

# EFFET DU TAUX DE PHYTATE ET DE DEUX PHYTASES (ORIGINE BACTÉRIENNE OU FONGIQUE) SUR LE FLUX DES ACIDES AMINÉS ENDOGÈNES CHEZ LE POULET EN CROISSANCE

Cowieson Aaron<sup>1</sup>, Péron Alexandre<sup>1</sup>, Debicki-Garnier Anne-Marie<sup>1</sup>, Messenger Bertrand<sup>2</sup>, Selle Peter<sup>3</sup>, Ravindran Velmuguru<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Danisco Animal Nutrition, Marlborough, SN8 1XN, UK; <sup>2</sup>Altilis Nutrition Animale, 31 Rue Pistouley, 33500 Libourne, France; <sup>3</sup>University of Sydney, Camden, NSW, Australia; <sup>4</sup>Massey University, Palmerston North, New Zealand

## RÉSUMÉ

Les effets de la teneur en phytate et de deux sources de phytase exogène (origine bactérienne ou fongique) sur le flux des acides aminés endogènes dans l'iléon du poulet de chair ont été déterminés par une méthode d'alimentation peptidique. L'étude était organisée selon un schéma factoriel 3 x 2. L'acide phytique (apporté sous la forme de son sel de sodium) était incorporé dans un aliment purifié à une concentration de 0, 8,5 ou 14,5 g/kg d'aliment. Chaque régime expérimental était supplémenté, ou non, avec 500 FTU/kg de phytase exogène d'origine bactérienne (dérivée de *E. coli*) ou fongique (dérivée de *A. niger*). Des hydrolysats de caséine de masse moléculaire inférieure à 10000 Daltons constituaient l'unique source d'azote alimentaire, permettant ainsi de déterminer le flux d'acides aminés endogènes dans l'iléon par séparation des masses moléculaires. Les résultats ont permis de montrer que l'augmentation du taux d'acide phytique de 8,5 à 14,5 g/kg d'aliment augmentait ( $P<0,001$ ) le flux de tous les acides aminés endogènes mesurés. Cette augmentation était de 68 % en moyenne, mais les valeurs s'échelonnaient de 17 % pour la proline à 145 % pour la phénylalanine. Pour l'acide aspartique, la sérine, l'acide glutamique, la leucine, la tyrosine, la phénylalanine et l'histidine, l'augmentation du flux était supérieure à la moyenne, indiquant un changement dans la composition des protéines endogènes en réponse à la présence de fortes concentrations d'acide phytique. L'addition de phytase, quelque soit son origine (bactérienne ou fongique), permettait de réduire ( $P<0,001$ ) le flux des acides aminés endogènes. Toutefois, cette réduction semblait plus importante ( $P=0,06$ ) avec la phytase d'origine bactérienne qu'avec la phytase d'origine fongique. Ces données suggèrent qu'il existerait des différences dans la capacité des phytases exogènes à contrecarrer les effets antinutritionnels de l'acide phytique. Les résultats de cette étude semblent aussi indiquer qu'une part substantielle de la réponse en acides aminés et en énergie suite à la supplémentation des aliments en phytase provient de la réduction du flux des acides aminés endogènes dans le tractus digestif.

## ABSTRACT

The effects of phytic acid and two sources of exogenous phytase (bacterial vs. fungal) on the flow of endogenous amino acids at the terminal ileum of broilers were assessed using a peptide alimentation method. The study followed a 3 x 2 factorial design. Phytic acid (as the sodium salt) was included in a purified diet at 8.5 and 14.5 g/kg and each diet was fed with or without a fungal (*Aspergillus niger*-derived) or a bacterial (*Escherichia coli*-derived) phytase at 500 FTU/kg diet. Enzymatically hydrolysed casein with a molecular weight cut off of <10,000 Daltons was the only source of dietary nitrogen, allowing endogenous protein flow in the ileum to be estimated by molecular weight separation. Increasing the concentration of phytic acid in the diet from 8.5 g/kg to 14.5 g/kg increased ( $P<0.001$ ) the flow of all measured amino acids by an average of 68 %, with a range from 17 % for proline to 145 % for phenylalanine. The flow of endogenous aspartic acid, serine, glutamic acid, glycine, leucine, tyrosine, phenylalanine and histidine were increased by more than the mean, indicating changes in the composition of endogenous protein in response to the presence of higher concentrations of phytic acid. Supplementation with both phytases reduced ( $P<0.001$ ) the flow of endogenous amino acids but the reduction was greater ( $P=0.06$ ) for the bacterial phytase compared with the fungal phytase. These data suggest that the capacity of different phytases to counteract the anti-nutritive properties of phytic acid vary and that a substantial part of the amino acid and energy responses observed following phytase supplementation in broiler chickens stem from reduced endogenous amino acid flows.

## INTRODUCTION

L'emploi des phytases en alimentation animale a permis une réduction du coût des formules, ainsi qu'une diminution des rejets dans l'environnement, ceci grâce à une meilleure utilisation du phosphore (P). Cependant, les bénéfices liés à l'addition de phytase dans les aliments ne se limitent pas à l'amélioration de la rétention de P. Au cours de ces dernières années, de nombreuses études se sont penchées sur les effets dits « extra-phosphoriques » des phytases. Le phytate (IP6) est un facteur antinutritionnel puissant : non seulement il limite la disponibilité de P pour les volailles, mais il possède aussi la capacité d'influencer les dynamiques de sécrétion et d'absorption dans le tractus digestif (Ravindran et al., 1999). Les travaux de Cowieson et al. (2004) ont montré que l'ingestion d'acide phytique pouvait affecter de façon négative les échanges d'acides aminés, de minéraux et d'énergie dans le tube digestif des poulets de chair. Il est maintenant reconnu que l'addition de phytase permet aussi de lutter contre ces phénomènes. Des recherches relativement récentes ont prouvé que les phytases pouvaient augmenter la rétention des acides aminés et de l'énergie (Selle et al., 2000 et 2007; Cowieson et Ravindran, 2007).

Aujourd'hui, il existe différents types de phytases commerciales (origine fongique ou bactérienne, 3- ou 6-phytase, etc...). Chacune d'entre elles possède des caractéristiques qui lui sont propres, ce qui donne lieu à des différences quant aux recommandations des fabricants : à chaque phytase sont associées des valeurs différentes pour ce qui est de l'amélioration des coefficients de digestibilité du P, du calcium, des acides aminés, ou de l'énergie. Ces différences dans les réponses animales pourraient s'expliquer, du moins en partie, par des différences dans l'effet extra-phosphorique des phytases, plus particulièrement en ce qui concerne les effets sur le flux des acides aminés endogènes. L'objectif de cette étude était, à travers un essai réalisé en poulet de chair, d'évaluer l'effet du taux de phytate et de la supplémentation en phytase sur le flux des acides aminés endogènes dans l'iléon.

## 1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 1.1. Dispositif expérimental

300 poulets de chair mâles (souche Ross 308), obtenus à J0 auprès d'un couvoir commercial, étaient placés en parquets et nourris avec un aliment granulé à base de maïs (22,5% PB, 3020 kcal/kg EM, 10,2 g/kg Ca et 7,8 g/kg P total) pendant 14 jours. À J14, les animaux étaient pesés individuellement. 210 étaient alors sélectionnés puis répartis en 42 cages (5 poulets/cage). Les cages étaient divisées, au hasard, en 7 traitements

expérimentaux (6 cages/traitement). De J15 à J21, les animaux étaient nourris avec un aliment présenté sous forme de farine, et obtenu par simple broyage de l'aliment J0-14 dans un broyeur à marteaux équipé d'une grille de 3mm. À J22, un nouvel aliment (C) était introduit. Sa composition est rapportée dans le Tableau 1. Le but de ce régime était d'effectuer une transition avant que les poulets ne reçoivent l'aliment test (HC) de J24 à J28. Présenté dans le Tableau 1, l'aliment test HC contenait 100 g/kg d'hydrolysats de caséine, l'unique source d'azote du régime. Il contenait aussi 3 g/kg de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>), utilisé comme marqueur indigestible. L'aliment HC constituait la base sur laquelle étaient développés les 6 traitements expérimentaux utilisés pour l'étude du flux d'acides aminés endogènes entre J24 et J28. Ces 6 traitements s'organisaient selon un schéma factoriel 2 x 3 : 2 concentrations d'acide phytique (8,5 et 14,5 g/kg) et 3 types de supplémentation enzymatique (phytase d'origine fongique, phytase d'origine bactérienne, ou pas de phytase du tout). Afin de pouvoir déterminer le flux basal d'acides aminés endogènes, une partie des animaux restaient alimentés avec le régime C (qui constituait donc un 7ème traitement) jusqu'à J28. Les deux phytases exogènes, apportées sous forme d'une poudre dont le support ne contenait pas de source d'azote, étaient ajoutées aux formules de façon à apporter 500 FTU/kg d'aliment. La phytase d'origine fongique était une 3-phytase dérivée d'*Aspergillus niger*. La phytase d'origine bactérienne était une 6-phytase dérivée d'*Escherichia coli*.

### 1.2. Prélèvements d'échantillons

À J28, les poulets étaient euthanasiés et le contenu digestif de la seconde moitié de leur iléon était prélevé (Ravindran et al., 1995). Les digesta des animaux d'un même parquet étaient poolés, homogénéisés, congelés, puis lyophilisés. Les contenus lyophilisés étaient ensuite traités par ultrafiltration de façon à séparer les fractions de protéines endogènes, selon la méthode décrite par Ravindran et al. (2004a, b). Les aliments et les échantillons de digesta issus de l'étape d'ultrafiltration étaient alors broyés de façon à passer au travers d'un tamis de 0.5mm, puis conservés à -4°C pour des analyses ultérieures.

### 1.3. Mesures et déterminations

Les aliments, ainsi que les échantillons de digesta issus de l'étape d'ultrafiltration étaient analysés afin de déterminer leur taux de matière sèche, d'azote, d'acides aminés et de dioxyde de titane. La mesure du taux de matière sèche était réalisée selon la méthode 930.15, AOAC International (2005). L'azote total était dosé par la méthode de

combustion 968.06, AOAC International (2005). Le taux de dioxyde de titane était mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre UV, selon la méthode décrite par Short et al. (1996). La détermination des acides aminés était effectuée avec la méthode décrite par Ravindran et al. (2008).

#### 1.4. Calculs et analyses statistiques

Le flux de l'azote et des acides aminés dans l'iléon, exprimé en milligrammes perdus pour chaque kilogramme de matière sèche ingérée, était calculé par la formule suivante (Moughan et al., 1992) : flux de X (mg/kg MS ingérée) = [concentration de X dans le digesta (mg/kg)] x [concentration de dioxyde de titane dans l'aliment (mg/kg) / concentration de dioxyde de titane dans le digesta (mg/kg)]. Les effets du taux d'acide phytique et de la supplémentation en phytase exogène, ainsi que les possibles interactions entre ces facteurs, étaient analysés par ANOVA à 2 facteurs à l'aide du modèle GLM du logiciel SAS (SAS Institute, 1997). Les effets de la concentration en acide phytique (0, 8,5 ou 14,5 g/kg) étaient comparés par ANOVA. Les effets relatifs des deux phytases (origine bactérienne ou fongique) étaient analysés par la méthode des contrastes non-orthogonaux. Les résultats étaient considérés comme statistiquement significatifs pour une valeur de probabilité  $P < 0,05$ .

## 2. RÉSULTATS

La consommation quotidienne d'aliment durant la période expérimentale (J24 à J28) n'était pas significativement différente entre les 7 traitements (données non reportées dans ce document). La composition en acides aminés du régime expérimental HC est donnée dans le Tableau 2. Le Tableau 3 présente les valeurs du flux d'acides aminés endogènes pour les différents traitements de l'étude.

Le flux d'acides aminés endogènes était significativement affecté par l'addition d'acide phytique. L'augmentation du taux d'acide phytique dans l'aliment, de 0 à 8,5 g/kg, avait pour conséquence une augmentation significative du flux endogène de l'azote et de la plupart des acides aminés (de  $P < 0,05$  à  $P < 0,001$  selon la variable mesurée). Les seules exceptions ( $P > 0,05$ ) concernaient le flux pour l'alanine, l'histidine et l'arginine. Et, pour la concentration d'acide phytique la plus élevée, soit 14,5 g/kg, le flux était encore augmenté, avec des valeurs significativement supérieures (de  $P < 0,01$  à  $P < 0,001$  selon la variable mesurée) à celles observées pour 0 et 8,5 g/kg d'acide phytique.

L'addition de phytase exogène réduisait significativement ( $P < 0,001$ ) le flux endogène de l'azote et de tous les acides aminés. De plus, des différences entre les deux sources de phytase

étaient observées : la réduction du flux endogène pour l'acide glutamique, la proline et l'isoleucine était significativement ( $P < 0,05$ ) plus importante avec la phytase d'origine bactérienne qu'avec la celle d'origine fongique. Une tendance ( $P < 0,06$ ) similaire était constatée pour le flux de l'azote et celui des acides aminés totaux. De plus, dans les deux cas, les flux étaient réduits de façon plus importante avec la phytase bactérienne qu'avec la celle d'origine fongique.

## 3. DISCUSSION

Les résultats de cette étude étaient en accord avec les travaux de Cowieson et al. (2004), Onyango et al. (2004) et Cowieson & Ravindran (2007), montrant un effet négatif de l'ingestion de phytate sur les sécrétions endogènes en azote et en acides aminés dans le tube digestif. La composition en acides aminés du flux basal était très similaire à celle rapportée dans de précédentes publications (Moughan et al., 1992 ; Ravindran & Hendrix, 2004), avec de fortes concentrations en acide glutamique, glycine, thréonine et acide aspartique. Cette composition reflétait la composition des sécrétions endogènes telles que la mucine, la pepsine, la trypsine et la bile (Forstner & Forstner, 1994), suggérant ainsi que l'augmentation du flux endogène suite à l'addition de phytate était liée à l'augmentation des sécrétions du tube digestif. Les différences de réponse entre les deux phytases, avec un effet bénéfique plus important pour la phytase d'origine microbienne, pourraient s'expliquer par des différences entre les caractéristiques de ces enzymes. Plusieurs études ont démontré que, en comparaison avec les phytases d'origine fongique, les phytases d'origine microbienne avaient : une affinité supérieure pour la molécule de phytate IP6, une meilleure résistance à l'attaque des protéases du tractus digestif, ainsi qu'une activité supérieure pour les faibles valeurs de pH (gésier) (Greiner et al., 1993 ; Wyss et al., 1999 ; Greiner & Farouk, 2007).

## CONCLUSION

La présente étude a montré que l'augmentation de la concentration en acide phytique dans l'aliment induisait une augmentation du flux des acides aminés endogènes dans l'iléon du poulet de chair à 28 jours. La supplémentation des régimes avec une phytase exogène permettait de réduire l'effet négatif du phytate sur le flux endogène et limiter les pertes en nutriments. Toutefois, cette réduction semble être plus importante ( $P = 0,06$ ) avec la phytase d'origine bactérienne qu'avec la phytase d'origine fongique. Ces données suggèrent qu'il existe des différences dans la capacité des phytases exogènes à lutter contre les effets antinutritionnels du phytate.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AOAC International, 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th Edition, Gaithersburg, MD.
- Cowieson A.J. et al., 2004. Brit. Poult. Sci., (45), 101-108
- Cowieson, A.J. & V. Ravindran, 2007. Br. J. Nutr., (98), 745-752.
- Forstner & Forstner, 1994. Gastrointestinal mucus. Pages 1255-1283 in Physiology of the gastrointestinal tract. L.R. Johnson, ed. Raven Press, New York, NY.
- Greiner & Farouk, 2007. Protein J., 26, 467-474.
- Greiner et al., 1993. Arch. Biochem. Biophys., 303, 107-113.
- Moughan et al., 1992. J. Food Sci. and Agric., 60, 437-442.
- Onyango et al., 2004. Poult. Sci., 83(suppl. 1), 149-150.
- Ravindran V. et al., 1995. Poult. Avian Biol. Rev., (6), 125-143.
- Ravindran V. et al., 1999. Poult. Sci., (78), 699-706.
- Ravindran V. et al., 2004a. Aust. J. Agric. Res., (55), 705-709.
- Ravindran V. et al., 2004b. Br. J. Nutr., (92), 217-223.
- Ravindran et al., 2008. Br. J. Nutr., In Press.
- SAS Institute, 1997. SAS/STAT® User's guide : Statistics, Version 6.12. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Selle P. et al., 2000. Nutr. Res. Rev., (13), 255-278.
- Selle P. et al., 2007. Anim. Feed Sci. and Technol., (135), 1-41.
- Short et al., 1996. Anim. Feed Sci. and Technol., (59), 215-221.
- Wyss et al., 1999. Appl. Environ. Microbiol., (65), 359-366.

**Tableau 1.** Composition (g/kg) des aliments expérimentaux C et HC

Ingrédient	Aliment C	Aliment HC
Caséine	90	
Hydrolysats de caséine		100
Dextrose	760	747
Huile végétale	50	50
Cellulose	35	35
Phosphate bi-calcique	24	24
Bicarbonate de sodium	20	20
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12	12
Chlorure de sodium	4	4
Dioxyde de titane TiO <sub>2</sub>		3
MgO	2	2
Prémix vitaminique	2,5	2,5
Prémix minéral	0,5	0,5
Acide phytique		8,5 ou 14,5
Phytase		0 ou 0,1

**Tableau 2.** Composition en acides aminés (g/kg, MS) de l'aliment test HC sans addition d'acide phytique

Acide Aminé	Concentration	Acide Aminé	Concentration
Protéine Brute (N x 6,25)	93,81	Isoleucine	3,51
Acide Aspartique	6,93	Leucine	12,04
Thréonine	3,87	Tyrosine	2,22
Sérine	4,97	Phénylalanine	4,97
Acide Glutamique	20,94	Histidine	3,07
Proline	10,39	Lysine	7,48
Glycine	1,60	Arginine	3,48
Alanine	2,90	Méthionine	3,36
Valine	6,14	Cystéine	0,58

**Tableau 3.** Effets du taux de phytate et de deux phytase sur le flux endogène de l'azote (N) et des acides aminés (mg/kg de MS ingérée)

Acide phytique, (g/kg)	Origine de la phytase	Azote (N)	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Cys	Met	Somme des AA
0,0 *	-	1039	463	493	391	729	263	485	213	352	244	304	160	182	175	284	210	185	60	5194
8,5	-	1438	702	755	560	1029	386	765	241	499	343	494	262	247	212	373	266	242	79	7455
	<i>E. coli</i>	1073	493	528	371	768	275	564	157	340	250	328	182	159	162	283	191	157	59	5268
	<i>A. niger</i>	1175	536	544	411	933	382	544	172	378	293	355	185	172	169	299	191	178	60	5802
14,5	-	2431	1210	1212	960	1917	449	1408	322	647	488	924	546	546	471	528	438	343	116	12525
	<i>E. coli</i>	1714	858	801	686	1245	366	782	252	484	372	672	409	425	319	373	275	203	99	8622
	<i>A. niger</i>	1913	903	862	755	1542	408	881	289	514	450	742	435	442	361	416	303	214	93	9610
Pooled SEM †		77,9	43,9	59,0	39,9	76,0	15,8	54,8	21,3	35,6	25,5	26,1	20,3	27,9	20,8	28,1	31,6	17,0	5,6	382,3
Effet des facteurs †																				
Acide phytique																				
8,5 g/kg		1229	577	609	447	910	347	624	190	406	295	393	210	192	181	319	216	192	66	6175
14,5 g/kg		2019	990	958	800	1568	407	1024	288	549	437	779	463	471	384	439	339	253	103	10252
Phytase																				
0		1935 <sup>a</sup>	956 <sup>a</sup>	984 <sup>a</sup>	760 <sup>a</sup>	1473	417 <sup>a</sup>	1086	282 <sup>a</sup>	573 <sup>a</sup>	416 <sup>a</sup>	709 <sup>a</sup>	404 <sup>a</sup>	396 <sup>a</sup>	342 <sup>a</sup>	451 <sup>a</sup>	352 <sup>a</sup>	293 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>	9990 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>		1394 <sup>b</sup>	676 <sup>b</sup>	665 <sup>b</sup>	529 <sup>b</sup>	1007	320 <sup>b</sup>	673	205 <sup>b</sup>	412 <sup>b</sup>	311 <sup>b</sup>	500 <sup>b</sup>	296 <sup>b</sup>	292 <sup>b</sup>	240 <sup>b</sup>	329 <sup>b</sup>	233 <sup>b</sup>	180 <sup>b</sup>	79 <sup>b</sup>	6945 <sup>b</sup>
<i>A. niger</i>		1544 <sup>b</sup>	720 <sup>b</sup>	703 <sup>b</sup>	583 <sup>b</sup>	1237	395 <sup>a</sup>	713	231 <sup>ab</sup>	446 <sup>b</sup>	371 <sup>a</sup>	549 <sup>b</sup>	310 <sup>b</sup>	307 <sup>b</sup>	265 <sup>b</sup>	358 <sup>b</sup>	247 <sup>b</sup>	196 <sup>b</sup>	76 <sup>b</sup>	7706 <sup>b</sup>
Probabilité, $P \leq^3$																				
Acide phytique (PA)		0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Phytase		0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,01	0,001	0,001	0,001	0,001	0,01	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
PA x phytase		0,09	NS	NS	NS	0,05	NS	0,01	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,06	NS	NS	NS	NS	0,09

\* Entre les poulets nourris avec les régimes contenant 0 et 8,5 g/kg d'acide phytique, les différences de flux pour l'azote (N) et la plupart des acides aminés étaient significatives ( $P < 0,10$  à  $0,001$ ), à l'exception de l'alanine, l'histidine et l'arginine.

† Les données concernant les traitements avec 8,5 et 14,5 g/kg d'acide phytique, avec ou sans l'addition de phytase, étaient analysées selon un schéma factoriel  $2 \times 3$ .