\pm$ 0,04
23	0,68 $\pm$ 0,07	0,77 $\pm$ 0,04	0,99 $\pm$ 0,10	0,75 $\pm$ 0,06 a	1,69 $\pm$ 0,28	0,59 $\pm$ 0,03
Duodénum	0,58 $\pm$ 0,09	0,74 $\pm$ 0,05	0,79 $\pm$ 0,10	0,69 $\pm$ 0,07 a	2,14 $\pm$ 0,32	0,25 $\pm$ 0,04
Jéjunum	0,93 $\pm$ 0,09	0,62 $\pm$ 0,05	0,55 $\pm$ 0,10	0,45 $\pm$ 0,07 ab	0,59 $\pm$ 0,34	0,79 $\pm$ 0,44
Iléon	0,57 $\pm$ 0,09	0,56 $\pm$ 0,05	0,24 $\pm$ 0,1	0,38 $\pm$ 0,07 b	0,57 $\pm$ 0,32	0,71 $\pm$ 0,44
Age x Segment	<0,01	<0,05	<0,001	ns	<0,01	<0,001
Age	ns	<0,01	<0,001	<0,001	<0,05	ns
Segment	<0,05	<0,05	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001

Tableau 2. Effet de l'âge et du segment intestinal sur les niveaux d'expression d'ARNm des gènes de la voie paracellulaire et le récepteur à la vitamine D (moyenne $\pm$ écart-type).

	CLDN2	ZO1	ZO2	ZO3	VDR
12 Duodénum	0,17 $\pm$ 0,12 cd	0,33 $\pm$ 0,08	0,35 $\pm$ 0,1	0,48 $\pm$ 0,14	0,78 $\pm$ 0,14 abc
Jéjunum	0,05 $\pm$ 0,12 d	0,34 $\pm$ 0,08	0,54 $\pm$ 0,1	0,94 $\pm$ 0,14	0,23 $\pm$ 0,14 c
Iléon	0,09 $\pm$ 0,12 cd	0,44 $\pm$ 0,08	0,48 $\pm$ 0,1	0,95 $\pm$ 0,14	0,56 $\pm$ 0,14 bc
23 Duodénum	0,87 $\pm$ 0,11 ab	0,85 $\pm$ 0,08	0,63 $\pm$ 0,09	0,85 $\pm$ 0,13	1,03 $\pm$ 0,13 ab
Jéjunum	0,99 $\pm$ 0,11 a	0,71 $\pm$ 0,08	0,79 $\pm$ 0,09	1,07 $\pm$ 0,13	1,19 $\pm$ 0,13 a
Iléon	0,59 $\pm$ 0,11 bc	0,57 $\pm$ 0,08	0,75 $\pm$ 0,09	1,37 $\pm$ 0,13	0,86 $\pm$ 0,13 ab
12	0,11 $\pm$ 0,11	0,37 $\pm$ 0,05 b	0,45 $\pm$ 0,06 b	0,79 $\pm$ 0,11	0,52 $\pm$ 0,10
23	0,82 $\pm$ 0,10	0,71 $\pm$ 0,05 a	0,72 $\pm$ 0,06 a	1,10 $\pm$ 0,11	1,02 $\pm$ 0,8
Duodénum	0,52 $\pm$ 0,08	0,59 $\pm$ 0,06	0,49 $\pm$ 0,07	0,67 $\pm$ 0,10 b	0,90 $\pm$ 0,10
Jéjunum	0,52 $\pm$ 0,08	0,52 $\pm$ 0,06	0,66 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,10 a	0,71 $\pm$ 0,10
Iléon	0,34 $\pm$ 0,08	0,51 $\pm$ 0,06	0,62 $\pm$ 0,07	1,16 $\pm$ 0,1 a	0,71 $\pm$ 0,10
Age x Segment	<0,001	ns	ns	ns	<0,05
Age	<0,001	<0,001	<0,05	ns	<0,01
Segment	<0,05	ns	ns	<0,001	ns