

**EFFETS DE L'ADDITION D'UNE 6-PHYTASE MICROBIENNE  
SUR LA CONCENTRATION EN *MYO*-INOSITOL ET SUR LE TRANSCRIPTOME  
DU MUSCLE *PECTORALIS* CHEZ LE POULET DE CHAIR.**

**Schmeisser Jérôme, Aureli Raffaella et Guggenbuhl Patrick**

*DSM NUTRITIONAL PRODUCTS FRANCE – 1, boulevard d'Alsace, BP 170 – 68305  
SAINT-LOUIS Cedex - France*

[jerome.schmeisser@dsm.com](mailto:jerome.schmeisser@dsm.com)

**RÉSUMÉ**

Un essai au sol de cinq semaines a été réalisé afin d'évaluer les effets de l'addition d'une 6-phytase microbienne sur les performances de croissance, la concentration plasmatique en *myo*-inositol, la minéralisation osseuse, la masse des filets et le transcriptome du muscle *Pectoralis major* chez le poulet de chair.

Au jour 0, 160 poulets de chair de souche PM3 ont été répartis en fonction du poids en 3 traitements répétés avec 2 cages de 20 animaux par cage. Deux régimes alimentaires ont été distribués *ad libitum* sur deux périodes d'élevage : démarrage (D : 0-22 jours) et croissance (C : 22- 36 jours). Un régime témoin positif (TP) (P total = 7,1 g/kg ; Ca = 8,0 g/kg pour la période D et P total = 6,5 g/kg ; Ca = 7,5 g/kg pour la période C) et un régime témoin négatif (TN) formulé avec une déficience modérée en phosphore par rapport au TP. Le régime TN a été distribué avec ou non l'addition de phytase à 1000 U /kg d'aliment. Le gain de poids (GP) des animaux ainsi que l'indice de consommation (IC) ont été déterminés. La concentration plasmatique en *myo*-inositol, le taux de cendres des tibias, la masse des filets et le profil d'expression des gènes du muscle ont été déterminés à J36. Chez les animaux ayant reçu la phytase, le GP, l'IC, la concentration plasmatique en *myo*-inositol et le taux de cendres ont été améliorés significativement par rapport au TN ainsi que la masse de muscle. L'étude transcriptomique a montré que plusieurs gènes impliqués dans le développement musculaire ont été surexprimés chez les poulets ayant reçu la phytase comparé au TN. Deux voies différentes semblent être affectées : la voie d'activation des facteurs de transcription MEF2 *via* la calcineurine A, et la différenciation musculaire par la voie de l'IGF, impliquant la PI3 kinase.

L'étude suggère que l'addition de cette phytase permet d'augmenter la concentration en *myo*-inositol, le produit final d'hydrolyse du phytate, et influence le développement musculaire chez le poulet de chair.

**ABSTRACT**

**Effect of a microbial 6-phytase supplementation on plasmatic *myo*-inositol and on the *Pectoralis* muscle transcriptome in broilers.**

A floor pen trial of five weeks was conducted to evaluate the effects of a 6-microbial phytase supplementation in broilers in terms of growth performance, *myo*-inositol plasma concentration, bone mineralization, breast meat weight, and *Pectoralis major* muscle transcriptome.

On day 0, 160 PM3 strain broilers were divided by weight into 3 repeated treatments with 2 cages of 20 animals per cage. Two diets were given *ad libitum* on two breeding periods: starter (S: 0-22 days) and grower (G: 22-36 days). A positive control diet (PC) (P total = 7.1 g / kg, Ca = 8.0 g / kg for the S period and total P = 6.5 g / kg, Ca = 7.5 g / kg for G period) and a negative control diet (NC) formulated with a moderate deficiency of phosphorus compared to PC. The NC diet was distributed with or without phytase supplementation at 1000 U / kg. The weight gain (WG) and the feed conversion ratio (FCR) were determined. The *myo*-inositol plasma concentration, the tibias ash, breast meat weight, and the gene expression profile of breast muscle were determined at day 36. Phytase supplementation led to a significant improvement of WG, FCR, *myo*-inositol plasma concentration, tibia ash percentage, and muscle weight compared to NC. A transcriptomic study showed that several genes involved in muscle development were overexpressed in chickens fed phytase compared to NC. Two different pathways seemed to be affected: the way of transcription factors MEF2 activation *via* calcineurin A, and muscle differentiation through IGF involving PI3 kinase.

This study suggests that the addition of this phytase increases the concentration of *myo*-inositol, the final product of phytate hydrolysis, and influences muscle development in broilers.

## INTRODUCTION

Le phytate est considéré comme un composé antinutritionnel en raison de sa capacité à se lier à des cations, des protéines et de l'amidon conduisant à une faible biodisponibilité du P chez les volailles (Olukosi *et al.*, 2012). En effet, celles-ci ne possèdent pas le matériel enzymatique nécessaire à l'hydrolyse des phytates et à la libération du P (Denbow *et al.*, 1995). Cependant, l'addition de phytases microbiennes dans les régimes alimentaires pour volailles permet de valoriser les ressources naturelles 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 et Nitrayova *et al.*, 2006). Des hypothèses sur les effets de composés résultant de l'hydrolyse des phytates (comme le *myo*-inositol) sur les performances ont été suggérées (Cowieson *et al.*, 2014). De plus, des effets de la phytase sur le transcriptome du poulet ont été décrits par Józefiak *et al.* (2010). Ils ont montré l'effet de la phytase sur l'expression du gène de l'Insulin Growth Factor (IGF) dans le foie alors que Olukosi *et al.* (2013) ont démontré un effet sur l'expression du transporteur de phosphate sodium-dépendant de type II-b dans le mucus intestinal. Le but de la présente étude était d'évaluer les effets physiologiques de l'addition de phytase sur la concentration plasmastique du *myo*-inositol et sur le profil transcriptomique du muscle *Pectoralis major*.

## 1. MATERIELS ET METHODES

### 1.1 Animaux

L'étude a été réalisée au Centre de Recherche en Nutrition Animale (CRNA) de DSM Nutritional Products France sur des poulets de chair de souche PM3. Les animaux mâles âgés d'un jour ont été répartis en fonction de leur poids en 2 groupes de 20 animaux par traitement. Chaque groupe a été logé dans une cage dont le sol était recouvert de sciure de bois. L'essai a duré cinq semaines et s'est déroulé dans un environnement contrôlé. La température de la salle d'expérimentation était adaptée aux besoins spécifiques des animaux (de 30°C à 20°C, avec perte de 2°C tous les deux jours.). Les animaux ont été pesés par groupe le 1<sup>er</sup> et le 36<sup>ème</sup> jour afin de pouvoir calculer le gain de poids (GP). La quantité d'aliment ingéré par cage a été mesurée et l'indice de consommation (IC) a été calculé.

Au jour 36, des échantillons de sang ont été prélevés sur 16 animaux choisis au hasard dans chaque groupe afin de déterminer la concentration plasmatique en *myo*-inositol. Les animaux ont ensuite été sacrifiés et le tibia droit ainsi que le muscle *Pectoralis major* des mêmes animaux ont été prélevés. Les tibias ont été congelés à -20 °C jusqu'à l'analyse. Sur chaque muscle, un échantillon de 100 à 150mg de tissu a été

prélevé et conservés -20°C dans du RNA Later® (Qiagen, Courtabœuf, France) jusqu'à extraction des ARN.

### 1.2. Régimes et traitements

Les animaux ont été nourris avec deux régimes alimentaires distribués *ad libitum* sur deux périodes d'élevage : démarrage (D : 0-22 jours) et croissance (C : 22- 36 jours). Le régime témoin négatif (TN) a été formulé avec une carence modérée en P (P total = 5.1 g/kg ; Av.P (available P) = 2.01 g/kg ; Ca = 6.0 g/kg pour la période D et P total = 5.2 g/kg ; Av.P = 2.14 g/kg Ca = 6.2 g/kg pour la période C) et distribué avec ou sans ajout de phytase RONOZYME® HiPhos à 1000 U /kg d'aliment. Ce régime de base a également été supplémenté avec 1.5 g de phosphore non phytique (nPP) provenant du phosphore bicalcique (DCP) pour former un traitement témoin positif (TP) dont les caractéristiques étaient les suivantes : P total = 7,1 g/kg ; Ca = 8,0 g/kg pour la période D et P total = 6,5 g/kg ; Ca = 7,5 g/kg pour la période C.

### 1.3. Analyses biochimiques

Les analyses des nutriments dans l'aliment ont été réalisées en suivant les méthodes standards classiques de détermination (VDLUF 1976). La concentration en *myo*-inositol a été déterminée par spectrométrie de masse selon la méthode décrite par Leung *et al.* (2011). Les tibias « démoellés » ont été utilisés pour la détermination du pourcentage de cendres des os après dégraissage dans l'éthanol et dans l'éther, séchage à l'étuve à 105 °C et incinération à 550 °C dans un four à moufle. Les ARN ont été extraits du muscle *Pectoralis* de chaque animal par la méthode Phenol-Chloroforme (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) suivi d'une purification par des colonnes RNeasy® (Qiagen, Courtabœuf, France).

L'analyse par microarray a été réalisée grâce au kit WT PLUS reagent d'Affymetrix (Affymetrix UK Ltd., High Wycombe, UK) et des puces Affymetrix CHIGENE-1.0-ST selon les instructions du fournisseur, en poolant 4 échantillons du même traitement par puce (16 échantillons = 4 puces par traitement).

La transcription inverse a été réalisée sur tous les échantillons avec le kit iScript™ Reverse Transcription Supermix pour RT-qPCR. Les réactions de qPCR ont été réalisées avec le kit LightCycler® 480 SYBR Green I Master I et sur un thermocycleur Eppendorf Realplex® 4S avec comme gène de référence G6PDH (Fan *et al.*, 2012) (F5'CGGGAACCAAATGCACTTCGT3' et R5'CGCTGCCGTAGAGGTATGGGA3') et comme gènes cibles :

PI3KCA (F5'AGCGTGTGCCCTTTGTCTTA3' et R5'CCTGAGCCAAGCATCATGGA3'),

PI3KR1 (F5'ACTTCGAGACACTGCCGATG3' et R5'GCCGTATTTCCCATCTCGGT3'),  
 PLCB1 (F5'CCCTGGCATGTTTGAGGCTA3' et R5'GCTGGCAGTGTCAAAGGTTG3'),  
 MEF2C (F5'TGCTGTTCCACCACCAAAC3' et R5'CACGCCAGGAGACATGCTAT3'),  
 MEF2A (F5'GTTGTGAGAGCCCTGATGCT3' et R5'TGGAACCGTAACCGACATGG3'), et  
 PPP3CB (F5'CGAGGATTCTCTCCGCAACA3' et R5'CCAGAAGTTGGACGTGGTCA3').

Le programme de PCR était de 95°C pendant 5 minutes, suivi de 40 cycles de dénaturation à 95°C et hybridation/élongation à 60°C.

#### 1.4. Analyse statistique

Toutes les données collectées (exceptées pour l'analyse d'expression génique) ont été analysées par analyse de variance à un facteur avec le logiciel Stat Box Pro version 7.1.9 (Grimmer soft 1995). Pour les données brutes de microarray, une ANOVA à un facteur a été réalisée avec le logiciel Partek® Genomics Suite™. Les valeurs seuil de taux d'expression des gènes sont définis à  $\leq -1,3$  ou  $\geq 1,3$ , avec  $p < 0,05$ . Les voies métaboliques impliquées ont été considérées par test de correction multiple (FDR : False Discovery Rate) à  $p < 0,1$ . Pour la qPCR, la méthode comparative du  $\Delta\Delta Ct$  (Livak et Schmittgen, 2001) a été utilisée pour déterminer le taux d'expression des gènes cibles avec l'erreur standard de la moyenne (SEM : Standard Error of the Mean) et le test de Student appliqué aux valeurs de  $\Delta Ct$  ( $\Delta Ct = Ct \text{ gènes cible} - Ct \text{ gène de référence}$ ).

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

L'analyse des aliments a révélé que les animaux ont été nourris avec des régimes croissance dont les teneurs en P total étaient en accord avec celles souhaitées et que la différence de teneur en P entre le témoin positif et le témoin négatif était de 1,28 g. L'activité phytasique mesurée dans le traitement supplémenté en phytase correspondait à l'activité attendue avec respectivement 1020 et 1134 U/kg pour la période de démarrage et de croissance (Tableau 1). L'addition de nPP dans un aliment carencé en P a significativement amélioré le GP et l'IC des animaux, indiquant clairement une déficience phosphorée de l'aliment de base. L'addition de phytase a permis d'améliorer significativement le GP et l'IC des animaux par rapport à TN. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Yan *et al.* (2000). L'addition de phytase a permis de corriger la diminution de croissance mais aussi d'améliorer la minéralisation osseuse (Tableau 1).

La comparaison des groupes TP et Phy1000 (TN + phytase) par rapport au groupe TN a montré qu'un

total de respectivement 300 et 625 gènes ont été modulés.

L'analyse fonctionnelle indique que les voies métaboliques qui semblent être impactées pour le TP ne sont pas les mêmes que pour les animaux ayant reçu la phytase.

Quelques voies métaboliques ont été identifiées comme étant significativement impactées chez les animaux ayant reçu la phytase. Dans le réseau du contrôle de la myogenèse squelettique, deux voies d'activation ont été identifiées. La première voie montre une surexpression des facteurs de transcription Myocyte Enhancer factor-2 (changement significatif du taux d'expression avec Phy1000 comparé au TN, pour MEF2A : 1,44; MEF2C : 1,43), de la calmoduline (CALM1 : 1,50) et de la calcineurine A (PPP3CB : 1,67). Certaines de ces modulations ont été confirmées par RTqPCR (Tableau 3). De plus, le taux d'expression de la phospholipase C bêta (PLCB1) mesuré par cette méthode a été significativement augmenté.

Irvine *et al.*, (2001) ont montré que PLCB1 était impliqué dans la libération intracellulaire du Ca *via* le récepteur de l'Inositol triphosphate (IP3) dans le réticulum sarcoplasmique. La surexpression de la calcineurine dépendante du calcium pourrait expliquer l'augmentation du poids du filet observée puisqu'elle a été identifiée comme étant impliquée dans la myogenèse (Friday *et al.*, 2000) aussi bien que les interactions entre calcineurine et MEF2 (Li *et al.*, 2013).

La seconde voie d'activation identifiée est celle de l'IGF/PI3K, avec une surexpression de la phosphatidyl-inositide-3-phosphate kinase (PI3KR1 : 2,02), la 3-phosphoinositide dependent protein kinase 1 (PDK : 1,29), et la protéine ribosomale S6 kinase (p70S6K : 1,30). (Tableau 3). Pour valider ces résultats, 2 gènes surexprimés ont été sélectionnés pour confirmation par RTqPCR : PI3KR1, PI3KCA.

Ces enzymes seraient impliquées dans le développement et la différenciation musculaire (Wullschleger *et al.*, 2006) par l'intermédiaire de la liaison de l'insuline ou de l'IGF à son récepteur. Par ailleurs, différentes études (Croze et Soulage, 2007) ont montré l'effet insulino-mimétique du *myo*-inositol (Cowieson *et al.*, 2014 et Józefiak *et al.*, 2010), dont la teneur plasmatique était augmentée de manière significative (Tableau 1) chez les animaux supplémentés en phytase par rapport au groupe TN.

L'effet du *myo*-inositol sur les performances zootechniques en période de croissance a aussi été décrit par Cowieson *et al.* (2013). Les résultats obtenus pourraient suggérer un effet du *myo*-inositol sur les récepteurs à l'IGF, sensibles à l'insuline, et induire des changements dans l'expression des gènes liés au développement musculaire.

## CONCLUSION

L'inclusion de phytase dans une alimentation déficiente en P améliore les performances zootechniques des poulets. De plus, dans les mêmes groupes d'animaux, la minéralisation osseuse, le *myo*-inositol plasmatique, et le poids du filet ont été augmentés. L'analyse globale du transcriptome musculaire révèle par ailleurs plusieurs modulations d'expression de gènes susceptibles d'être impliqués dans le contrôle du développement musculaire, qui ont pu être confirmées par RTqPCR. L'étude des

fonctions des gènes modulés en présence de phytase comparé au témoin positif (TP) pourra venir compléter la compréhension de l'effet de la phytase. Comparé au témoin négatif (TN), l'identification de potentiels marqueurs moléculaires dans le muscle *Pectoralis major*, répondant à un effet spécifique de la supplémentation en phytase a été proposée. Ainsi, cette étude a pu fournir des éléments complémentaires permettant une meilleure compréhension de l'effet de la supplémentation en phytase chez le poulet de chair.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Aureli R., Umar Faruk M., Cechova I., Pedersen P.B., Elvig-Joergensen S.G., Fru F. and Broz J., 2011. *Int. J. Poult. Sci.* 10(2), 160-168.
2. Cowieson A.J., Aureli R., Guggenbuhl P., Fru-Nji F., 2014. *Anim. Prod. Sci.*
3. Cowieson A.J., Ptak A., Mackowiak P., Sassek M., Pruszyńska-Oszmalek E., Zyla K., Swiatkiewicz S., Kaczmarek S., Jozefiak D., 2013. *Biochimie*, (95), 1811-1827.
4. Denbow D.M., Ravindran V., Kornegay E.T., Yi Z., Hulet R.M., 1995. *Poultry Sci.*, (74), 1831-1842.
5. Fan W.-Q., Wang H.-N., Zhang Y., Zhang A.-Y., 2012. *J. Animal Veterinary Adv.*, (11), 3064-3067.
6. Friday B.B., Horsley V., Pavlath G.K., 2000. *J. Cell Biol.*, (149), 657-666.
7. Irvine R.F., Schell M.J., 2001. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.*, (2), 327-338.
8. Jozefiak D., Ptak A., Kaczmarek S., Mackowiak P., Sassek M., Slominski B.A., 2010. *Poult. Sci.* (89), 1939-1946.
9. Leung K.Y., Mills K., Burren K.A., Copp A.J., Greene N.D., 2011. *J. Chromatogr. B*, (879), 2759-2763.
10. Li J., Vargas M.A., Kapiloff M.S., Dodge-Kafka K.L., 2013. *Exp. Cell Res.*, (319), 447-454.
11. Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001. *Method. Methods*, (25), 402-408.
12. Nitrayova S., Patras P., Sommer A., Heger J., 2006. *Arch. Anim. Nutr.*, (60), 131-140.
13. Olukosi O.A., 2012. *Biokemistri*, 24(2), 58-63.
14. Olukosi O.A., Kong C., Fru-Nji F., Ajuwon K.M., Adeola O., 2013. *Poult. Sci.*, (92), 2101-2108.
15. Wullschleger S., Loewith R., Hall M.N., 2006. *Cell*, (124), 471-484.
16. Yan F., Kersey J. H., Fritts C. A., Waldroup P. W., Stilborn H. L., Crum R. C. Jr., Rice D. W., Raboy V., 2000. *Poult. Sci.* (79), 1282-1289.

**Tableau 1** : Effets de l'addition de phytase sur les performances de croissance (J1-36), sur la concentration en *myo*-inositol, la minéralisation osseuse et le poids du filet

	Dose U/kg	P g/kg	Performance		Plasma	Tibia	Muscle
			GP	IC	inositol	cen­dres	filet
			g/animaux	g aliment / g gain	mg/L	% MS	g
TP	0	6.5	2705 <sup>a</sup>	1.349 <sup>b</sup>	33.0 <sup>b</sup>	57.5 <sup>a</sup>	267.3 <sup>a</sup>
TN	0	5.22	2248 <sup>b</sup>	1.476 <sup>a</sup>	36.5 <sup>b</sup>	55.0 <sup>b</sup>	220.2 <sup>b</sup>
Phy1000	1134	5.22	2801 <sup>a</sup>	1.282 <sup>c</sup>	56.8 <sup>a</sup>	57.9 <sup>a</sup>	271.5 <sup>a</sup>
<i>P</i>			0.001	<0.001	<0.001	0.003	0.002
SEM			8.142	0.148	0.224	0.104	0.430

**Tableau 2.** Analyse fonctionnelle des données de microarray

Traitement	Voies métaboliques	FDR
TP vs TN	Remodelage du cytosquelette_TGF, WNT et Remodelage du cytosquelette	0.034
	Processus neurophysiologique_Netrin-1 dans la régulation du guidage des axones	0.034
Phy1000 vs TN	Réponse immune_Fonction de MEF2 dans les lymphocytes T	0.002
	Développement_Rôle de HDAC et de la kinase dépendante de calcium/calmoduline (CaMK) dans le contrôle de la myogenèse squelettique	0.002
	Développement_Action non génomique de l'acide rétinolique dans la différenciation cellulaire	0.002
	Développement_Voie de signalisation de Notch	0.004

Voies métaboliques impactées chez les animaux comparés au témoin négatif, avec valeur statistique du FDR (False discovery rate).

**Tableau 3.** Taux d'expression en microarray et PCR quantitative.

Gène	Traitement	Taux d'expression Microarray (n=4)	Taux d'expression qPCR (n=16)	SEM (qPCR)
PI3KR1	TP vs TN	1.32	1.51	-0.65 / +0.46
	Phy1000 vs TN	2.02***	3.04**	-0.80 / +0.63
PI3KCA	TP vs TN	1.01	1.69	-0.66 / +0.47
	Phy1000 vs TN	1.37	2.84**	-0.93 / +0.70
PPP3CB	TP vs TN	1.18	1.88	-0.73 / +0.53
	Phy1000 vs TN	1.67**	2.67**	-0.59 / +0.48
MEF2A	TP vs TN	1.08	1.42	-0.21 / +0.19
	Phy1000 vs TN	1.44**	1.68**	-0.30 / +0.26
MEF2C	TP vs TN	1.17	1.73	-0.50 / +0.39
	Phy1000 vs TN	1.43**	2.14**	-0.50 / +0.41
PLCB1	TP vs TN	1.02	1.48	-0.50 / +0.37
	Phy1000 vs TN	1.43	2.66**	-0.79 / +0.61

L'ANOVA à un facteur du logiciel Partek<sup>®</sup> Genomics Suite<sup>™</sup> est appliquée pour les données de microarray et le test de Student (valeurs de  $\Delta$ Ct comparées à chaque contrôle) est appliqué pour les données de qPCR.

\*\* : p<0.05, \*\*\* : p<0.01.

Microarray : n=4 puces (= 4 pools de 4 échantillons = 16 échantillons par traitement)

qPCR : n=16 échantillons

L'erreur standard de la moyenne (SEM) est calculée pour les valeurs de taux d'expression obtenues par qPCR.