



Étude de l'impact des enzymes exogènes sur la digestibilité des acides aminés chez le porc et le poulet : approche par méta-analyse

Thèse

Maroua Zouaoui

Doctorat en sciences animales
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

© Maroua Zouaoui, 2018

Étude de l'impact des enzymes exogènes sur la digestibilité des acides aminés chez le porc et le poulet : approche par méta-analyse

Thèse

Maroua Zouaoui

Sous la direction de :

Frédéric Guay, directeur de recherche
Marie-Pierre Létourneau-Montminy, codirectrice de recherche

Résumé

*« Les problèmes ne viennent pas tant de ce que l'on ignore, mais de ce que l'on sait. »
Artemus Ward*

Les phytates et les polysaccharides non amylacés (PNA) sont des facteurs antinutritionnels abondants dans l'alimentation des porcs et des poulets. Même si les phytates constituent un réservoir de phosphore (P), ce P est peu disponible pour le porc et le poulet à cause de la faible présence de phytases endogènes chez ces animaux. Pour cette raison la phytase microbienne a été incorporée dans les régimes alimentaires, ce qui a permis de mettre en évidence l'impact négatif des phytates sur la digestibilité des acides aminés (AA). De même, les PNA sont indigestibles et résistants à la digestion chez le porc et le poulet. De plus, ils limitent la digestibilité des constituants intracellulaires des graines diminuant ainsi la digestibilité des AA et de l'énergie d'où l'utilité du recours à des carbohydrases. La xylanase, une carbohydrase, pourrait améliorer la digestibilité des PNA menant possiblement à l'augmentation de la digestibilité des AA et du contenu en énergie métabolisable apparente (EMA). À cet égard, il est d'une grande importance de connaître les mécanismes et de quantifier l'action de ces deux enzymes dans l'élimination des facteurs antinutritionnels et l'amélioration de la digestibilité des AA, ainsi que de l'EMA. Une approche par méta-analyse a permis d'établir des modèles de prédiction de la digestibilité des AA sous l'effet de l'ajout de la phytase chez le porc et le poulet à partir de la teneur de la ration en AA alimentaires, la phytase incorporée, en plus de la fibre alimentaire NDF (Neutral Detergent Fibre) dans le cas du porc et du P phytique (PP) dans le cas du poulet. Des modèles de prédiction ont aussi été établis pour prédire la digestibilité des AA chez le poulet à partir de la xylanase incorporée et la fibre alimentaire (NDF et PNA). La xylanase incorporée, la fibre alimentaire (NDF et PNA) et l'énergie brute (EB) se sont révélés comme les meilleurs prédicteurs du contenu en EMA chez le poulet. Les modèles actuels établis dans cette étude permettent de quantifier l'effet de la phytase sur la digestibilité des AA chez le porc et le poulet ainsi que l'effet de la xylanase sur la digestibilité des AA et du contenu en EMA chez le poulet assurant l'utilisation précise de ces enzymes au moment de la formulation des régimes alimentaires.

Abstract

Phytates and non-starch polysaccharides (NSP) are abundant antinutritional factors in pig and broiler diets. Although phytates constitute a phosphorus (P) reservoir, this P is not available because monogastric animals produce a small amount of endogenous phytase. Microbial phytases have been incorporated into diets and has revealed the negative effect of phytates on the digestibility of amino acids (AA). In addition to phytates, NSPs are also indigestible and resistant to the digestion process in monogastric animals. The NSPs encapsulate also nutrients, which decrease AA and energy digestibility. It is important to know the mechanisms of action of phytase and xylanase in the degradation of antinutritional factors and improving the digestibility of AA, as well as apparent metabolizable energy content (AME). A meta-analysis approach allowed to establish models for predicting the digestibility of AA from dietary AA, phytase and NDF (Neutral Detergent Fiber) concentrations in pigs, and from dietary AA, phytase and phytic phosphorus (PP) concentrations in broilers. A predictive model of AA digestibility in broilers has also been established from xylanase supplementation and dietary NDF/NSP concentrations. Finally, xylanase activity, gross dietary energy (GE) and NDF/NSP concentrations were the best predictors of AME. The current models allow quantifying the effect of phytase on AA in pigs and broilers and the effect of xylanase on AA and AME in broilers, which is important to use these enzymes accurately in diet formulation.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations et sigles	xi
Remerciements	xiii
Avant-propos	xv
Chapitre 1 Introduction et revue de la littérature	1
1.1. Introduction générale.....	2
1.2. Acides aminés en alimentation des porcs et des poulets	4
1.2.1. Définition et caractéristiques des acides aminés dans l'alimentation des porcs et des poulets	4
1.2.2. Besoin en acides aminés.....	5
1.2.3. Digestibilité des acides aminés.....	7
1.3. Techniques de collecte des digesta et d'estimation des pertes endogènes basales d'acides aminés chez le porc et le poulet.....	9
1.3.1. Les techniques de collecte des digesta chez le porc	9
1.3.2. Les techniques de collecte des digesta chez le poulet	11
1.3.3. Les techniques d'estimation des pertes endogènes d'acides aminés chez le porc et le poulet	11
1.4. Calculs associés à l'estimation de la digestibilité apparente, standardisée ou vraie	17
1.4.1. Digestibilité iléale apparente	17
1.4.2. Digestibilité iléale standardisée	17
1.4.3. Digestibilité iléale vraie.....	19
1.5. Facteurs antinutritionnels influençant la digestibilité iléale des acides aminés chez le porc et le poulet.....	20
1.5.1. Le phytate	21
1.5.2. La fibre	25
1.6. Relation entre l'ajout des enzymes exogènes aux régimes alimentaires et la digestibilité des acides aminés chez le porc et le poulet.....	27
1.6.1. Définition et description de la phytase	27
1.6.2. Effets de la phytase sur la digestibilité du phosphore	33

1.6.3.	Phytase et acides aminés chez le porc et le poulet	37
1.6.4.	Xylanase et digestibilité des acides aminés chez le porc et le poulet.....	50
1.7.	Analyse des données par méta-analyse	57
1.7.1.	Définition et concepts.....	57
1.7.2.	Étapes d'une méta-analyse	59
1.7.3.	Limites et contraintes de la méta-analyse.....	65
1.7.4.	Conclusions et objectifs.....	65
Bibliographie		69
Chapitre 2 Prédiction de l'effet de la phytase sur la digestibilité iléale apparente des acides aminés chez le porc : Méta-Analyse.....		79
2.1.	Résumé.....	81
2.2.	Abstract	82
2.3.	Introduction	83
2.4.	Materials and methods	84
2.5.	Results	89
2.6.	Discussion	94
2.7.	Conclusion.....	102
2.8.	References	103
Chapitre 3 Prédiction de l'effet de la phytase sur la digestibilité iléale apparente des acides aminés chez le poulet : Méta-Analyse.....		108
3.1.	Résumé.....	110
3.2.	Abstract	111
3.3.	Introduction	112
3.4.	Materials and methods	113
3.5.	Results	117
3.6.	Discussion	129
3.7.	Conclusion.....	134
3.8.	References	135
Chapitre 4 Prédiction de l'effet de la xylanase sur la digestibilité iléale apparente des acides aminés et sur l'énergie métabolisable apparente chez le poulet : Méta-Analyse		137
4.1.	Résumé.....	139
4.2.	Abstract	140
4.3.	Introduction	141
4.4.	Materials and methods	142
4.5.	Results	145

4.6.	Discussion	150
4.7.	Conclusion.....	155
4.8.	Références	156
Chapitre 5	Discussion générale et conclusion.....	159
5.1.	Originalité de la thèse.....	160
5.2.	Choix du modèle statistique	161
5.3.	Apport de la thèse à la compréhension des mécanismes d'action de la phytase chez le porc et le poulet	163
5.4.	Apport de la thèse à la prédiction de la digestibilité des acides aminés chez le porc et le poulet sous l'effet de l'ajout de la phytase.....	165
5.4.1.	Prédiction de la digestibilité des acides aminés chez le porc	165
5.4.2.	Prédiction de la digestibilité des acides aminés chez le poulet	167
5.4.3.	Comparaison de l'effet de la phytase entre le porc et le poulet	168
5.5.	Apport de la thèse à la prédiction de la digestibilité des acides aminés et de l'énergie métabolisable apparente chez le poulet sous l'effet de l'ajout de la xylanase.	171
5.6.	Conclusion et perspective.....	172
5.7.	Références	174

Liste des tableaux

Tableau 1-1 Effets de divers facteurs sur la quantité d'AA endogène iléale et sur le flux de l'azote chez le porc.	12
Tableau 1-2 Moyenne pondérée (et intervalle) des concentrations de P total, de PP, et de la proportion de PP présente dans les principales matières premières utilisées dans l'alimentation des poulets. ..	24
Tableau 1-3 Sites de localisation du phosphore phytique (PP) dans le grain.....	25
Tableau 1-4 Exemples et caractéristiques de 3 - et 6-phytases utilisées en nutrition animale.	30
Tableau 1-5 Activité phytasique moyenne des espèces végétales.....	31
Tableau 1-6 Effet de l'augmentation de la concentration de la phytase sur la disponibilité et l'excrétion du phosphore (P).	35
Table 2-1 Descriptive statistics in the databases.	86
Table 2-2 Prediction of apparent ileal digestibility of indispensable amino acid (%) of pig feed as a function of microbial phytase activity, indispensable amino acid concentration and neutral detergent fibre concentration.	90
Table 2-3 Prediction of apparent ileal digestible indispensable amino acid content (g/kg) in pig feed containing microbial phytase, as a function of indispensable amino acid concentration and neutral detergent fibre content.....	93
Table 2-4 Effect of microbial phytase on apparent ileal digestibility of indispensable amino acids (%) at the dose of 500 FTU/kg.....	96
Table 3-1 Descriptive statistics extracted from the databases.....	115
Table 3-2 Prediction of apparent ileal digestibility of broiler feed based on essential and non-essential amino acids (%) as a function of microbial phytase activity, amino acid concentration and phytic acid content.	119
Table 3-3 Apparent essential amino acid digestibility of observed in experimental diets and predicted by the tested models.....	121
Table 3-4 Apparent non-essential amino acid digestibility observed in experimental diets and predicted by the tested models.	122
Table 3-5 Prediction of apparent ileal digestible content of broiler feed based on essential and non-essential amino acids as function of microbial phytase activity, amino acid concentration and phytic acid content.	125
Table 3-6 Apparent digestible essential amino acid observed in experimental diets and predicted by the tested models.	127
Table 3-7 Apparent digestible non-essential amino acid observed in experimental diets and predicted by the tested models.....	128
Table 4-1 Descriptive statistics in the database.....	144
Table 4-2 Prediction of apparent metabolizable energy (MJ kg ⁻¹ DM) and apparent ileal digestibility of amino acids (%) as a function of xylanase activity and neutral detergent fiber content.....	147
Table 4-3 Prediction of apparent metabolizable energy (MJ kg ⁻¹ DM) and apparent ileal digestibility of amino acids (%) as a function of xylanase activity and non-starch polysaccharides content.	148
Table 4-4 Apparent metabolizable energy and apparent amino acid digestibility observed in experimental diets and predicted by the tested models.	149
Tableau 5-1 Effet de l'incorporation de 500 FTU de phytase en gramme d'acides aminés digestibles.	171

Liste des figures

Figure 1-1 Mesure de la disponibilité d'un acide aminé limitant (tiré de Blum et al., 1989).	6
Figure 1-2 Extrapolation de la méthionine endogène dans les digesta iléaux à partir de la relation linéaire entre la méthionine apparente digestible et la quantité totale de la méthionine alimentaire incorporée (tiré de Fan et al., 1995).	15
Figure 1-3 Relation entre la digestibilité iléale apparente ainsi que la digestibilité iléale standardisée et l'apport en AA alimentaire (tiré de Lemme et al., 2004).	18
Figure 1-4 Répartition du flux iléal d'AA entre l'indigestible réel, la perte endogène basale et spécifique (tiré de Stein et al., 2007).	19
Figure 1-5 Structure de l'AP, Myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis dihydrogen phosphate (IP6) proposée par Anderson en 1914 (tiré de Sebastian et al., 1998).	21
Figure 1-6 Formation de chélate entre l'acide phytique et les minéraux (tiré de Sebastian et al., 1998).	23
Figure 1-7 Fractions et composantes de la fibre alimentaire (tiré de Souffrant et al., 2001).	26
Figure 1-8 Mode d'action des phytases sur les phytates alimentaires (tiré de Kemme et al., 1997).	28
Figure 1-9 Classification des phytases en histidines phytases et en phytases métallo-dépendantes (tiré de Parra, 2001).	29
Figure 1-10 Influence de la phytase endogène du blé sur les coefficients de digestibilité du P chez les poulets (n=8) (tiré de Barrier-Guillot et al., 1996).	35
Figure 1-11 Relation entre la dose de phytase et la libération du P à 500 FTU/kg (tiré de Bedford et al., 2015).	36
Figure 1-12 Actions de la 3- phytase (EC 3.1.3.8) et de la 6-phytase (EC 3. 1.3.26) sur le myo-inositol hexakisphosphate (IP6) (tiré de Yu et al., 2012).	37
Figure 1-13 Inhibition de l'activité de la pepsine sous l'action de l'acide phytique (tiré de Yu et al., 2012).	39
Figure 1-14 Effet de doses élevées d'acide phytique sur les pertes endogènes des AA dans la partie terminale de l'iléon chez les poulets (tiré de Cowieson et Bedford, 2009).	40
Figure 1-15 Effet de l'ingestion de l'acide phytique et de la phytase sur l'excrétion de l'acide sialique (tiré de Cowieson et al., 2009).	41
Figure 1-16 Mécanismes d'action de l'acide phytique sur la digestibilité iléale et les pertes endogènes des nutriments dont les AA (tiré de Woyengo et Nyachoti, 2013).	42
Figure 1-17 Interactions du phytate avec la protéine selon le pH dans l'appareil digestif des animaux (adapté de Plumstead, 2015).	44
Figure 1-18 Structure du xylane végétale et des sites d'attaque des xylanases microbiennes (tiré de Beg et al., 2001).	51
Figure 1-19 Effet de la viscosité de l'intestin grêle proximal en centipoise, cp, sur le gain de poids corporel et l'efficacité de la conversion alimentaire chez les poulets (tiré de Bedford et al., 1992).	52
Figure 1-20 Effet de la concentration du seigle et de la xylanase sur la viscosité de l'intestin grêle proximal chez les poulets (tiré de Bedford et Classen, 1992).	54
Figure 1-21 Évolution du nombre de méta-analyses au cours des années (tiré de Sauvart et al., 2005).	59
Figure 1-22 Principales étapes d'une méta-analyse (tiré de Sauvart et al., 2005).	60
Figure 1-23 Représentation schématisée des objectifs et défis du projet de recherche proposé.	68
Figure 2-1 Regression analysis of the relationship between observed apparent ileal digestibility of Lysine (Lys) and apparent ileal digestibility predicted by the model. Dashed line represents $Y = X$. Black = tested model.	91
Figure 2-2 Relationship between phytase inclusion and apparent ileal amino acid digestibility coefficients of Lys (Lysine) (full line) and Thr (Threonine) (dashed line).	98

Figure 3-1 Regression analysis of the relationship between observed apparent ileal digestibility based on lysine (Lys) and apparent ileal digestibility predicted by the model. Dashed line represents $Y = X$. Black = tested model.	123
Figure 3-2 Effect of microbial phytase (500 FTU/kg) on the apparent ileal digestibility of broiler chicken feed.	131
Figure 4-1 Regression analysis of the relationship between observed apparent metabolisable energy and apparent metabolisable energy predicted by the model. Dashed line represents $Y=X$. Black=tested model.	150
Figure 4-2 Effect of xylanase (2000XU/ Kg DM) on apparent metabolizable energy (AME) and amino acid digestibility in broilers.	154
Figure 5-1 Interactions possibles entre le phytate et la protéine dans le tube digestif du porc et du poulet (adapté de Creveu-Gabriel, 1999 ; Plumstead, 2015).	164
Figure 5-2 Effet de la phytase sur la DIA de la lysine à 100 et 150 g de NDF / Kg d'aliment.	166
Figure 5-3 Distribution de la fibre NDF et du Ca alimentaire intra-publication dans la base de données du porc.	167
Figure 5-4 Effet de la phytase sur la DIA de la thréonine à 2 et à 4 g de P Phytique / Kg d'aliment.	168
Figure 5-5 Effet de l'incorporation de 500 FTU de phytase/kg d'aliment sur la digestibilité iléale apparente des AA chez le porc et le poulet.	170
Figure 5-6 Effet de la phytase sur le flux digestible de la thréonine chez le porc et le poulet.	170

Liste des abréviations et sigles

AA	Acide aminé
AAC	Agriculture et Agroalimentaire Canada
AAE	AA Essentiels
AA NE	AA Non Essentiels
ADF	Acid Detergent Fibre
AIA	Acid Insoluble Ash
AIR	Anastomose Iléo-Rectale
Ala	Alanine
AME	Apparent Metabolizable Energy
AP	Acide Phytique
Arg	Arginine
Asp	Acide aspartique
ATTD	Apparent Total Tract Digestibility
Ca	Calcium
CDPQ	Centre de Développement du Porc du Québec
Co	Cobalt
CP	Crude Protein
Cr ₂ O ₃	Oxyde de Chrome
C-T	Canule en T
Cu	Cuivre
Cys	Cystéine
DIA	Digestibilité Iléale Apparente
DIS	Digestibilité Iléale Standardisée
DIV	Digestibilité Iléale Vraie
DM	Dry Matter
EB	Énergie Brute
EMA	Énergie Métabolisable Apparente
FB	Fibre Brute
Fe	Fer
FTU	Phytase Units
GE	Gross Energy
Glu	Acide glutamique
Gln	Glutamine
Gly	Glycine
HA	Technique à l'Homoarginine
HEC	Hydrolysat Enzymatique de Caséine
His	Histidine
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
Ile	Isoleucine
K	Potassium
Leu	Leucine
Lys	Lysine

Met	Méthionine
Mg	Magnésium
Mn	Manganèse
MSI	Matière sèche ingérée
NDF	Neutral Detergent Fibre
Ni	Nickel
NRC	National Research Council
NSP	Non-Starch Polysaccharides
P	Phosphore
<i>P</i>	Probabilité
pH	potentiel Hydrogène
Phe	Phénylalanine
PNA	Polysaccharides Non Amylacées
PP	Phosphore Phytique
PRESS	Predicted Residual Sum of Squares
Pro	Proline
PVTC	Post-Valve T-Caecum
RMSE	Root Mean Square Error
RMSEP	Root Mean Square Error of Prediction
Ser	Sérine
TA	Technique d'Abattage
Thr	Thréonine
TiO ₂	Dioxyde de Titane
Tyr	Tyrosine
Va	Valine
Zn	Zinc

Remerciements

Cette thèse a été réalisée à la Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation «Département des sciences animales» de l'Université Laval.

Je tiens tout d'abord à remercier Michel Lefrançois, professeur à l'Université Laval, Xavière Rousseau d'AB Vista et Dolores Batonon d'Adisseo d'avoir accepté d'évaluer cette thèse.

J'aimerais remercier mon directeur de thèse Dr. Frédéric Guay, professeur à l'Université Laval pour son encadrement et ses conseils instructifs et enrichissants qu'il a pu me donner tout au long de mon doctorat. Qu'il soit aussi remercié pour sa gentillesse, sa disponibilité permanente et pour les nombreux encouragements qu'il m'a prodigués tout au long de ce projet.

Un grand merci à ma codirectrice Dr. Marie-Pierre Létourneau-Montminy professeur à l'Université Laval pour ses conseils, sa disponibilité permanente, et sa volonté à transmettre et partager son savoir.

Merci à ma meilleure amie, ma chère sœur Hanen Mannai que la vie m'a donnée, tu étais la première personne qui m'a accueilli au Canada. Nous avons passé de bons moments ensemble. C'est vrai qu'il y avait des moments difficiles, mais nous étions et nous serons ensemble pour les affronter. Restes forte ma chère et saches que je serai toujours là pour toi.

Merci à Farouk Messad pour son aide et ses conseils au moment de mon arrivée au département des sciences animales. Tes conseils étaient trop efficaces pour moi durant toute la période de la thèse.

Un immense merci à tous mes amis et en particulier à Amal Rouissi. Même si on ne se voit pas toujours, tu étais là pour me soutenir et m'écouter. Merci Amal.

Un grand merci à Hector Salgado Romero qui a su m'apporter aide et soutien aux moments propices. Merci Hector pour tes encouragements et tes conseils.

À mes chères amies d'enfance Sabrina et Wafa pour tous les moments de bonheur que nous avons partagés ensemble. Malgré la distance qui nous sépare, vous ne m'avez jamais oubliée et on se rappelle quotidiennement même avec 6h de décalage entre les deux pays. Merci Sabrina, t'es la seule qui puisse me faire rire de n'importe quelle situation juste pour me rendre bien et la seule personne à qui je pense quand je me sens mal, car je peux parler de tout et de rien. Je te souhaite une bonne chance dans tes démarches et je t'attends avec impatience au Canada.

Je dédie ce travail à l'âme de mon père Saâd et à ma mère Faïza pour leur soutien, leur compréhension, leur patience et leur aide. Ils m'ont toujours encouragée dans la poursuite de mes études. Quitter la Tunisie pour faire ma maîtrise en France puis ma thèse au Canada n'était pas une décision facile, mais avec l'amour et le soutien de ma mère je suis arrivée ici. Maman, je ne trouve pas les mots pour te remercier, j'ai de la chance d'avoir une mère comme toi, t'es si généreuse et si parfaite à mes yeux. Merci pour ma belle enfance, pour ton amour et surtout ta patience. Sans toi, je ne suis rien. Je t'aime maman.

Ton âme papa ne m'a jamais quittée et rien ne pourra te remplacer. Je me souviendrai toujours de tes mots. Tu étais et tu resteras mon exemple à jamais. Tu m'as transmis de vraies valeurs. C'est grâce à ta confiance en moi que j'avance dans la vie.

J'adresse enfin une pensée spéciale à mon grand bonheur, mes deux frères Wassim et Aymen. Tous les mots du monde ne seraient pas suffisants pour vous remercier pour votre soutien dans mes choix et votre attention sans faille. Vos encouragements et amours inconditionnels m'accompagnent depuis toujours. Je n'oublierai jamais tous les efforts que vous avez fait pour moi et les préparations que nous avons faites ensemble depuis ma première expérience d'étude en France, mais aussi vous avez tout fait pour me faire changer d'avis et pour que j'accepte l'idée de partir une autre fois seule au Canada. J'étais loin de vous, mais vous étiez dans mon cœur. Je ne saurais vous dire combien je vous aime, c'est grâce à vous que j'en suis arrivée là.

Avant-propos

La thèse qui suit comporte cinq chapitres avec insertion d'articles. Le premier chapitre comporte l'introduction et la revue bibliographique. Il nous précise le contexte du projet à partir d'un tour d'horizon sur les acides aminés, les différentes techniques de collecte des digesta et d'estimation des pertes endogènes. Ce chapitre présente également la digestibilité iléale chez le porc et le poulet, le phytate et la fibre comme facteurs majeurs parmi ceux influençant la digestibilité iléale des acides aminés, la phytase et ses effets sur la digestibilité du phosphore et des acides aminés, la xylanase et ses effets seuls et combinés au phytase sur la digestibilité des acides aminés. Une présentation de la méta-analyse y est enfin décrite.

Le deuxième chapitre est un article scientifique qui a été publié dans la revue *Animal Feed Science and Technology*. Il s'agit de la prédiction des coefficients de digestibilité iléale et des contenus digestibles des acides aminés chez le porc suite à l'incorporation de la phytase comme enzyme exogène dans les régimes alimentaires. Cette étude a été réalisée en collaboration avec Frédéric Guay et Marie-Pierre Létourneau-Montminy professeurs à l'Université Laval.

Le troisième chapitre est un article scientifique qui sera soumis dans la revue *Animal*. Dans cette partie, l'effet de la phytase sur les coefficients de digestibilité iléale et des contenus digestibles des acides aminés a été prédit chez le poulet. Cette étude a été réalisée en collaboration avec Frédéric Guay et Marie-Pierre Létourneau-Montminy professeurs à l'Université Laval.

Le quatrième chapitre consistait à étudier l'effet de la xylanase comme enzyme exogène sur la digestibilité iléale des acides aminés et sur l'énergie métabolisable apparente chez le poulet. Aussi, cette étude a été réalisée en collaboration avec Frédéric Guay et Marie-Pierre Létourneau-Montminy professeurs à l'Université Laval. Le quatrième chapitre sera soumis dans la revue *Poultry Science*. Le cinquième et dernier chapitre représente une discussion générale où les principaux éléments de la thèse ont été discutés pour finir avec une conclusion renfermant des critiques et des perspectives de cette thèse.

Chapitre 1 Introduction et revue de la littérature

*«Quand nous voyons la véritable cause d'un problème, nous en voyons aussi la solution»
Guy Finley*

1.1. Introduction générale

Les enzymes sécrétées par le tube digestif et le pancréas sont indispensables pour la digestion des aliments chez tous les animaux. Ces enzymes sont donc principalement produites par l'animal ou peuvent provenir de microbes qui sont naturellement présents dans le tractus digestif des animaux. La présence de protéines indigestibles et d'éléments antinutritionnels dans les régimes alimentaires du porc et du poulet peut diminuer l'efficacité des enzymes endogènes ; ce qui explique que 15% à 25% des aliments ingérés par le porc et le poulet ne sont pas digérés et ainsi les nutriments associés ne sont pas absorbés (Bedford et Partridge, 2001). De plus, certaines enzymes spécifiques capables d'hydrolyser des liaisons chimiques particulières sont absentes ou présentes à de trop faibles concentrations chez ces animaux ce qui peut limiter la digestibilité de composés spécifiques ou encore maintenir leurs actions antinutritionnelles sur d'autres nutriments. L'incorporation dans les régimes de ces enzymes (apport exogène) est devenue une voie de choix afin d'améliorer la digestibilité des aliments ou encore éliminer les facteurs antinutritionnels. L'augmentation de l'accessibilité des nutriments contenus dans les aliments et la réduction des effets antinutritionnels de composés alimentaires sont les principales raisons du développement de l'industrie des enzymes exogènes dont l'usage est courant depuis 20 ans en alimentation du porc et du poulet (Bedford, 2000). Parmi les enzymes exogènes utilisées dans l'alimentation animale se trouve la phytase microbienne qui est l'enzyme la plus utilisée depuis les années 90 (Bedford et Partridge, 2001). En raison de sa capacité à dégrader les phytates, les effets de cette enzyme sont bien connus, principalement en ce qui touche l'amélioration de la digestibilité du phosphore (P), du calcium (Ca), de l'énergie et des acides aminés (AA). Cette enzyme a été développée au départ pour améliorer la digestibilité du P végétal et réduire les rejets de P (Chesson, 1993). L'effet positif de la phytase exogène sur la digestibilité du P chez le poulet a été mis en évidence pour la première fois par Nelson et al. (1968) et confirmé au fil du temps par plusieurs études (Selle et Ravindran, 2007 ; Selle et Ravindran, 2008). En plus de la libération du P lié aux phytates, la phytase microbienne a attiré l'attention sur les propriétés antinutritionnelles des phytates et en particulier leurs interactions avec les protéines alimentaires. Plusieurs recherches ont confirmé la présence d'interactions entre les protéines et les phytates et leurs effets négatifs sur la

digestibilité des protéines et l'absorption des AA (Ravindran et al., 1999a ; Liao et al., 2005; Kies et al., 2006b). Outre la phytase, les carbohydrases, dont la xylanase, ont bénéficié d'un intérêt important compte tenu de leur rôle dans l'hydrolyse des polysaccharides non amylacés (PNA). En effet, elles pourraient faciliter l'absorption des nutriments et améliorer l'efficacité d'utilisation des protéines alimentaires par leur action hydrolytique sur les PNA (Bedford et al., 1998 ; Hew et al., 1998 ; Cowieson et Bedford, 2009). Les substances anti-nutritionnelles présentes dans les aliments des porcs et des poulets à savoir les phytates et les PNA peuvent diminuer la digestibilité des aliments ; ce qui nécessite une supplémentation coûteuse ou un apport additionnel de nutriments entraînant des coûts importants pour l'industrie. En effet, le poste budgétaire associé à l'alimentation constitue le point le plus coûteux dans l'élevage des monogastriques. De ce fait, les enzymes exogènes utilisées comme additifs alimentaires peuvent constituer une alternative intéressante et un outil important dans la recherche d'un coût minimal de production dans l'industrie porcine et avicole (Bedford et Partridge, 2001). Plusieurs études ont été réalisées afin d'examiner l'effet de ces enzymes sur la digestibilité iléale apparente (DIA) des AA (Ravindran et al., 1999a ; Selle et al., 2003 ; Debicki-Garnier et al., 2014). Les résultats de ces études sont variables et constituent une controverse scientifique (Nitrayová et al., 2006). Par conséquent, il devient plus qu'essentiel de faire le point sur ce sujet sur une base plus systématique qu'une simple revue des travaux antérieurs. La méta-analyse est une solution efficace pour ré-analyser les résultats de plusieurs expériences et étudier les facteurs de variations qui peuvent affecter différents paramètres, dont l'impact d'enzymes sur la digestibilité des AA. Dans ce sens, le premier objectif de cette thèse était donc d'étudier les relations entre l'ajout de phytase dans l'alimentation des porcs et des poulets et l'amélioration de la digestibilité des AA, ce qui nous permettra de développer des modèles de prédiction de l'effet de cette enzyme sur ces paramètres de digestibilité. Dans un second temps, nous étudîâmes également, par une approche méta-analytique, les relations entre la supplémentation en xylanase et la digestibilité des AA ainsi que sur le contenu en énergie métabolisable apparente (EMA) des aliments pour poulet.

1.2. Acides aminés en alimentation des porcs et des poulets

La formulation d'un régime alimentaire se fait en 2 étapes clés : 1) une juste évaluation de la valeur nutritionnelle des matières premières et 2) une juste évaluation des besoins, en AA, entre autres. L'aliment ingéré devrait couvrir le besoin en AA nécessaires aux animaux. Ce sont les AA digestibles qui devraient être pris en considération plutôt que les AA totaux présents dans un aliment (Low, 1982 ; Sauer et Ozimek, 1986). Une estimation des AA digestibles est donc nécessaire pour une évaluation précise de l'apport alimentaire en AA et donc une couverture adéquate du besoin en AA.

1.2.1. Définition et caractéristiques des acides aminés dans l'alimentation des porcs et des poulets

Les AA ont divers rôles essentiels : la croissance, le développement, la reproduction et la santé de tous les organismes vivants (Wu et al., 2013) et sont les principaux constituants des protéines. Ils sont divisés en deux grandes catégories chez les animaux comme chez les humains : les AA essentiels (AAE) et les AA non essentiels (AANE) (Blum et al., 1989; Quentin et al., 2004; Gloaguen et al., 2013). Les AAE sont ceux dont les squelettes de carbone ne sont pas synthétisés de *novo* par les cellules animales où ceux qui sont insuffisamment synthétisés de *novo* par l'organisme animal. Ainsi, ils doivent être fournis dans l'alimentation pour répondre aux exigences des animaux (Blum et al., 1989). À l'inverse, les AANE peuvent être synthétisés de *novo* à partir d'AAE ou d'AANE. Une autre catégorie d'AA peut être distinguée, soit les AA qui peuvent être synthétisés seulement à partir d'AAE et qui sont appelés les AA semi-indispensables comme la cystéine formée à partir de la méthionine et la tyrosine synthétisée à partir de la phénylalanine (Blum et al., 1989). Cependant, cette classification des AA dépend principalement de l'espèce animale et des conditions physiologiques des animaux. Chez le poulet, les AAE sont : la méthionine, la lysine, la thréonine, le tryptophane, la leucine, l'isoleucine, la valine, la serine, l'arginine, l'histidine et la phénylalanine (Baker et Han, 1994). Chez le porc, les AAE sont : la méthionine, la lysine,

la thréonine, le tryptophane, la leucine, l'isoleucine, la valine, l'arginine, l'histidine et la phénylalanine (Mertz et al., 1952). La présence simultanée des AAE et AANE est indispensable pour assurer la synthèse de toutes les protéines nécessaires à l'entretien (renouvellement des protéines corporelles), à la croissance et la production (œuf ou lait). En réalité, l'ensemble des 20 AA sont essentiels pour la synthèse des protéines et la limitation d'un seul réduira la croissance ou la production de l'animal (Blum et al., 1989).

1.2.2. Besoin en acides aminés

Les AA sont à la fois les constituants des protéines et leurs produits d'hydrolyse (Awad et al., 2016). Ainsi, les besoins en protéines réfèrent aux besoins en AA contenus dans les protéines alimentaires. Le besoin en AA est défini comme étant l'apport d'AA qui doit satisfaire plusieurs fonctions physiologiques et éviter tous les problèmes de santé causés par une carence en AA. C'est un ensemble de recommandations qui doivent être adaptées aux objectifs attendus tels que les critères de production mis en jeu et la qualité des produits (Gloaguen et al., 2013). Selon Van Milgen et Dourmad (2015), l'estimation des besoins en AA dépend quantitativement du potentiel phénotypique à déposer les protéines corporelles ou à synthétiser les protéines du lait ou des œufs. Le besoin en AA dépend donc de l'utilisation de ces derniers par les différents tissus. Ainsi, les protéines alimentaires sont digérées et les AA absorbés pour être enfin transportés vers le tissu cible (Van Milgen et Dourmad, 2015). En outre, chez le porc et le poulet l'estimation des besoins en AA passe par un certain nombre de critères à savoir : le gain de poids corporel, l'efficacité alimentaire, le gain en protéine, la composition de la carcasse, l'ingestion des aliments, l'énergie métabolisable, l'efficacité énergétique et la concentration plasmatique en AA (Sibbald, 1987). Un apport insuffisant en AA peut causer une réduction de la croissance des animaux en raison d'un dépôt protéique réduit dans des tissus afin de maintenir les tissus les plus vitaux fonctionnels (Conde-Aguilera et al., 2016a ; Conde-Aguilera et al., 2016b). Le besoin en AA n'est pas constant, mais varie d'une période à une autre selon diverses situations. Pour cette raison, il est plus correct de parler d'un ensemble de recommandations au lieu d'un besoin global en AA (Quentin et al., 2004). Afin de combler

le besoin en AA, les aliments doivent apporter des AA qui seront disponibles en quantité suffisante pour le métabolisme de l'animal (entretien, production ou croissance). La disponibilité d'un AA alimentaire peut être définie comme étant le pourcentage d'un AA alimentaire utilisé pour le dépôt ou l'entretien lorsque cet AA constitue le seul facteur limitant du régime pour assurer une croissance ou une production maximale (Batterham, 1992). Cependant, il n'y a pas de méthodes directes pour mesurer cette disponibilité des AA (Stein et al., 2007) dont la connaissance constitue la clé de la formulation des rations alimentaires (NRC, 1994). Il existe plusieurs méthodes pour mesurer la disponibilité des AA regroupées en deux principales catégories : le premier comprend les méthodes chimiques où la détermination de la disponibilité des AA se fait directement dans la matière première sans recours à l'animal : c'est la méthode Carpenter. Comme définie par Guillaume (1999), le principe de cette méthode est basé sur la réaction de Sanger dont le 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène (FDNB) intervient comme réactif du groupement ϵ -NH₂ de la lysine. Un complexe stable, le dinitro-phényl-lysine (DNP-lysine) est ainsi formé. L'hydrolyse et la chromatographie permettent de séparer la lysine et le DNP-lysine. Ainsi la lysine disponible est représentée par le pourcentage de FDNB par rapport à la lysine totale. Dans le deuxième groupe, la disponibilité des AA est mesurée par un pourcentage de transformation ou d'utilisation *in vitro* / *in vivo* de la protéine ou des AA (Blum et al., 1989) (Figure 1-1).

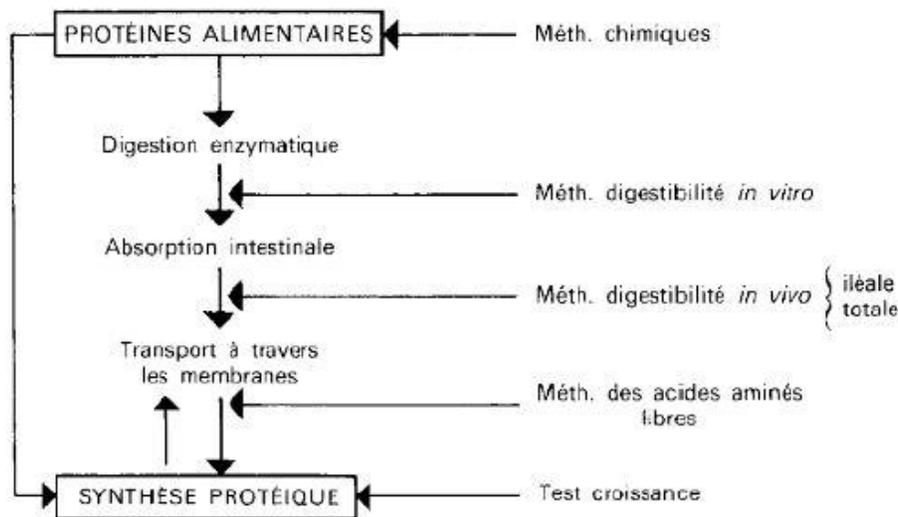


Figure 1-1 Mesure de la disponibilité d'un acide aminé limitant (tiré de Blum et al., 1989).

Dans le deuxième groupe on trouve plusieurs méthodes dont :

- Les méthodes dites «de croissance».
- Les méthodes basées sur le dosage des AA libres.
- Les méthodes de digestibilité : *in vitro*, où il s'agit de déterminer le pourcentage des AA libérés par hydrolyse enzymatique ou *in vivo*, où il s'agit de déterminer le pourcentage des AA libérés par digestion et absorbés par la muqueuse intestinale (Blum et al., 1989).

Quand on parle de la disponibilité, on désigne les AA qui peuvent être des facteurs limitants dans le régime alimentaire des animaux. La disponibilité peut être mesurée chez le jeune comme chez l'adulte en production ou bien à l'entretien (Blum et al., 1989).

1.2.3. Digestibilité des acides aminés

Pour garantir un meilleur apport nutritionnel, il faut donc savoir bien formuler les régimes alimentaires en passant par une meilleure expression des besoins en AA et du contenu en AA disponibles. Comme noté précédemment, il existe différentes façons d'estimer la disponibilité des AA alimentaires. Au cours des dernières années, l'estimation de la digestibilité iléale des AA s'est imposée comme une méthode adéquate pour déterminer la valeur nutritionnelle des AA d'un aliment (Stein et al., 2007). La digestibilité est définie comme étant la quantité d'aliments ingérée qui est non excrétée dans les fèces. La disponibilité d'un AA est souvent considérée comme synonyme de sa digestibilité. Cependant, les deux termes sont différents et les valeurs de digestibilité ne sont pas équivalentes à celles de la disponibilité des AA (Low, 1982 ; Williams, 1995 ; Lemme et al., 2004). La disponibilité d'un AA est la proportion qui sera utilisée quand il constitue un facteur limitant dans le régime, ce qui correspond à la fonction de deux processus : la digestion et le métabolisme de cet AA (Johnson, 1992). En fait, un AA disponible est un AA qui se présente sous une forme appropriée pour la digestion, l'absorption et l'utilisation par l'organisme animal (Low, 1982 ; Lemme et al., 2004). Cette disponibilité ne peut être déterminée que par la mesure de la croissance ou la production des animaux, mais cette méthode en plus d'être chère, nécessite beaucoup de temps pour estimer

la disponibilité d'un seul AA par expérience (Lemme et al., 2004). Ainsi, le recours à la mesure de la digestibilité pour déterminer la disponibilité des AA s'est imposé et est actuellement la méthode reconnue. Toutefois, plusieurs méthodes d'estimation de la digestibilité des AA sont présentes dans la pratique y compris des méthodes chimiques et microbiologiques (Sauer et Ozimek, 1986). Néanmoins, il reste toujours préférable d'adopter une méthode de mesure de digestibilité uniforme ce qui facilite les échanges d'informations concernant la digestibilité des AA dans les ingrédients alimentaires des porcs et des poulets (Stein et al., 2007). Deux manières peuvent être distinguées dans la mesure de la digestibilité des AA : *in vitro* et *in vivo*. Les méthodes *in vitro* sont plus rapides, moins coûteuses et aussi moins reproductibles. Bien que ces dernières présentent un certain nombre d'avantages par rapport aux méthodes *in vivo*, elles restent moins intéressantes dans la pratique tenant compte du fait qu'elles sont limitées et ne peuvent pas bien reproduire les conditions complexes et dynamiques existantes dans le tube digestif des animaux dans les conditions où les AA d'origine endogène et exogène sont mélangés (Blum et al., 1989).

Afin d'estimer la disponibilité des AA, les mesures de digestibilité *in vivo* ont été utilisées (Sauer et Ozimek, 1986). Il s'agit de déterminer le pourcentage des AA absorbés dans la totalité du tube digestif ou bien au niveau iléal pour éviter les interactions avec la microflore du gros intestin. La digestibilité pourra donc être mesurée à partir des excréments des animaux : on parle alors de digestibilité fécale, ou bien au niveau de l'iléon pour la digestibilité iléale. La collecte de la matière fécale semble être une technique facile pour mesurer la digestibilité des AA, néanmoins cette technique possède l'inconvénient d'être moins précise en raison des AA fécaux qui sont en réalité un mélange d'AA alimentaires non digérés, des sécrétions endogènes et des protéines microbiennes (Low, 1982). Les AA alimentaires non digérés ne représentent qu'un petit pourcentage de l'ordre de 10% des AA totaux collectés dans la matière fécale des porcs (Low, 1978, cité par Low, 1982). De plus, la plupart des AA serait fermentée en amine et en ammoniac dans le gros intestin (Michel, 1966, cité par Low, 1982). En effet, la microflore du gros intestin métabolise une partie des AA non digérés afin de prélever les nutriments nécessaires pour son propre développement (Amipig, 2000). C'est pourquoi il est recommandé de mesurer la digestibilité des AA à l'iléon (Low, 1982 ; Amipig, 2000). Cette évaluation de la digestibilité iléale des AA donnerait une valeur relativement exacte de la disponibilité des

AA pour le métabolisme. Toutefois, l'évaluation de la digestibilité iléale peut ou non tenir compte des pertes endogènes basales et spécifiques. Ces pertes représentent la portion des AA à la fin de l'iléon qui sont d'origine endogène et donc viennent surestimer le flux d'AA et sous-estimer la digestibilité des AA alimentaires (Lemme et al., 2004 ; Stein et al., 2007). Lorsque l'on ne tient pas compte des pertes endogènes, on parle alors de digestibilité iléale apparente (DIA) alors que si l'on considère les pertes endogènes, on parle alors de la digestibilité standardisée (DIS) ou vraie (DIV).

1.3. Techniques de collecte des digesta et d'estimation des pertes endogènes basales d'acides aminés chez le porc et le poulet

1.3.1. Les techniques de collecte des digesta chez le porc

Pour déterminer la DIA, DIS ou DIV, il faut accéder aux digesta dans la partie terminale de l'iléon. Parmi les méthodes utilisées chez le porc, on retrouve l'abattage des animaux intacts ce qui permet une seule mesure par animal ou bien la mise en place d'une canule permettant des mesures répétées dans le même animal pendant une période bien déterminée (Low, 1982; Nyachoti et al., 1997).

Les techniques de canulation

Les procédures de canulation peuvent être classées en trois catégories : les simples canules en T, les canules ré-entrantes et les canules post-valve-T-caecum (Nyachoti et al., 1997). Sauer et De Lange (1992) ont rapporté que les simples canules en T sont des canules en forme de T qui sont placées dans l'iléon distal à environ 5 à 10 cm en avant de la valve iléo-caecale sans section de l'intestin grêle. Cette canule permet de maintenir un état physiologique normal pour le porc puisqu'elle implique une simple chirurgie non traumatisante comparée aux canules ré-entrantes. Par contre, la canule en T repose sur l'incorporation de marqueurs alimentaires

indigestibles engendrant un problème en ce qui concerne l'obtention d'un échantillon représentatif (Nyachoti et al., 1997).

Les canules ré-entrantes ont été suggérées pour la première fois par Cunningham et al. (1962). Cette canule implique la section complète de l'iléon terminal ce qui perturbe son fonctionnement normal pouvant provoquer un risque de blocage des digesta. Ce risque de blocage augmente avec l'augmentation des apports alimentaires, des teneurs en fibres alimentaires et de la viscosité des digesta (Nyachoti et al., 1997).

Les canules PVTC (post-valve T-caecum) ont été suggérées pour la première fois par Van Leeuwen et al. (1988) (cité par Nyachoti et al., 1997). Il s'agit d'enlever le caecum et de laisser que la zone entourant le sphincter iléo-caecale pour mettre la canule en T. Elle permet une collection quantitative des digesta. L'avantage de ce type de canule est sa capacité à déterminer la digestibilité iléale dans des régimes grossiers et à des niveaux élevés de fibres (Nyachoti et al., 1997). La canule PVTC préserve la valvule iléo-caecale, elle cause seulement un petit inconfort et elle est peu traumatisante pour les porcs avec des effets négatifs mineurs touchant les fonctions physiologiques (Van Leeuwen et al., 1988, cité par Nyachoti et al., 1997).

L'anastomose iléo-rectale

Cette technique a été suggérée par Fuller et Livingstone (1982) afin d'éviter les problématiques rencontrées avec les canules. Elle consiste en une suture de l'iléon terminal sur le rectum. Cette méthode permet une collecte quantitative des digesta sans recours à l'emploi d'un marqueur (Stein et al., 2007). L'avantage de l'anastomose iléo-rectale est la facilité d'entretenir les porcs dont l'alimentation peut être de toutes les textures (Sauer et De Lange, 1992). En revanche, comme l'intestin grêle va subir des changements afin de compenser le rôle du colon manquant, ceci cause des modifications dans la composition des AA du chyme et des digestibilités comparées aux résultats obtenus avec les autres méthodes (Fuller et Cadenhead, 1991). De plus, cette méthode est inappropriée pour le bien-être animal vu que les animaux souffrent à cause de l'effusion continue des digesta (Nyachoti et al., 1997).

1.3.2. Les techniques de collecte des digesta chez le poulet

Chez le poulet, la collecte des digesta se réalise soit par l'intermédiaire des canules intestinales soit suite à une euthanasie. L'avantage principal des canules est la possibilité de l'utilisation des animaux dans plus d'un seul test. En revanche, l'obtention de quantités suffisantes de digesta est un peu complexe et nécessite une bonne compétence en chirurgie. De plus, les canules ne sont utilisées que chez des poulets adultes (Lemme et al., 2004). Pour l'euthanasie, les animaux sont tués et l'intestin est extériorisé doucement pour atteindre l'iléon terminal qui a été défini comme étant la partie de l'intestin grêle qui s'étend du diverticule vitellin (connu avant sous le nom du diverticule de Meckel jusqu'à quelques cm de la jonction iléo-caecale) (Lemme et al., 2004). Les digesta sont récupérés de l'iléon terminal par rinçage avec l'eau distillée. La collecte et le regroupement de quantités suffisantes de digesta exigent l'utilisation d'un nombre considérable de poulets, car un minimum de quatre répétitions par ingrédient est nécessaire pour l'analyse (Lemme et al., 2004).

1.3.3. Les techniques d'estimation des pertes endogènes d'acides aminés chez le porc et le poulet

Selon Nyachoti et al. (1997), les pertes ainsi que les sécrétions endogènes sont influencées par un certain nombre d'éléments dont on peut citer les suivants : le poids corporel, la qualité et la quantité de la protéine alimentaire, la teneur en fibre alimentaire, la matière sèche ingérée et la présence de substances anti-nutritives dans le régime alimentaire. Le tableau suivant illustre l'effet de ces éléments sur la quantité d'AA endogène iléale ainsi que sur le flux d'azote chez le porc.

Tableau 1-1 Effets de divers facteurs sur la quantité d'AA endogène iléale et sur le flux de l'azote chez le porc.

Facteur	AA	N	Unités	Poids (kg)	Canules ^z	Méthodes ^y	Références
MSI (kg J ⁻¹)							
0,9	13,44	2,77	g j ⁻¹	50	C-T	HEC	Butts et al. (1993)
2,17	30,52	5,9					
0,8	14,31	3,13	g j ⁻¹	49	C-T	PP	Furuya et Kaji (1992)
1,2	14,3	3,34					
1,16	13,68	3,01					
Fibre (g kg ⁻¹)							
Cellulose							
30	5,62	1,36	g kg ⁻¹ MSI	64	AIR	PP	Leterme et al. (1992)
120	5,79	1,48					
Cellulose							
60	4,52	1,14	g kg ⁻¹ MSI	22	AIR	PP	Green et al. (1987)
90	6,08	1,58					
Pectine							
0	15,26	3,17	g kg ⁻¹ MSI	60	C-T	PP	De Lange et al. (1989)
40	18,8	3,84					
Inhibiteurs de trypsine							
9,5	-	3,54	g kg ⁻¹ MSI	36	C-T	HA	Marty et al. (1994)
14,9	-	5,82					
0,21	-	1,55	g j ⁻¹	13	PVTC	15N	Schulze (1994)
2,49	-	2,61					
5,77	-	3,68					
PB (+/-) ^u							
-	6,93	-	g kg ⁻¹ MSI	15	TA	HEC	Butts et al. (1993)
+	13,55	-					
Source de PB							
Lait écrémé	-	0,79	g j ⁻¹	8	PVTC	15N	Makkink et Heinz (1991)
Tourteau de soja	-	1,42					

MSI= Matière sèche ingérée. **z** Technique utilisée pour recueillir le digesta iléal : C-T = Canule en T ; AIR = Anastomose Iléo-Rectale ; PVTC = Post-Valve T-Caecum ; TA= Technique d'Abattage. **y** Méthode utilisée pour estimer les pertes endogènes : HEC = Hydrolysate Enzymatique de Caséine ; PP= Alimentation Protéoprive ; HA = Technique à l'Homoarginine ; 15N = 15N- dilution isotopique. **u** Avec (+) ou sans (-) protéines dans l'alimentation. adapté de Nyachoti et al. 1997

1.3.3.1. Pertes endogènes basales d'acides aminés

Les pertes endogènes sont classées en deux catégories : les pertes endogènes basales et les pertes endogènes spécifiques (Lemme et al., 2004). Les méthodes classiques utilisées pour déterminer les pertes endogènes basales comprennent : l'utilisation de régimes alimentaires sans protéines (alimentation protéoprive), l'utilisation de régimes alimentaires avec une digestibilité élevée des protéines (la digestibilité de la protéine alimentaire est égale à 100%) comme la caséine et le gluten de blé, et les méthodes de régression mathématique (Nyachoti et al., 1997 ; Lemme et al., 2004).

Ces méthodes ne sont représentatives que des pertes endogènes basales qui sont indépendantes de la composition de la matière première. Les pertes endogènes spécifiques ne sont pas mesurables par ces méthodes classiques, mais par d'autres techniques comme la dilution isotopique et les techniques d'homoarginine (Lemme et al., 2004).

Alimentation protéoprive

Quand les animaux sont nourris avec des régimes sans protéines, les AA retrouvés dans les digesta iléaux sont supposés être d'origine endogène. L'inconvénient principal de cette méthode se résume dans la modification du métabolisme de l'animal à cause de l'absence de protéines alimentaires (équilibre azoté négatif) générant ainsi une physiologie anormale pour l'animal (Low, 1980). Darragh et al. (1990) ont résumé les inconvénients de cette pratique dans la perturbation du métabolisme protéique engendrant à la fois, la réduction des sécrétions des composés azotés dans la lumière intestinale et la diminution de l'efficacité de la réabsorption. De plus, cette méthode a été critiquée, car il n'y aurait pas de stimulation de la sécrétion des enzymes protéolytiques (Ravindran et Bryden, 1999). Cette méthode aboutit à une surestimation des quantités de proline et de glycine endogènes dans les digesta iléaux mais elle sous-estime la protéine endogène totale (De Lange et al., 1989).

Utilisation d'un régime alimentaire à forte digestibilité des protéines

Dans cette technique, on suppose que les protéines ingérées par les animaux sont digestibles à 100%, le flux d'AA à l'iléon n'est donc composé que de pertes endogènes (Lemme et al., 2004). Cependant, une relation dose-réponse a été démontrée par Cremers et al., 2001 (cité par Lemme et al., 2004). Ces derniers résultats laissent penser que soit les protéines alimentaires ne sont pas digestibles à 100%, soit que les pertes endogènes basales d'AA dépendent de la source de protéines ou bien que ces protéines génèrent des pertes spécifiques (Lemme et al., 2004).

Méthodes de régression mathématiques

Cette méthode a été suggérée par Fan et al. (1995) comme étant meilleure que l'utilisation d'une alimentation protéoprive. Les porcs sont nourris avec des régimes alimentaires contenant des taux croissants de protéines. La récupération de l'azote et des AA endogènes dans la partie terminale de l'iléon est ainsi liée à l'ingestion de l'azote et des AA. En fait, l'augmentation des excréments des AA endogènes provenant soit des aliments ingérés ou des protéines endogènes non digérées est supposée être directement proportionnelle à l'augmentation des apports d'où l'établissement d'une relation linéaire entre les deux (Nyachoti et al., 1997). Il est alors possible d'estimer la quantité d'azote et d'AA à la fin de l'iléon à un niveau nul de protéine ingérée grâce à une extrapolation mathématique (Nyachoti et al., 1997). Toutefois, cette méthode ne donne pas de résultats différents comparés à ceux trouvés suite à l'incorporation d'une alimentation protéoprive (Furuya et Kaji, 1989). Cette méthode suppose que les quantités d'AA endogènes ne sont pas variables et que l'augmentation des excréments des AA est totalement attribuée à l'augmentation des protéines alimentaires indigestibles.

Dans la figure 1-2 suivante, Fan et al. (1995) ont illustré le principe de la régression linéaire pour la méthionine où l'ordonnée à l'origine représente une estimation de la quantité de méthionine d'origine endogène. Mathématiquement parlant, les apports alimentaires de l'AA dans le système digestif sont désignés par un signe (+) tandis que ses pertes endogènes sont désignées par un signe (-).

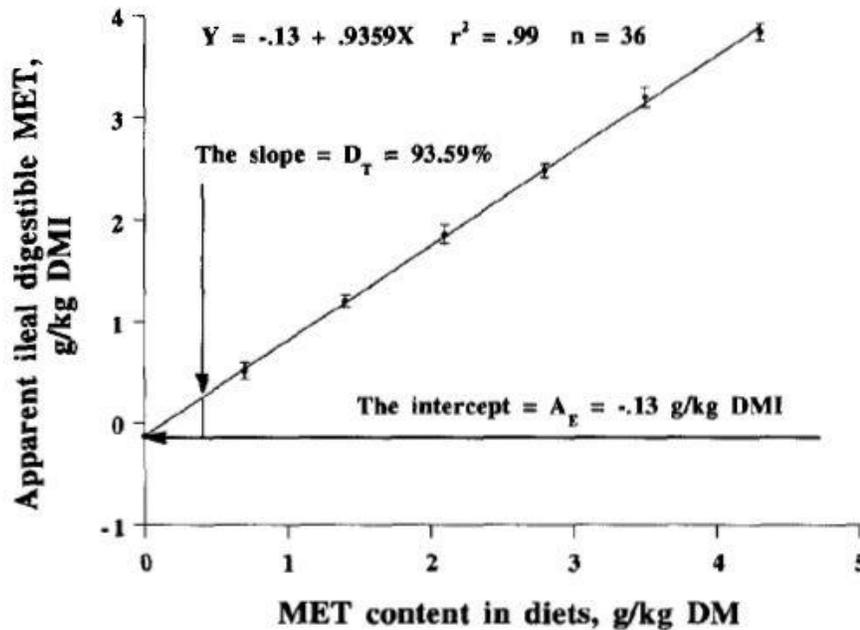


Figure 1-2 Extrapolation de la méthionine endogène dans les digesta iléaux à partir de la relation linéaire entre la méthionine apparente digestible et la quantité totale de la méthionine alimentaire incorporée (tiré de Fan et al., 1995).

1.3.3.2. Pertes endogènes totales d'acides aminés

La technique de dilution isotopique

C'est une technique qui a été utilisée durant les dernières décennies dans le but de mesurer les pertes endogènes spécifiques en AA. Elle repose sur l'utilisation soit des isotopes stables d'azote (^{15}N) ou radioactifs (^{14}C , ^{35}S , ^{75}Se). La technique de dilution isotopique (^{15}N) de Souffrant et al. (1982) (cité par Ravindran et Bryden, 1999) permet de différencier dans le digesta, les protéines d'origine endogènes et les protéines d'origine alimentaire qui ne sont pas digérées. Le marquage consiste à une perfusion intraveineuse d'AA marquée dans le sang. Cet AA doit être capable de circuler dans la circulation sanguine des animaux afin qu'il soit

incorporé dans toutes les protéines de l'organisme animal, dont celles des sécrétions endogènes. La dilution de ^{15}N mesurée dans les digesta par rapport à la quantité initiale incorporée estime la quantité d'azote d'origine endogène (Nyachoti et al., 1997).

La technique à l'homoarginine

Cette technique permet également la détermination des sécrétions endogènes spécifiques des AA. Cette méthode a été proposée par Hagemester et Erbersdobler (1985) et elle utilise l'homoarginine comme marqueur (cité par Ravindran et Bryden, 1999). Elle consiste à traiter chimiquement la protéine alimentaire testée afin de transformer les monomères de la lysine alimentaire en homoarginine (HA) par *guanidination* (Leterme et Thewis, 1995). Cette *guanidination* consiste en un traitement avec du O-méthylisourea dans des conditions alcalines (Mauron et Bujard, 1964, cité par Ravindran et Bryden, 1999). Même si la digestion et l'absorption de l'homoarginine par la paroi intestinale sont similaires à celle des autres AA (Siriwan et al., 1994), elle ne participe pas dans le métabolisme et elle n'apparaît pas dans les excréments endogènes. Ainsi, toute l'homoarginine collectée dans les digesta iléaux est d'origine alimentaire, permettant d'estimer la digestibilité iléale vraie (Leterme et Thewis, 1995 ; Ravindran et Bryden, 1999). Néanmoins, l'absence de l'homoarginine absorbée par les intestins dans les sécrétions endogènes pourrait altérer le métabolisme des animaux et pourrait même intoxiquer les animaux par l'augmentation du taux d'ammoniac dans le sang, raison pour laquelle le temps de mesure doit être court (Leterme et Thewis, 1995).

1.4. Calculs associés à l'estimation de la digestibilité apparente, standardisée ou vraie

1.4.1. Digestibilité iléale apparente

La digestibilité iléale apparente des AA est égale à la différence entre la quantité des AA apportée dans l'alimentation et la quantité des AA excrétée dans la partie terminale de l'iléon, divisée par la quantité des AA de l'aliment (Lemme et al., 2004).

Digestibilité iléale apparente (DIA),% =

$$\frac{AA_i \text{ ingéré} - AA_i \text{ excrété au niveau iléal} \times 100}{AA_i \text{ ingéré}} = \frac{(MSI \times AA_i \text{ alim.} - MSE \times AA_i \text{ excr.}) \times 100}{MSI \times AA_i \text{ alim.}}$$

Avec : MSI : Matière sèche ingérée (kg/j) ; MSE : Matière sèche excrétée (kg/j) ; AA_i alim. : Teneur de l'aliment en acide aminé i (g/kg MS) ; AA_i excr. : Teneur des excréta en acide aminé i (g/kg Ms).

1.4.2. Digestibilité iléale standardisée

La digestibilité iléale apparente et la digestibilité iléale standardisée diffèrent au niveau de l'estimation des excrétions endogènes iléales des AA. Deux origines définissent ces excrétions : la fraction indigestible de l'aliment ingéré et les composés d'origine endogène. Stein et al. (2007) ont rapporté que ces excrétions endogènes iléales représentent les AA présents dans les protéines endogènes sécrétées dans la lumière intestinale et qui ne sont pas digérées et ces AA ne sont donc pas réabsorbés avant d'atteindre l'iléon distal. Ces excrétions renferment les mucoprotéines, les cellules nécrosées, le sérum, l'albumine, les enzymes digestives, les amides et les composés non alimentaires, mais non strictement endogènes à savoir les bactéries (Nyachoti et al., 1997).

Comme noté précédemment pour la digestibilité iléale standardisée, l'excrétion endogène comprend les pertes endogènes basales d'AA appelées également pertes non spécifiques. Ces pertes sont des pertes endogènes minimales liées à l'ingestion de la matière sèche. Elles sont indépendantes du métabolisme de l'animal et de la composition chimique des aliments. Ces

pertes sont donc proportionnelles à la quantité totale de la matière sèche ingérée. Par contre, elles ne sont pas proportionnelles à la quantité de protéine ingérée (Amipig, 2000 ; Lemme et al., 2004 ; Stein et al., 2007) (Figure 1-3). Les pertes endogènes basales exprimées en kg/MS diminuent avec l'augmentation de la matière sèche ingérée et avec l'augmentation du poids de l'animal, l'effet du poids étant plus marqué à une faible quantité de matière sèche ingérée (Stein et al., 2007).

Digestibilité iléale standardisée =

$$\frac{(\text{MSI} \times \text{AAi alim.} - \text{MSE} \times \text{AAi excr.} + \text{MSI} \times \text{AAi endo.}) \times 100}{\text{MSI} \times \text{AAi alim.}} = \text{DIA} + \frac{\text{AAi endo.}}{\text{AAi alim.}}$$

Avec : MSI : Matière sèche ingérée (kg/j) ; MSE : Matière sèche excrétée (kg/j) ; AAi alim. : Teneur de l'aliment en acides aminé i (g/kg MS) ; AAi excr. : Teneur des excréta en acides aminé i (g/kg Ms) ; AAi endo. : Quantité d'acide aminé i d'origine endogène excrétée (g/kg MSI).

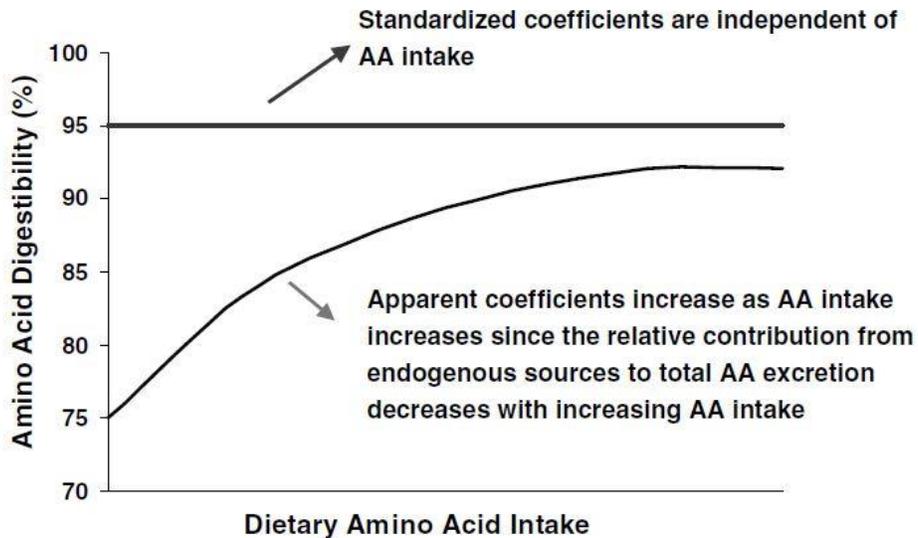


Figure 1-3 Relation entre la digestibilité iléale apparente ainsi que la digestibilité iléale standardisée et l'apport en AA alimentaire (tiré de Lemme et al., 2004).

1.4.3. Digestibilité iléale vraie

Cette estimation de la digestibilité est calculée avec la même formule que la digestibilité iléale standardisée, mais dans ce cas l'excrétion endogène est constituée par les pertes endogènes basales d'AA additionnées des pertes endogènes spécifiques. Ces dernières sont influencées par la composition chimique des aliments (Figure 1-4). Ces pertes sont donc le résultat des protéines et des composantes spécifiques de la matière première ingérée tel que le contenu en fibres et en facteurs antinutritionnels présents dans le régime alimentaire (Schulze et al., 1995 ; Lemme et al., 2004). Ces pertes endogènes spécifiques sont proportionnelles à la quantité totale de la matière protéique ingérée (Stein et al., 2007).

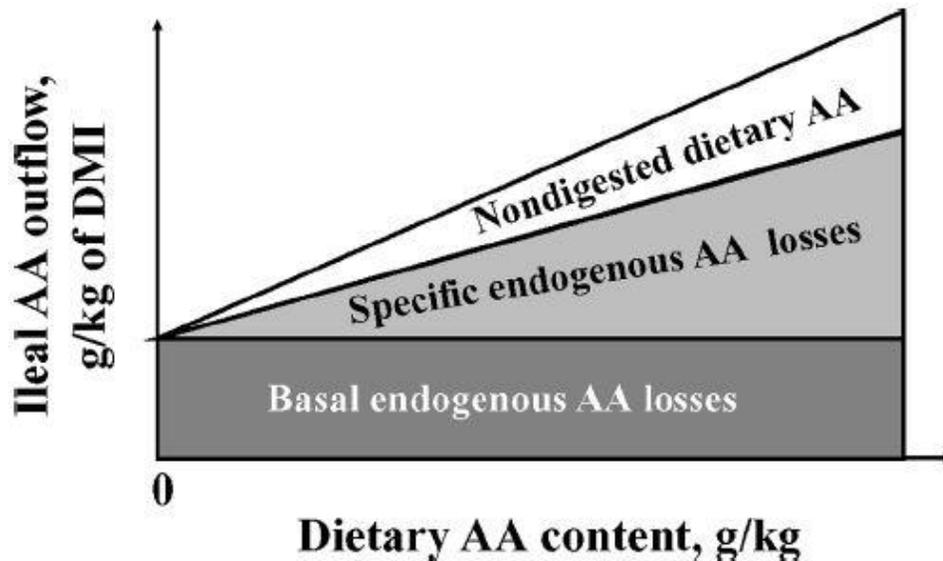


Figure 1-4 Répartition du flux iléal d'AA entre l'indigestible réel, la perte endogène basale et spécifique (tiré de Stein et al., 2007).

Comme la DIA ne prend pas en considération les pertes endogènes des AA, tous les AA présents dans les digesta sont considérés comme des AA alimentaires non digérés ce qui n'est pas le cas. En fait, en plus des AA alimentaires non digérés il y a les pertes endogènes basales d'AA dans les digesta. Dans le cas de la DIS les pertes endogènes d'origine basale sont

soustraites des pertes endogènes collectées dans les digesta. De ce fait, les valeurs de la DIS sont plus élevées comparés aux valeurs de la DIA qui apparaissent plus faibles. La digestibilité standardisée semble être la meilleure estimation de la disponibilité des AA puisqu'elle permet d'évaluer plus précisément la quantité d'AA alimentaires dans un ingrédient en distinguant le flux des AA alimentaires et des AA endogènes provenant de l'animal.

1.5. Facteurs antinutritionnels influençant la digestibilité iléale des acides aminés chez le porc et le poulet

Les aliments doivent apporter aux animaux les substances nutritives nécessaires pour leur entretien, leur production et leur croissance. Par contre, les matières premières utilisées dans l'alimentation peuvent contenir des substances antinutritionnelles. Ces dernières pourraient être inoffensives, mais aussi elles pourraient être la cause directe de la diminution de la DIA des AA par la diminution de la digestibilité iléale de la protéine alimentaire, par une augmentation des pertes endogènes des AA ou bien par les deux mécanismes simultanément. Parmi les substances antinutritionnelles affectant la digestibilité iléale des AA, on trouve le type et la concentration en fibres alimentaires, les inhibiteurs de trypsine, les lectines et les phytates (Bedford et Partridge, 2001). En plus des matières premières, d'autres facteurs peuvent affecter la digestibilité iléale des AA chez le porc et le poulet dont, entre autres, des facteurs liés directement aux animaux comme l'âge et la prise alimentaire. Ces derniers doivent être pris en compte au moment de l'élaboration d'un modèle de prédiction de la valeur nutritive des ingrédients (Blum et al., 1989).

Dans cette partie de la revue, nous nous intéressons principalement aux fibres et aux phytates qui sont reconnus comme des facteurs antinutritionnels et qui sont bien présents dans les aliments des porcs et des poulets. En fait, même si leurs concentrations sont faibles par rapport à l'amidon, à la protéine ou aux lipides, les fibres et les phytates sont d'une haute importance dans la détermination de la digestibilité des cations, du P, des glucides, mais aussi des AA (Cowieson et al., 2016).

1.5.1. Le phytate

Le phytate est un complexe formé entre l'acide phytique (AP) et certains cations. La phytine réfère au complexe entre l'AP et le potassium (K^+), le calcium (Ca^{2+}) et le magnésium (Mg^{2+}). L'AP est la forme libre du *Myo*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis dihydrogen phosphate (IP6) (Figure 1-5, Selle et Ravindran, 2007). Cependant, une confusion est toujours présente dans la littérature entre ces différents termes à cause de leurs utilisations d'une manière synonyme (Cowieson et al., 2016). C'est bien la structure proposée par Anderson (1914) (cité par Sebastian et al., 1998) qui a été acceptée et utilisée aujourd'hui puisque les propriétés physico-chimiques de cette structure expliquent les interactions de l'AP avec les autres composants nutritionnels de l'aliment et donc ses effets nutritionnels.

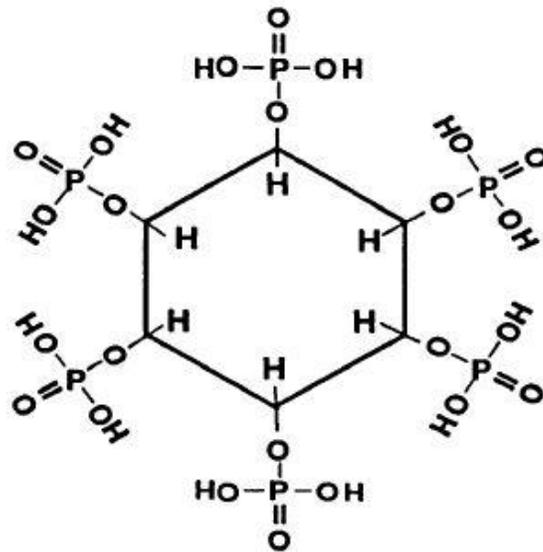


Figure 1-5 Structure de l'AP, *Myo*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis dihydrogen phosphate (IP6) proposée par Anderson en 1914 (tiré de Sebastian et al., 1998).

La description des propriétés chimiques de l'AP a été bien illustrée dans le passé par Cosgrove (1966), Costello et al. (1976) et Maga (1982). C'est une molécule naturelle, généralement présente dans toutes les graines végétales, mais elle peut être aussi présente dans toutes les cellules d'origine végétale (Harland et Morris, 1995). L'AP renferme une teneur élevée en P (28,2%) représentant ainsi la forme principale du P dans la matière végétale (Eeckhout et De Paepe, 1994). Il constitue également de 1 à 5 % du poids des céréales (Vohra et Satyanarayana,

2003). Il joue donc un rôle important dans le stockage du P des grains ce qui constitue un nutriment important pour les animaux d'élevage. Cependant, en formant des complexes avec les éléments nutritifs essentiels, il entraîne une réduction de leurs digestibilités (Sebastian et al., 1997). L'AP est chargé négativement, il est capable de se lier facilement à divers cations di- et trivalents tels que le zinc (Zn^{2+}), le cuivre (Cu^{2+}), le nickel (Ni^{2+}), le cobalt (Co^{2+}), le manganèse (Mn^{2+}), le fer (Fe^{2+}) et le calcium (Ca^{2+}) selon l'affinité de ces six radicaux (Figure 1-6), formant ainsi des complexes AP-minérale très stables et résistants à l'action d'hydrolyse de la phytase animale, végétale et microbienne (Maenz et al., 1999; Namkung et Leeson, 1999). Ce qui constitue une double conséquence, soit la réduction de la disponibilité des minéraux et la diminution de la disponibilité du P phytique (PP) pour les monogastriques. Au pH neutre (pH =7), les groupes phosphate de l'AP sont chargés négativement facilitant la fixation de différents cations et la formation de sels complexes. Ces minéraux peuvent être classés selon leur puissance d'inhibition de l'activité enzymatique de la phytase comme suit : $Zn^{2+} > Fe^{2+} > Mn^{2+} > Fe^{3+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$. En simple solution et à pH neutre, des concentrations minérales de 0,053 mM de Zn^{2+} jusqu'à 4,87 mM de Mg^{2+} engendrent une inhibition de l'activité phytasique de l'ordre de 50% (Maenz et al., 1999). La stabilité du complexe dépend de la durée de l'incubation et du pH du milieu (Maenz et al., 1999).

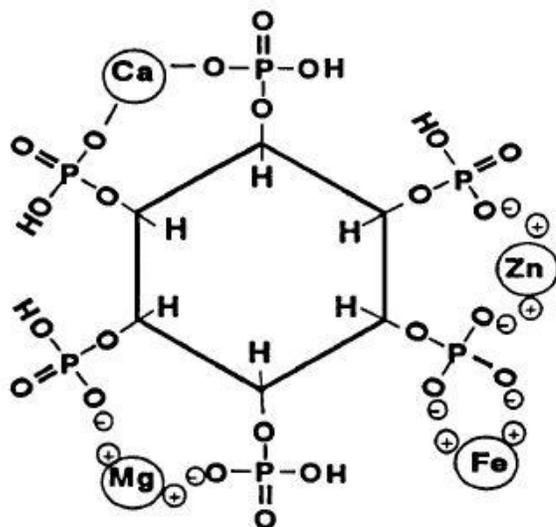


Figure 1-6 Formation de chélate entre l'acide phytique et les minéraux (tiré de Sebastian et al., 1998).

C'est en 1926, qu'Averill et King ont enregistré pour la première fois la présence d'AP dans des aliments destinés aux humains (Selle et Ravindran, 2007). Chez les animaux, l'AP représente 0,5 à 3,4 % de la matière sèche des principales matières premières végétales utilisées en alimentation (Crevieu-Gabriel, 1999). Ensuite, plusieurs recherches ont révélé des concentrations de P total et de PP dans les principaux aliments destinés aux animaux (Nelson et al., 1968 ; Kirby et Nelson, 1988 ; Eeckhout et De Paepe, 1994 ; Ravindran et al., 1994 ; Viveros et al., 2000 ; Selle et al., 2003 ; Godoy et al., 2005). Selle et Ravindran (2008) ont résumé ces études dans le tableau 1-2. Au total, le P se trouve majoritairement sous forme de PP dans les ingrédients alimentaires, il varie de 60% dans le tourteau de soja pour atteindre 80% dans le son de riz.

Tableau 1-2 Moyenne pondérée (et intervalle) des concentrations de P total, de PP, et de la proportion de PP présente dans les principales matières premières utilisées dans l'alimentation des poulets.

Ingrédients	P. totale (g/kg)	P. phytique (g/kg)	Proportion (%)
<i>Céréales</i>			
Orge	3,21 (2,73-3,70) *	1,96 (1,86-2,20) *	61,0 (59-68) *
Maïs	2,62 (2,30-2,90)	1,88 (1,70-2,20)	71,6 (66-85)
Sorgho	3,01 (2,60-3,09)	2,18 (1,70-2,46)	72,6 (65-83)
Blé	3,07 (2,90-4,09)	2,19 (1,80-2,89)	71,6 (55-79)
<i>Tourteaux</i>			
Tourteau de canola	9,72 (8,79-11,50)	6,45 (4,00-7,78)	66,4 (36-76)
Tourteau de coton	10,02 (6,40-11,36)	7,72 (4,9-9,11)	77,1 (70-80)
Tourteau de soja	6,49 (5,70-6,94)	3,88 (3,54-4,53)	59,9 (53-68)
<i>Sous-produits</i>			
Son de riz	17,82 (13,40-27,19)	14,17 (7,90-24,20)	79,5 (42-90)
Son de blé	10,96 (8,02-13,71)	8,36 (7,00-9,60)	76,3 (50-87)

* « les données entre parenthèses indiquent les intervalles de valeurs ». adapté de Selle et Ravindran, 2008

Le PP est localisé dans les graines. Pour le blé et le riz, il est surtout présent dans les enveloppes (péricarpe, testa et aleurone) plus que dans les germes. Cependant, pour le maïs, le PP est localisé en premier lieu dans les germes (Pointillart, 1994). Le tableau 1-3 illustre la localisation du PP dans le grain.

Tableau 1-3 Sites de localisation du phosphore phytique (PP) dans le grain.

Céréale	Échantillon	PP %	Distribution en % du total dans le grain
Maïs	Hybride commercial	0,25	-
	Endosperme	0,01	3
	Germe	1,8	88
	Cuticule	0,02	0,4
Blé	Tendre	0,32	-
	Endosperme	traces	2
	Germe	1,1	13
	Téguments	0	0
	Aleurone	1,16	87
Riz	Brun	0,25	-
	Endosperme	traces	1,2
	Germe	0,98	7,6
	Péricarpe	0,95	80

Reddy et al. 1982 cité par Pointillart et al. 1994

En conclusion, les régimes des porcs et des poulets sont naturellement riches en P végétal qui représente jusqu'à 2/3 à 3/4 de la consommation totale du P. En revanche, ce P végétal se trouve en grande partie sous forme de PP peu disponible et très peu assimilable pour les monogastriques (12 à 50 % digestible) (Beckers et Piron, 2009). En fait, dans un régime alimentaire typique à base de maïs-soja pour poulet, le PP est de l'ordre de 2,5 g/kg (l'AA est de l'ordre de 8,9 g/kg). Toutefois, cette quantité est variable sachant qu'elle est plus importante quand le régime alimentaire est à base d'autres ingrédients tels que les sous-produits de céréales et le tourteau de canola (Cabahug et al., 1999).

1.5.2. La fibre

La fibre alimentaire peut être définie comme étant un mélange de polysaccharides et de lignine qui ne sont pas digérés par les sécrétions endogènes du tractus digestif. Selon les méthodes

utilisées pour la mesure de la fibre alimentaire et les moyens de la détermination de ses composantes, elle peut être classifiée en fibre brute (FB), fibre au détergent neutre (NDF), fibre au détergent acide (ADF) et en polysaccharides non amylacés (PNA) (Souffrant, 2001) (Figure 1-7).

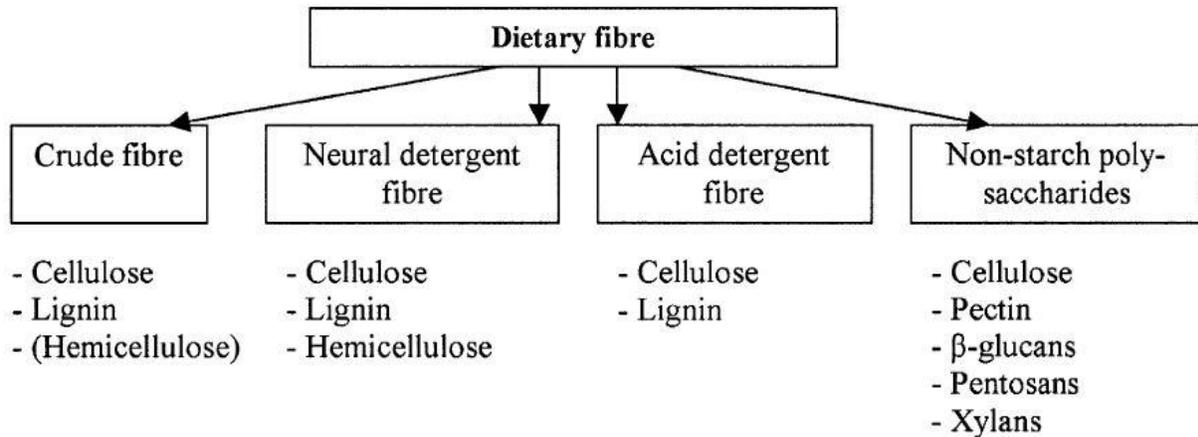


Figure 1-7 Fractions et composantes de la fibre alimentaire (tiré de Souffrant et al., 2001).

La fibre alimentaire est nécessaire, compte tenu de son rôle important dans le maintien des fonctions physiologiques normales et dans l'amélioration du fonctionnement du tractus gastro-intestinal chez le porc (Wenk, 2001). De même, elle améliore le développement des organes du tractus digestif, la production d'enzymes et la digestibilité des nutriments chez le poulet (Kiarie et al., 2017). En fait, chez le poulet, Kiarie et al. (2017) suggère que l'efficacité de la fibre est la conséquence d'un meilleur fonctionnement du gésier ainsi qu'une augmentation des reflux gastroduodénaux facilitant le contact des nutriments avec les enzymes digestives. En revanche, les effets bénéfiques de la fibre dépendent de ses caractéristiques physico-chimiques ainsi que de son niveau dans l'aliment. Un niveau modéré de fibre est ainsi nécessaire dans l'aliment des porcs et des poulets. En raison de ses caractéristiques physiques et de son action abrasive (Shah et al., 1982), la fibre augmente les sécrétions endogènes du tractus digestif soit par la desquamation des cellules épithéliales soit par l'adsorption des peptides, des AA et des enzymes digestives (Nyachoti et al., 1997) ce qui mène à une diminution de la digestibilité apparente et de l'absorption des AA.

1.6. Relation entre l'ajout des enzymes exogènes aux régimes alimentaires et la digestibilité des acides aminés chez le porc et le poulet

Depuis les années 1980, les phytases ont occupé une place primordiale dans plusieurs domaines : nutrition, protection de l'environnement et biotechnologie. C'est depuis le début des années 1990 que la phytase microbienne a été introduite dans l'alimentation des porcs et des poulets pour devenir en 2000 l'additif alimentaire le plus incorporé dans les régimes des monogastriques à l'échelle mondiale (Cowieson et al., 2014).

1.6.1. Définition et description de la phytase

Les phytases ou *myo*-inositol hexaphosphate hydrolases sont des enzymes nécessaires pour l'hydrolyse des molécules de phytates et pour la libération du PP (Figure 1-8). Détectée pour la première fois dans le son de riz, cette enzyme très répandue dans la nature appartient au groupe des acides phosphatases de haut poids moléculaire (Selle et Ravindran, 2008) et elle renferme deux classes : les histidines phytases et les phytases métallo-dépendantes (Parra, 2001) (Figure 1-9). Cette enzyme assure l'hydrolyse de l'AP ce qui génère le *myo*-inositol monophosphate (IP1) et cinq phosphates inorganiques (Pi) (Selle et Ravindran, 2007).

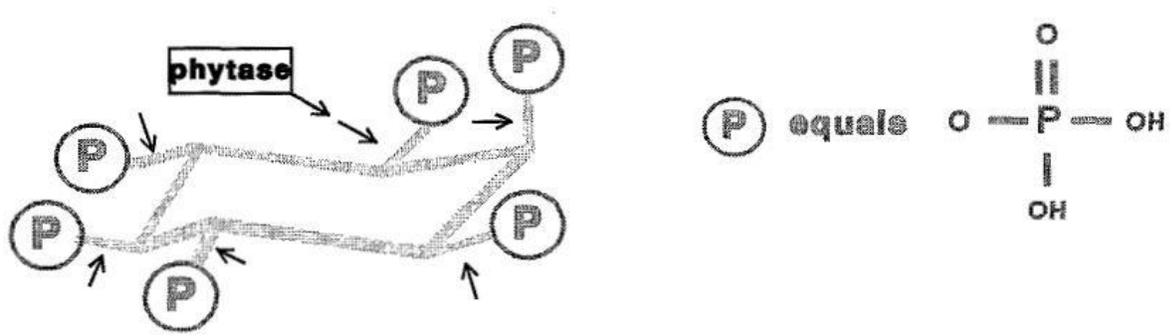


Figure 1-8 Mode d'action des phytases sur les phytates alimentaires (tiré de Kemme et al., 1997).

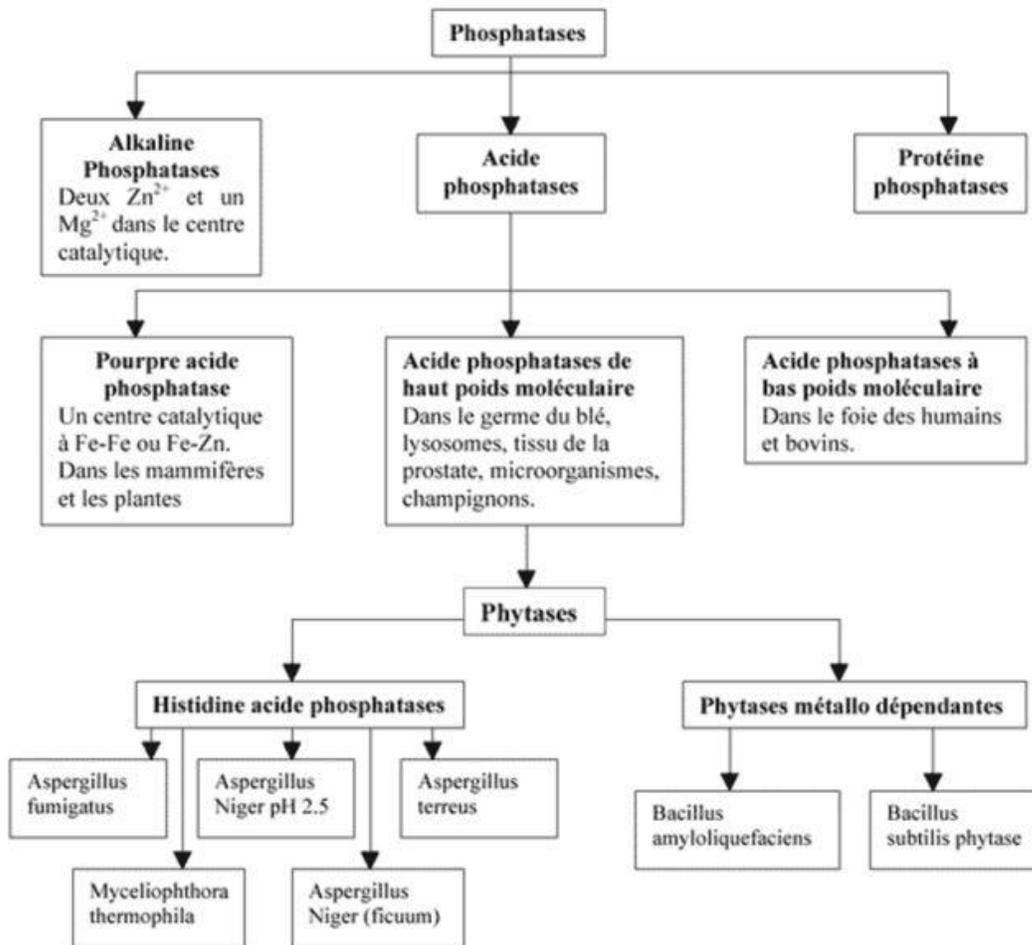


Figure 1-9 Classification des phytases en histidines phytases et en phytases métallo-dépendantes (tiré de Parra, 2001).

Selon le site d'initiation de l'hydrolyse de l'AP, l'union internationale des biochimistes a classé les phytases en deux catégories : la 3-phytase dont la déphosphorylation de l'AP commence sur la position 3 produisant le 1,2,4,5,6-pentakisphosphate et du Pi et la 6-phytase qui commence la déphosphorylation de l'AP sur la position 6, cédant le 1,2,3,4,5-pentakisphosphate et du Pi (Angel et al., 2002). Les phytases sont produites par des micro-organismes, comme les bactéries *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas sp.*, *Escherichia coli*, les levures *Schwanniomyces castelii*, *Saccharomyces cerevisiae* et les champignons *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus terreus*, par des plantes et par des tissus animaux (Nagashima et al., 1999).

Le tableau 1-4 illustre des exemples avec les caractéristiques de 3 - et de 6-phytases disponibles actuellement dans l'industrie de l'alimentation animale.

Tableau 1-4 Exemples et caractéristiques de 3 - et 6-phytases utilisées en nutrition animale.

Type	Origine de la protéine	Expression	pH optimum	Température optimum (°C)	Nom commercial
3	A. niger	A. niger	2 ; 5-5.5	65	Natuphos®
3	A. niger	A. niger, non-recombinant	6	-	Allzyme®SSF
3	A. niger	Trichoderma reesei	2,5	-	Finase®P/L
6	Escherichia coli	Schizosaccharomyces pombe (ATCC 5233)	4,5	55	Phyzyme®XP
6	Escherichia coli	Pichia pastoris	4,5	-	Quantum®
6	Escherichia coli	Trichoderma reesei	-	-	Quantum Blue®
6	Escherichia coli	Pichia pastoris	3,4-5,0	58	OptiPhos®
6	Peniophora lycii	Aspergillus oryzae	4-4.5	50-55	Ronozyme®
6	Citrobacter braakii	Aspergillus oryzae	-	-	Ronozyme Hiphos®
6	Buttiauxella spp.	Trichoderma reesei	3,5-4,5	60	Axtra®PHY

tiré de Dersjant-Li et al., 2015

Quatre sources de phytases et donc quatre sortes d'activité phytasique peuvent être distinguées dans le tractus digestif des animaux monogastriques (Angel et al., 2002 ; Selle et Ravindran, 2008) :

- La phytase endogène présente dans certains aliments destinés aux monogastriques (phytase végétale).
- La phytase endogène produite par la microflore intestinale (microflore du gros intestin).
- La phytase endogène générée par la muqueuse intestinale.
- La phytase exogène rajoutée dans l'alimentation des animaux.

L'activité de la phytase intestinale des monogastriques est négligeable à cause de la faible solubilité des phytates dans l'intestin grêle suite à la forte présence de cations (principalement le calcium) dans la lumière intestinale à pH élevé. L'activité phytasique intestinale a tendance à s'améliorer avec l'âge chez les poulets grâce à l'augmentation de la surface de la muqueuse intestinale (Morgan et al., 2015).

Phytase végétale

L'activité phytasique végétale varie d'une espèce végétale à une autre et à l'intérieur d'une même espèce, elle varie d'une variété à une autre (Angel et al., 2002). Le tableau 1-5 résume l'activité phytasique moyenne (U/kg) de différents ingrédients alimentaires rencontrés dans les aliments pour monogastriques.

Tableau 1-5 Activité phytasique moyenne des espèces végétales.

Céréale	Activité phytasique moyenne	Taille de l'échantillonnage
Blé	600 ± 60	(n=11)
Remoulages de blé	1900 ± 140	(n=12)
Sons de blé	1100 ± 120	(n=24)
Seigle	4900 ± 620	(n=3)
Sons de seigle	6300 ± 1100	(n=8)
Triticale	1500 ± 170	(n=8)
Orge	400 ± 200	(n=4)
Pois	80 ± 20	(n=20)
Mais	30 ± 15	(n=7)
Avoine	30 ± 15	(n=6)
Riz	125 ± 60	(n=7)
Tourteaux		
- Colza	100 ± 50	(n=6)
- Soja	60 ± 30	(n=8)
- Tournesol	60 ± 20	(n=11)
- Arachide	0	(n=3)

(U/kg, où une unité correspond à la libération d'1 µmole de P/min à partir du substrat phytate de sodium, à pH 5,5 et à 37 °C). tiré de Pointillart, 1994

Une activité phytasique importante est présente dans le blé, le seigle et le triticale. L'activité phytasique de l'orge est variable pouvant être aussi élevée que le blé (Angel et al., 2002). Plusieurs facteurs peuvent affecter l'activité de la phytase présente dans les ingrédients alimentaires à savoir, le pH (Kempe et Jongbloed 1992, cité par Pointillart, 1994) et la chaleur (Jongbloed et Kempe, 1990). Par exemple, la température élevée survenant au moment de la

transformation des aliments lors de la granulation réduit l'activité de la phytase végétale d'une façon importante. Une haute température pourrait même diminuer l'efficacité de la phytase de 30% à 50% au-delà de 80°C selon le type et la forme de l'enzyme (Pointillart, 1994).

Phytase intestinale

Angel et al. (2002) ont rapporté qu'en 1937 est apparu le premier rapport soulignant la présence d'une activité phytasique dans le tractus gastro-intestinal des animaux, plus précisément chez les rats. D'autres études ont été poursuivies, confirmant la présence de phytase endogène dans le tractus gastro-intestinal des ruminants, mais aussi des monogastriques. Comparés aux ruminants, les porcs et les poulets possèdent une activité phytasique faible voire négligeable ce qui a été rapporté par Pointillart (1994). En fait, pour le porc, cette activité est non seulement négligeable, mais aussi elle est non adaptée aux apports élevés de phytates, tandis que chez le poulet cette activité semble être plus importante (Pointillart, 1994). Le poulet est capable d'une meilleure utilisation du P végétale par rapport à l'espèce porcine tandis que les études examinant la présence de la phytase intestinale endogène chez les oiseaux restent contradictoires. En fait, Morgan et al. (2015) ont rapporté la présence d'une activité phytasique *in vitro* à partir d'intestin d'oiseaux. Par contre, cette activité n'a pas été observée *in vivo* et à un pH favorable quand aucune phytase exogène n'était apportée.

Phytase microbienne

L'incorporation de la phytase microbienne dans les régimes alimentaires des monogastriques avait en premier lieu pour objectif l'amélioration de l'utilisation digestive du P végétal. C'est en 1990, que les premiers rapports illustrant ces travaux chez le porc et le poulet ont été réalisés. Ces études ont été menées par Simons et al. (1990) à partir d'extrait d'*Aspergillus ficuum* et par Nâsi (1990) à partir d'*Aspergillus niger*. Et ainsi, les recherches et les rapports concernant le rôle de la phytase dans l'amélioration de l'utilisation digestive du P végétale se sont

multipliés dans beaucoup de pays de l'Europe et après aux États-Unis. La première phytase qui a été introduite sur le marché des aliments pour animaux dans les Pays-Bas a été extraite d'*Aspergillus niger*. Avec le développement de la phytase microbienne, d'autres générations de cette enzyme ont vu le jour et répondaient de plus en plus aux exigences du marché mondial principalement pour leurs propriétés catalytiques et leur stabilité pour une meilleure efficacité dans la dégradation des phytates (Zeng et al., 2016). C'est en 1991, que le premier rapport soulignant l'effet positif de la phytase microbienne sur la dégradation des phytates chez les monogastriques a été publié. Ce rapport a été élaboré par Van der Klis et Versteegh (1991). Les auteurs de ce rapport ont démontré que l'incorporation de la phytase dans le régime alimentaire des poules pondeuses menait à une amélioration significative de la digestibilité iléale apparente de l'azote. Barnett et al. (1993) ont montré que la phytase ajoutée dans les régimes alimentaires des porcelets sevrés augmentait significativement la digestibilité de l'azote (de 0,66 à 0,71) et de la lysine ainsi que le dépôt en azote.

1.6.2. Effets de la phytase sur la digestibilité du phosphore

Comme mentionné précédemment, le phytate est une molécule riche en P, mais qui est peu digestible par le porc et le poulet. De 60 à 80 % du P ingéré par les porcs sont excrétés menant à des rejets de P importants. Cowieson et al. (2004) ont rapporté que chez les poulets l'ingestion du PP engendre une augmentation du taux de P excrété d'environ 43% comparée aux animaux ne recevant pas de PP. La réduction des excréments du P par l'augmentation de l'utilisation du P végétal est la cause directe du développement de la phytase microbienne. Plusieurs recherches ont montré que la phytase permet de diminuer les rejets du P jusqu'à 50 %, mais aussi permet d'augmenter la disponibilité d'autres nutriments liés aux phytates. En fait, l'hypothèse suggérant un lien entre les phytates et d'autres nutriments se confirme par la libération des nutriments par la phytase en proportion du P libéré en raison de l'action directe de cette enzyme sur la destruction du PP (Bedford et al., 2015). La capacité de la phytase microbienne dans l'amélioration de la digestibilité du P a été prouvée chez le porc et le poulet. La digestibilité du P sous l'effet de l'ajout de la phytase est variable d'un ingrédient à un autre,

cette variation peut être attribuée à l'existence d'une activité phytasique végétale interne dans certains ingrédients. Prenant l'exemple du blé, où la variabilité de l'activité phytasique endogène a été bien déterminée, la digestibilité endogène du P était plus élevée dans les variétés à forte activité phytasique endogène (+50%) par rapport à celles à faible activité phytasique (Figure 1-10) et la réponse à l'action de la phytase exogène est plus faible dans les ingrédients à forte activité phytasique endogène (Barrier-Guillot et al., 1996). Dünghoef et al. (1994) ont montré que la supplémentation de 750 unités de phytase par kg chez le porc augmente la disponibilité du P de 18% à 56% dans un régime à base de maïs, de 62% à 74% dans un régime à base de blé et de 52% à 67% dans un régime à base de triticales. Bruce et al. (1995) ont trouvé que l'incorporation de 750 unités de phytase microbienne par kg dans un régime à base d'avoine chez le porc menait à une amélioration de la digestibilité iléale du P de 64% et à une réduction de l'excrétion du P de 38,7% (2,33 vs 3,80 g/jour). Cet apport de phytase a également augmenté les digestibilités du Ca (32,8%), Mg (55,2%), et de la matière sèche (10,6%), en plus de la digestibilité de la protéine (3,8%). Chez le poulet, Ravindran et al. (2000) ont montré que l'ajout de la phytase dans des régimes alimentaires contenant 10,4, 13,2 et 15,7 g/kg d'AP augmentait la digestibilité iléale du P respectivement de 21,8 %, 28,9 et 27,8%. De ce fait, la phytase augmente la digestibilité du PP de 40,3%, 58,9% et de 44,1 % respectivement dans les régimes à faible, moyen et haut taux d'AP.

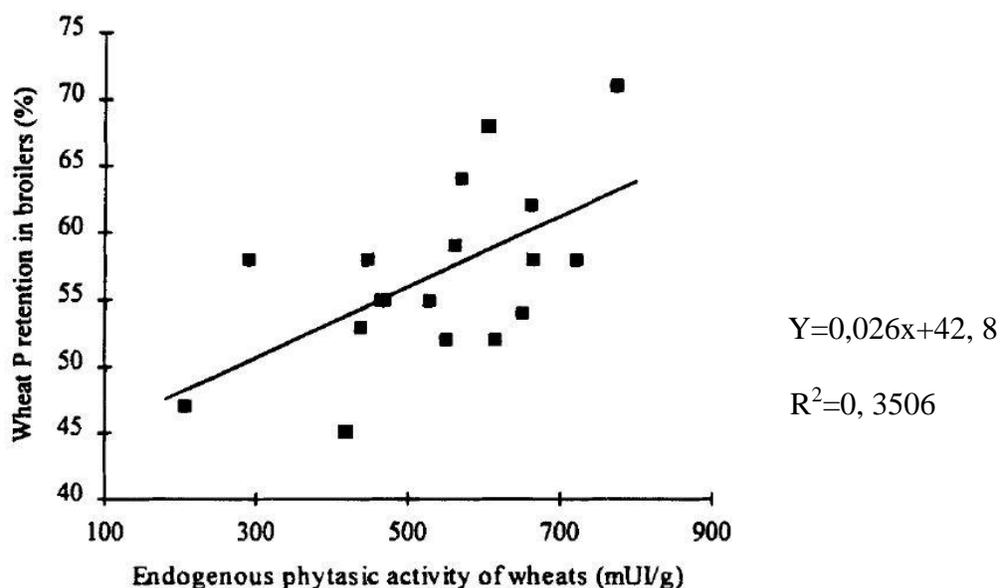


Figure 1-10 Influence de la phytase endogène du blé sur les coefficients de digestibilité du P chez les poulets (n=8) (tiré de Barrier-Guillot et al., 1996).

Le tableau 1-6 résume l'action de la phytase microbienne sur la digestibilité du P chez le poulet. Les résultats démontrent que l'augmentation de la dose de la phytase incorporée est accompagnée d'une amélioration des pourcentages du P digestible pour les animaux et donc une diminution du rejet de cet élément dans les effluents d'élevage.

Tableau 1-6 Effet de l'augmentation de la concentration de la phytase sur la disponibilité et l'excrétion du phosphore (P).

Phytase (FTU/kg aliment)	Contenu en P (g/kg aliment)	P disponible (%)	P dans le fumier (g/kg matière sèche ingérée)
0	4.5	49.8	2.7
0	6.0	45.6	3.8
0	7.5	44.6	4.9
250	4.5	56.5	2.3
500	4.5	59.6	2.1
750	4.5	59.5	2.1
1000	4.5	62.5	2.0
1500	4.5	64.5	1.9

Simons et al., 1990 cité par Kies et al., 2001

Les études établissant l'équivalence entre la phytase microbienne et le P ont été résumées par Selle et Ravindran (2007). Dans ces études, des niveaux croissants de phytase exogène ont été incorporés dans des régimes de base carencés en P. Les valeurs de P libérées ont été calculées à partir d'équations de régression décrivant les meilleures réponses soulignées pour les paramètres sélectionnés. Chez le poulet, ce sont le gain de poids corporel et le taux de cendres qui ont été pris en considération vu qu'ils sont les meilleurs indicateurs de la disponibilité du P (Potter, 1988, cité par Selle et Ravindran, 2007). La même chose a été réalisée chez le porc, pour qui l'intégrité de l'os et les performances de croissance ont été sélectionnées et comparées pour calculer les équivalences entre la phytase microbienne et le P (Selle et Ravindran, 2008). Bedford et al. (2015) suggèrent que la seule différence qui existait entre les différentes sources de phytases microbiennes est que pour quelques-unes d'entre elles, il est nécessaire de rajouter plus d'unités comparées aux autres pour arriver aux mêmes résultats. La figure 1-11 montre que pour une même dose de phytase (500 FTU), le niveau de la libération du P dépend de la source de la phytase.

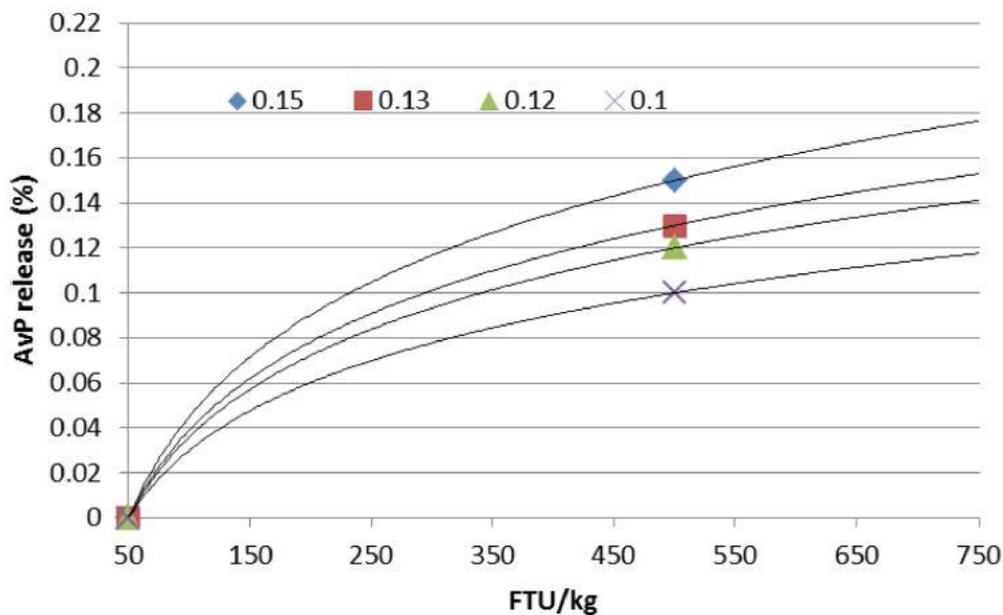


Figure 1-11 Relation entre la dose de phytase et la libération du P à 500 FTU/kg (tiré de Bedford et al., 2015).

Avec l'avancement des recherches sur le phytate, des études ont prouvé que les effets négatifs de cette molécule antinutritionnelle ne se limitent pas à la disponibilité du P et du Ca, mais elle touche également d'autres nutriments importants comme la protéine. En fait, la phytase semblerait exercer un effet marqué sur l'amélioration de l'utilisation digestive des protéines (Selle et Ravindran, 2008). La figure 1-12 illustre d'une façon plus détaillée les éléments liés au phytate dont la protéine et l'effet de son hydrolyse sur leur libération.

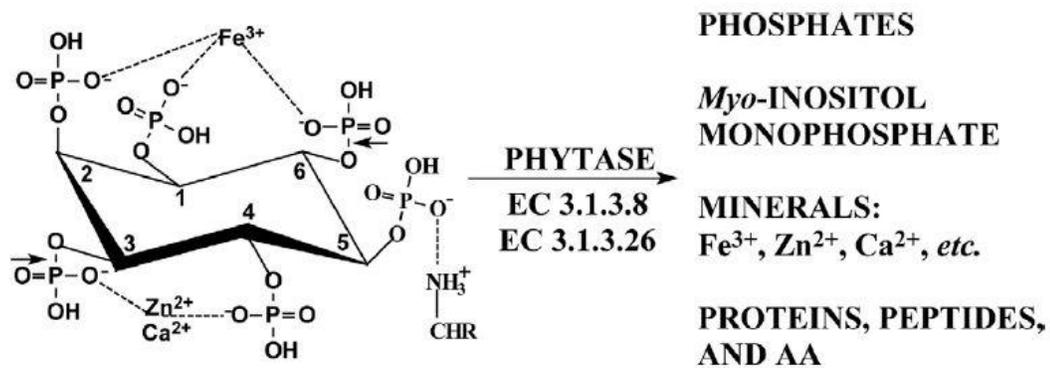


Figure 1-12 Actions de la 3- phytase (EC 3.1.3.8) et de la 6-phytase (EC 3. 1.3.26) sur le myo-inositol hexakisphosphate (IP6) (tiré de Yu et al., 2012).

1.6.3. Phytase et acides aminés chez le porc et le poulet

1.6.3.1. Phytate et interactions avec les protéines alimentaires et les acides aminés

La capacité de liaison du phytate aux protéines a été probablement prouvée pour la première fois dans des extraits de coton (Selle et Ravindran, 2008). *In vitro*, Kies et al. (2006b) ont également suggéré le potentiel du phytate à se lier aux protéines. Par conséquent, la DIA des AA des monogastriques pourrait être affectée par la présence du phytate dans les régimes alimentaires. Une corrélation négative et significative a été démontrée chez le poulet par Ravindran et al. (1999a) entre la concentration en PP et la digestibilité des protéines. Ravindran

et al. (2006) ont démontré que chez le poulet, la DIA de la plupart des AA était significativement influencée par la concentration en phytate de la ration à l'exception de la sérine, la proline, l'isoleucine, la cystéine et le tryptophane. Ces résultats viennent confirmer ceux obtenus par Ravindran et al. (2000) où la DIA des AAE chez les poulets a été diminuée significativement par le phytate. Comme pour le poulet, les mêmes résultats ont été observés chez le porc par Liao et al. (2005) où une baisse de la DIA des AAE a été associée à la présence du phytate.

Ravindran et al. (1999a) ont suggéré que le phytate est un facteur antinutritionnel qui permet d'affecter les mécanismes d'absorption et d'excrétion des AA dans le tube digestif des animaux. Les phytates peuvent influencer négativement la DIA des AA et donc des protéines par divers mécanismes. Les principaux mécanismes sont : la liaison directe aux AA libres, la formation de complexes inhérents phytates-protéines dans les aliments, la formation de *novo* de complexes phytates-protéines dans le tube digestif des animaux, la formation de *novo* de complexes phytates-AA après la digestion des protéines alimentaires dans le tube digestif et la formation de complexes entre les phytates et les enzymes protéolytiques dans le tube digestif (Ravindran et al., 1999a; Selle et al., 2000; Adeola et Sands, 2003; Liao et al., 2005) entraînant l'inhibition de l'activité des enzymes protéolytiques. D'ailleurs, Camus et Laporte (1976) ont attribué l'inhibition de la digestion des protéines par la pepsine à la formation de complexes phytates-protéines à un pH acide (Camus et Laporte, 1976, cité par Selle et al., 2009), ce qui diminue l'activité enzymatique de la pepsine. Yu et al. (2012) ont confirmé cette dernière idée en montrant que la présence de $0,911 \text{ mg mL}^{-1}$ d'AP provoque une diminution de l'activité enzymatique de la pepsine de 87%, qui se poursuit avec l'augmentation de la dose de l'AP (Figure 1-13).

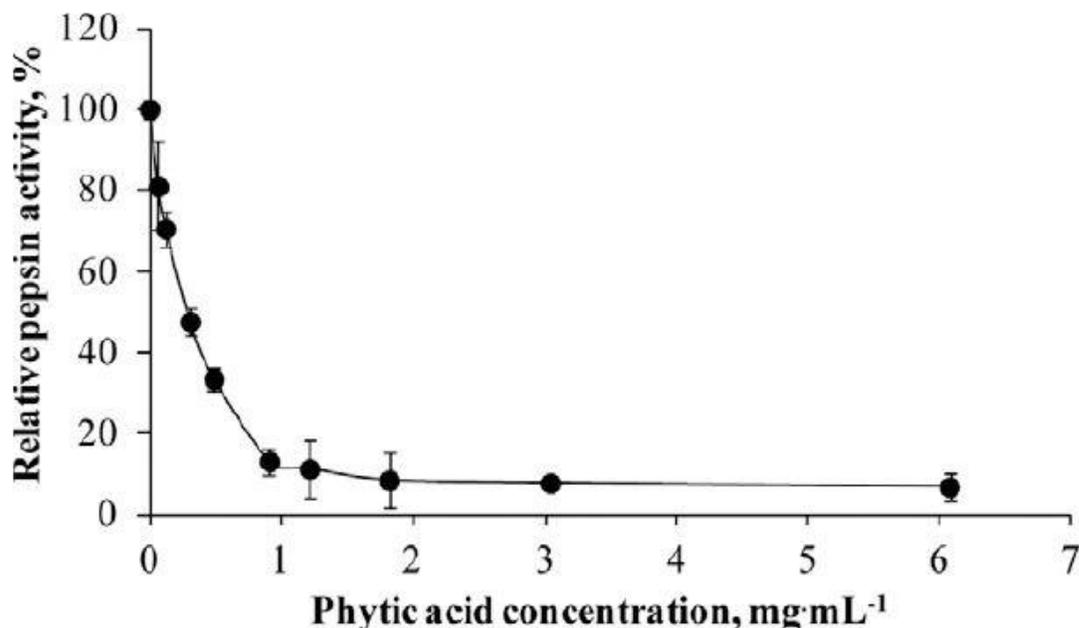


Figure 1-13 Inhibition de l'activité de la pepsine sous l'action de l'acide phytique (tiré de Yu et al., 2012).

De plus, Deshpande et Cheryan (1984) ont prouvé *in vitro* que les phytates ajoutés entraînent l'inhibition de l'activité enzymatique de l' α -amylase (Deshpande et Cheryan, 1984, cité par Radcliffe et al., 2006), tandis que, Mroz et al. (1991) ont montré que l'inclusion de la phytase améliore l'activité de la trypsine dans les digesta duodénaux menant à une libération accrue des AA liés aux phytates (Radcliffe et al., 2006). Rutherford et al. (2012) ont mentionné que la formation de complexes phytates-protéines se fait soit par une interaction directe entre les chaînes latérales des AA chargés positivement et les groupes P des phytates, soit par le biais de ponts de cations divalents. Cowieson et al. (2004) ont également montré que l'ingestion d'AP influence négativement l'absorption des AA. Un gramme d'AP par kg augmentait significativement l'excrétion de tous les AA à l'exception de la tyrosine par rapport aux animaux recevant du glucose. Cette augmentation n'est pas la même pour tous les AA : elle varie de 11% pour la sérine à 60% pour l'histidine. La présence d'AP cause une augmentation des pertes endogènes des AAE et AANE de 26% et 29% respectivement. Ces résultats ont été confirmés par Cowieson et Ravindran (2007) qui ont utilisé la méthode d'alimentation

peptidique. Ils ont montré que l'ingestion d'AP entraîne une augmentation importante et significative des pertes endogènes d'azote et d'AA. En fait, la moyenne des pertes endogènes d'AA est passée de 47% à 87% suite à l'augmentation de la concentration d'AP ingérée de 8,5 à 14,5 g/kg.

De plus, l'étude de Cowieson et Ravindran (2007) ont montré que l'AP ne se limite pas à modifier les quantités des pertes endogènes, mais il touche en plus au profil en AA, car son action n'est pas la même selon l'AA. La figure 1-14 montre que l'AP exerce une action sélective pour chaque AA, la thréonine étant l'AA le plus abondant dans les pertes endogènes.

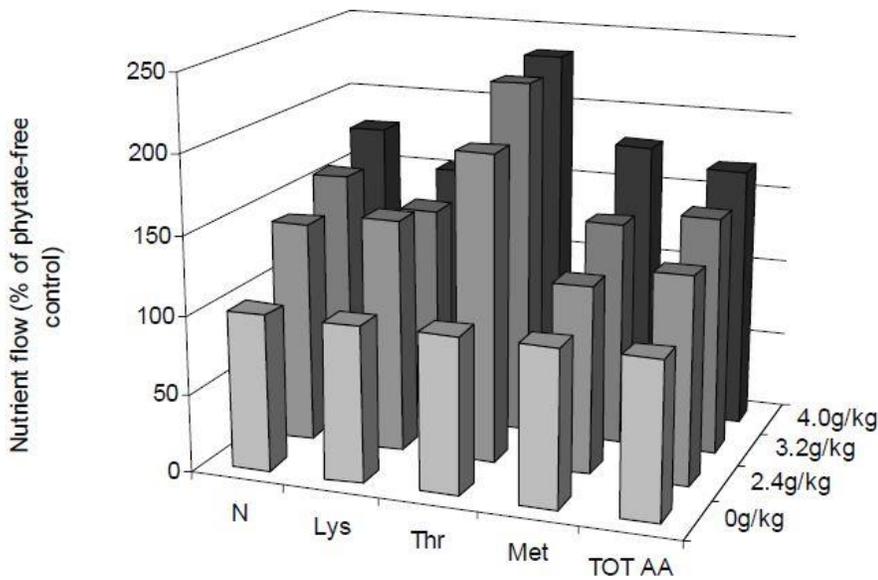


Figure 1-14 Effet de doses élevées d'acide phytique sur les pertes endogènes des AA dans la partie terminale de l'iléon chez les poulets (tiré de Cowieson et Bedford, 2009).

De ce fait, parmi les hypothèses expliquant les améliorations observées dans la digestibilité des AA lors de l'ajout de la phytase se trouvent la réduction des pertes endogènes iléales des AA confirmées par l'amélioration de la digestibilité de la thréonine. En fait, Ravindran et Bryden (1999) ont rapporté que chez le porc et le poulet, les sécrétions endogènes iléales des AA sont particulièrement riches en thréonine. Par contre, l'ajout de la phytase n'a pas d'effet sur les pertes iléales endogènes de certains AA dont l'alanine, la tyrosine et la phénylalanine (Cowieson et Ravindran, 2007). De plus, Cowieson et al. (2004) ont montré que l'AP

augmentait significativement l'excrétion de l'acide sialique dont la concentration est passée de 1,87 mg/oiseau/jour à 5,33 mg/oiseau/jour suite à l'ajout d'un gramme d'AP (Figure 1-15). L'acide sialique est un constituant de la mucoprotéine confirmant l'effet négatif de l'AP sur la production de la mucine et donc sur les sécrétions endogènes iléales des AA.

Tous ces résultats confirment bien que l'AP est associé à une diminution de la DIA des AA. En bref, la figure 1-16 expose d'une façon plus détaillée les mécanismes possibles par lesquels, l'AP diminuerait la digestibilité de la protéine et des autres éléments nutritifs chez les monogastriques.

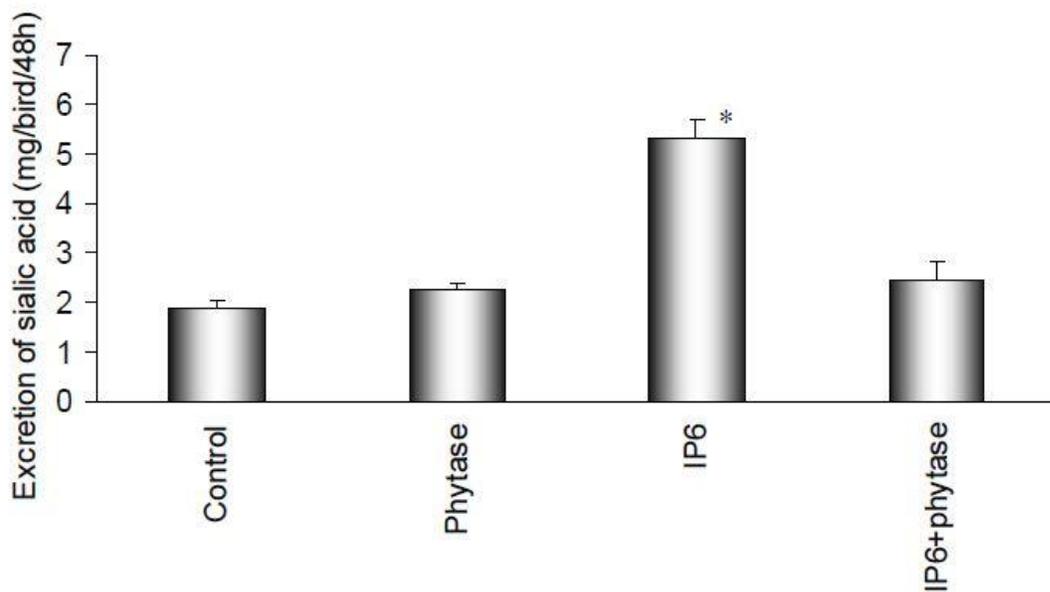


Figure 1-15 Effet de l'ingestion de l'acide phytique et de la phytase sur l'excrétion de l'acide sialique (tiré de Cowieson et al., 2009).

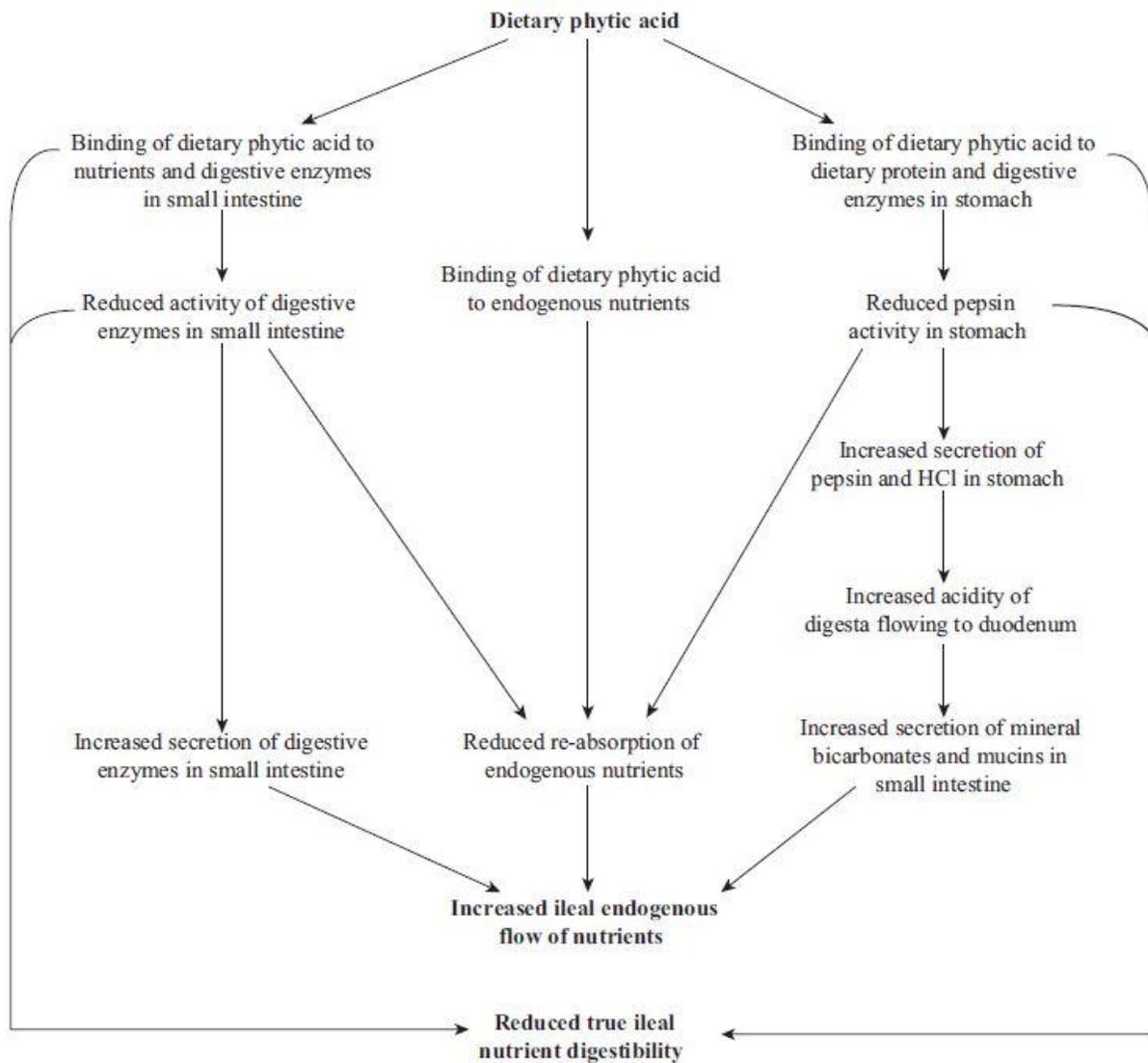


Figure 1-16 Mécanismes d'action de l'acide phytique sur la digestibilité iléale et les pertes endogènes des nutriments dont les AA (tiré de Woyengo et Nyachoti, 2013).

1.6.3.2. *Effet de la phytase microbienne sur la digestibilité iléale apparente des acides aminés chez le porc et le poulet*

Selon les conditions du pH, le phytate est capable de se lier aux protéines. Quoique monogastriques, les conditions du pH dans le tractus digestif diffèrent entre le porc et le poulet. D'une part, le complexe binaire entre le phytate et la protéine a lieu à des pH acides, pH = 2,8 d'après Reddy et Salunkhe (1981) (cité par Selle et al., 2009), mais ce pH varie selon le phytate et la protéine considérée (Rajendran et Prakash, 1993, cité par Selle et Ravindran, 2008). Ces complexes se forment dans le proventricule et le gésier chez le poulet (Selle et Ravindran, 2007) et dans l'estomac chez le porc (Selle et Ravindran, 2008). D'autre part, le complexe tertiaire entre le phytate, les cations divalents (Ca, Mg, et Zn) et la protéine a lieu à des pH basiques, pH = 8,4 d'après Reddy et Salunkhe (1981) (cité par Selle et al., 2009). Ces complexes se forment dans le duodénum, le jéjunum et l'iléon chez le porc et le poulet (Selle et Ravindran, 2007 ; Selle et Ravindran, 2008). Ainsi l'obtention de l'équilibre suivant (Champagne, 1988, cité par Selle et al., 2009) :



La formation de ces complexes entre la protéine et le phytate engendre une hypersécrétion gastrique compensatoire de la pepsine et de HCl pour l'hydrolyse de la protéine qui devient plus résistante à l'action des enzymes. Cette hypersécrétion est à l'origine de la sécrétion de la mucine riche en acides aminés (Selle et al., 2009). Par conséquent, la perte d'acides aminés endogènes pourrait être une conséquence de la sécrétion de la mucine (Selle et Ravindran, 2008).

La figure 1-17 résume les interactions possibles du phytate avec la protéine alimentaire selon les conditions du pH dans le système digestif des animaux.

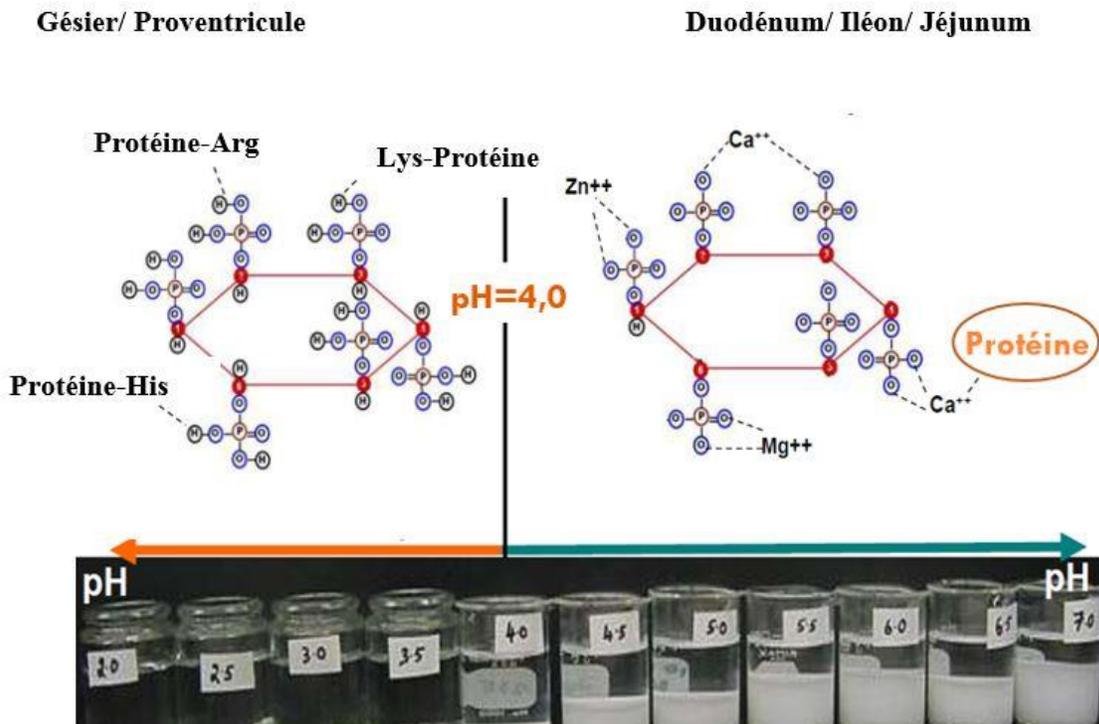


Figure 1-17 Interactions du phytate avec la protéine selon le pH dans l'appareil digestif des animaux (adapté de Plumstead, 2015).

Comme mentionné, la phytase microbienne ajoutée dans l'alimentation des monogastriques avait pour rôle principal l'hydrolyse des phytates pour accroître la disponibilité du P végétal. Toutefois de par leur interaction avec les protéines alimentaires, les phytates diminuent la digestibilité des protéines et des AA. L'amélioration de la digestibilité des AA par la phytase pourrait être le résultat d'un effet direct sur la digestibilité des AA ou bien suite à la diminution des pertes endogènes d'AA.

Effet de la phytase microbienne sur la digestibilité iléale apparente des acides aminés chez le porc

Théoriquement, la capacité de la phytase microbienne d'améliorer la DIA des AA dépend en grande partie de la proportion de liaison entre les phytates et les AA (Liao et al., 2005). Selle et al. (2000) ont affirmé que les facteurs de variation de l'activité des phytases microbiennes sont complexes à déterminer chez le porc. On peut considérer les facteurs suivants : la source et la concentration de l'AP et de la protéine dans le régime alimentaire, la qualité et la digestibilité des protéines, les niveaux du P et du Ca alimentaires et la source et le taux d'inclusion de la phytase. Ils ont souligné aussi que chez le porc, les techniques expérimentales mises en œuvre dans la détermination de la digestibilité iléale, à savoir : les techniques de collecte des digesta (techniques de canulation *vs* l'abattage des animaux), le régime alimentaire (limité *vs ad libitum*), les marqueurs alimentaires (les cendres insolubles dans l'acide (AIA), le dioxyde de titane (TiO₂) et l'oxyde de chrome (Cr₂O₃)) et l'âge des porcs (porcelets sevrés *vs* en croissance et en finition) constituaient d'autres sources de variation des réponses de la DIA des AA vis-à-vis de l'action phytasique (Selle et al., 2000 ; Selle et al., 2009; Favero et al., 2014). Officier et Batterham (1992) ont trouvé que la supplémentation de 1000 FTU/kg de phytase dans le régime alimentaire de porcs augmentait les coefficients de digestibilité iléale de dix AA. Dans cette étude, la moyenne des coefficients de digestibilité iléale était améliorée de 14%, mais variait de 5,6% pour la méthionine à 24% pour la thréonine (Officier et Batterham, 1992, cité par Selle et al., 2012). Liao et al. (2005) ont réalisé quatre expériences afin d'étudier l'effet de la phytase microbienne sur la DIA des AA chez des porcs sevrés recevant une alimentation adéquate en P. Les régimes alimentaires étaient à base de maïs - tourteau de soja, blé-tourteau de soja, blé-tourteau de soja-tourteau de canola et orge-pois-tourteau de canola. Sur ces quatre expériences, ils ont noté que la phytase incorporée à raison de 500 et de 1000 FTU/kg menait à une amélioration significative de la DIA des AA seulement dans le régime à base de blé-tourteau de soja- tourteau de canola, ce qui a été confirmé après par Nitrayova et al. (2006). Ces études montrent que l'efficacité de la phytase microbienne semble être dépendante de la nature des régimes alimentaires. De plus, l'action de la phytase sur la DIA des AA serait variable d'un AA à un autre.

L'ajout de la phytase microbienne dans le régime alimentaire de porcs à base de maïs-tourteau de soja et adéquat en Ca et en P alimentaires (0,5% de Ca et 0,19% de P disponible) augmentait la digestibilité de l'isoleucine et de la leucine. La réduction des taux de Ca et de P alimentaires dans ce même régime alimentaire (0,4% de Ca et 0,09% de P disponible) menait à une augmentation de la digestibilité de la plupart des AA : lysine, isoleucine, leucine, phénylalanine, arginine, valine, et thréonine ainsi que de la moyenne de la digestibilité des AA (Johnston et al., 2004). En effet, le Ca est capable de bloquer l'activité de la phytase par sa concurrence sur les sites actifs de l'enzyme (Qian et al., 1997). Selle et al. (2009) ont rapporté que les phytates se lient aux protéines par l'intermédiaire de ponts cationiques dont le Ca dans les conditions de pH basiques. Par conséquent, les complexes formés sont indigestibles et résistants à l'activité de la phytase (Selle et al., 2000 ; Selle et al., 2009).

Outre les cations divalents, le P inorganique a été aussi considéré comme inhibiteur de l'activité de la phytase chez le porc comme chez le poulet, ce qui peut être expliqué par les mécanismes de rétroaction négative exercés par des niveaux élevés de P inorganique sur l'activité de la phytase (Selle et al., 2000). En fait, Centeno et al. (2007) ont illustré cet aspect chez le poulet en montrant que le pourcentage d'amélioration de la digestibilité des AA a diminué de 2,1% quand le P disponible est passé de 1,4 g/kg à 2,7 g/kg. Ces derniers résultats sont contraires à ceux de Martinez-Amezcuca et al. (2006) indiquant une amélioration de la moyenne de la DIA de 12 AA de 14,2% à 16,6% suite à l'augmentation de la concentration du P inorganique. Ils ont considéré que cette amélioration était due au fait que le P est nécessaire pour le transport des systèmes impliqués dans l'absorption intestinale des AA (Selle et al., 2009).

La concentration du phytate a aussi été considérée comme facteur de variation de l'activité phytasique. Néanmoins, Liao et al. (2005) ont montré que l'effet de la phytase sur la DIA des AA semble être indépendant de la quantité de phytate présente dans le régime alimentaire des porcs, aucune interaction entre la phytase et le régime alimentaire n'a été révélée. Ces résultats viennent confirmer ceux de Sands et al. (2002) rapportés par Liao et al. (2005), où la phytase agit toujours de la même manière sur la DIA des AA et des protéines quand elle est ajoutée à raison de 1200 FTU/kg à deux régimes contenant des concentrations variables de P phytique (0,39% ou 0,22%). Le même résultat a été obtenu chez les poulets par Ravindran et al. (1999a).

Ainsi, l'absence d'une liaison directe entre l'effet de la phytase microbienne sur la DIA des AA et le niveau de phytate présent dans les régimes alimentaires des animaux, suggère plutôt que la réponse à l'activité phytasique semble être influencée par la structure et les propriétés chimiques de la protéine et du phytate (Selle et al., 2000).

Effet de la phytase microbienne sur la digestibilité iléale apparente des acides aminés chez le poulet

L'efficacité de la phytase microbienne chez le poulet est influencée par les mêmes facteurs que chez le porc. En effet, Cowieson et al. (2006) ont prouvé que les coefficients de DIA de tous les AA sont améliorés suite à la supplémentation de la phytase microbienne, cette amélioration étant variable d'un régime à un autre et d'un AA à un autre comme démontré pour le porc. En effet, Rutherford et al. (2012) ont montré que la phytase incorporée dans un régime à base de maïs-tourteau de soja à faible teneur en P chez les poulets améliorerait les coefficients de DIA de la plupart des AA, mais cette amélioration était plus marquée pour la thréonine, la sérine, la glycine, l'isoleucine, la tyrosine et l'histidine dont les coefficients ont augmenté respectivement de 14%, 6%, 9%, 6%, 9% et 7%. La variation des effets de la phytase sur la DIA des AA selon la nature du régime alimentaire est présente aussi chez le poulet, indiquant une meilleure réponse à l'action de la phytase dans les ingrédients moins digestibles par rapport aux plus digestibles. Ceci serait justifié selon Ravindran et al. (1999a) par la détermination d'une corrélation négative et significative entre la digestibilité des AA et la réponse à l'action de la phytase. En effet, la capacité du phytate à se lier aux protéines dépend en grande partie de la concentration, la structure et de la solubilité des protéines à divers pH, mais aussi du site de stockage des phytates dans les divers ingrédients. C'est le cas du blé et du maïs. Dans le blé, le complexe protéine-phytate a été bien prouvé tandis que dans le maïs, la protéine ne se lie pas facilement au phytate (Hill et Tyler, 1954 ; O'Dell et de Boland, 1976, cité par Selle et Ravindran, 2008). En fait, Ravindran et al. (1999a) ont montré que la phytase améliore en moyenne les coefficients de DIA des AA essentiels de 9,2% dans le blé contre seulement 3,3% pour le maïs. Ce résultat a été confirmé après par Rutherford et al. (2002) qui ont montré que

l'amélioration moyenne des coefficients de digestibilité iléale réelle des AAE a atteint un 13,4% dans le régime à base de blé pour seulement 3,9% pour le maïs.

En plus de la protéine, le phytate peut être aussi une autre source de variation entre les régimes alimentaires vis-à-vis de l'action de la phytase. En effet, mesurer *in vitro* le phytate des graines de coton est plus résistant à la phytase que celui du tourteau de soja. Plus le phytate est soluble et donc plus il est apte à l'hydrolyse par la phytase (Han, 1988, cité par Selle et al., 2000). Ravindran et al. (1999a) ont montré que la phytase microbienne améliore les coefficients de DIA des AA chez les poulets indépendamment des concentrations du phytate. Aucune corrélation n'a été trouvée entre la concentration en phytate et les réponses des digestibilités de la protéine et des AA à l'action phytasique. Ravindran et al. (2006) ont ajouté que même si la phytase améliore la DIA des AA à toutes les concentrations de phytates, la tendance à répondre aux augmentations des taux de phytase varie d'un niveau de phytate à un autre. En fait, pour les faibles niveaux de phytates, la DIA des AA augmente avec l'augmentation des taux de phytases alors que pour des niveaux moyens et élevés en phytates, les valeurs les plus importantes de la DIA des AA ont été observées à 500 FTU / kg, avec seulement peu d'amélioration suite à des additions supplémentaires de phytase.

Parmi les principaux facteurs de variabilité de l'activité phytasique chez le poulet se situe le marqueur alimentaire utilisé lors de la mesure de la digestibilité. Les coefficients les plus robustes ont été détectés avec l'AIA et le TiO_2 comparés à ceux trouvés avec le Cr_2O_3 (Cowieson et Bedford, 2009 ; Selle et al., 2012). Le Cr_2O_3 cause une surestimation de la digestibilité dans la ration témoin ce qui réduit la réponse de la digestibilité à l'action de la phytase (Cowieson et al., 2017). Selle et al. (2007) ont montré que l'amélioration des coefficients de digestibilités est de l'ordre de 4,4% avec l'AIA et le TiO_2 alors qu'elle ne dépasse pas 1,4% avec le Cr_2O_3 .

Même si l'effet de la phytase microbienne sur la digestibilité des AA est bien marqué dans plusieurs études, d'autres auteurs n'ont pas trouvé d'effet positif suite à l'ajout de la phytase. C'est le cas de Sebastian et al. (1997) qui n'ont pas trouvé d'effet significatif de la phytase microbienne sur la DIA des AA dans un régime à base de maïs -tourteau de soja chez les poulets. Le même résultat a été trouvé par Zhang et al. (1999). Namkung et Leeson (1999) ont également montré que la phytase n'améliorait pas la DIA de la plupart des AA.

La phytase apparaît ainsi comme étant l'enzyme la plus intéressante et la plus précieuse dans les tableaux de formulation des aliments pour monogastriques, mais ceci n'empêche pas le fait que son effet reste bien dépendant de l'interaction de son action avec plusieurs variables. Ces interactions restent toujours à être bien définies et déterminées précisément. En conséquence, cette thèse vient, dans un premier temps, mieux comprendre le mode d'action de cette enzyme pour bénéficier de ses actions dans la pratique et aider les industries porcine et avicole à bien l'incorporer dans leurs rations au moment de la formulation pour profiter de son action sur la digestibilité de la protéine et la disponibilité des AA.

1.6.3.3. Effet de l'incorporation de super-dose de phytase sur la digestibilité iléale apparente des acides aminés

La super-dose de phytase est une nouvelle notion qui consiste à l'incorporation de quantités supérieures de phytase microbienne aux quantités standards habituellement incorporées dans les rations alimentaires des animaux monogastriques. Cette technique a montré des résultats satisfaisants aussi bien chez le porc que chez le poulet. Kies et al. (2006a) ont expliqué l'amélioration continue de la digestibilité du P avec l'augmentation de la dose de la phytase par deux mécanismes. Le premier est que l'augmentation de la dose d'incorporation engendre une dégradation plus marquée de l'AP. En fait, cette dose supplémentaire peut être la cause d'une dégradation rapide et optimale de l'AP. Le deuxième mécanisme est qu'avec une dose d'incorporation plus importante, une plus grande partie de la phytase peut sortir intacte de l'estomac pour atteindre l'intestin où cette enzyme continue à exercer son action. Ici apparaîtraient les effets supplémentaires des doses supérieures de la phytase comparées aux doses standards habituellement incorporées dans les rations des monogastriques. La phytase dégrade alors l'AP (IP6) en (IP5), (IP4) et (IP3). Il s'est avéré que non seulement l'IP6 possède des effets antinutritionnels, mais aussi les esters de l'AP, soit les (IP5), (IP4) et (IP3). Ceci a été prouvé par Besson (2015) qui a trouvé une corrélation négative et significative entre la digestibilité de l'azote et la concentration de l'IP4 et de l'IP5. Ainsi, la phytase incorporée à des doses standards entraîne la dégradation d'une substance antinutritionnelle qui est l'IP6,

mais en contrepartie, elle provoque la création d'autres substances antinutritionnelles comme l'IP5, l'IP4 et l'IP3 (Pontoppidan et al., 2012) qui seraient dégradées par l'incorporation de doses élevées de phytase. L'effet positif de l'incorporation de doses élevées de phytases a été confirmé par plusieurs auteurs dont, Augspurger et Baker (2004), Cowieson et al. (2006), Brana et al. (2006), Kies et al. (2006) et Pirgozliev et al. (2007), qui ont utilisé des doses égales ou supérieures à 10 000 FTU / kg (Cowieson et al., 2011).

Pour conclure, la phytase semble avoir une grande importance dans l'alimentation des porcs et des poulets. Son activité s'oppose directement à l'action des phytates. Ses actions bénéfiques sont multiples. Comme cité par Cowieson et al. (2004), la phytase permet l'amélioration de l'indice de conversion alimentaire, la rétention des éléments nutritifs et la prévention de rejets dans l'environnement. Les effets positifs de la phytase sont la conséquence d'une amélioration de l'absorption des éléments nutritifs en particulier le P et l'azote ainsi qu'une diminution marquée des pertes endogènes.

1.6.4. Xylanase et digestibilité des acides aminés chez le porc et le poulet

1.6.4.1. Définition et description du xylane

Le xylane est un polysaccharide complexe, formé par un squelette de résidus de xylose liés par des β -1,4-glycosidique (Beg et al., 2001) (Figure 1-18). Il se trouve principalement dans la paroi cellulaire secondaire et représente le principal composant de l'hémicellulose avec un pourcentage de 30 à 35% du poids sec total des parois cellulaires (Beg et al., 2001). Il représente également le tiers du carbone organique renouvelable sur la terre et occupe la deuxième position des polysaccharides les plus importants dans la nature (Motta et al., 2013). Le xylane, la cellulose (1,4- β -glucane) et la lignine forment les principaux constituants polymères des cellules végétales liés *via* des liaisons covalentes et non covalentes. Ce xylane semble être un élément essentiel dans la cohésion des fibres et l'intégrité des parois en raison de sa localisation à l'interface entre la cellulose et la lignine (Motta et al., 2013).

D'après Motta et al. (2013), le xylane renferme quatre principales catégories : les arabinoxylanes, les glucuronoxylanes, les glucurono-arabino-xylanes et les galacto-glucurono-arabinoxylanes. Tenant compte de la structure complexe du xylane, la présence d'une multitude d'enzymes regroupées sous le nom de carbohydrases est indispensable pour son hydrolyse (Chakdar et al., 2016).

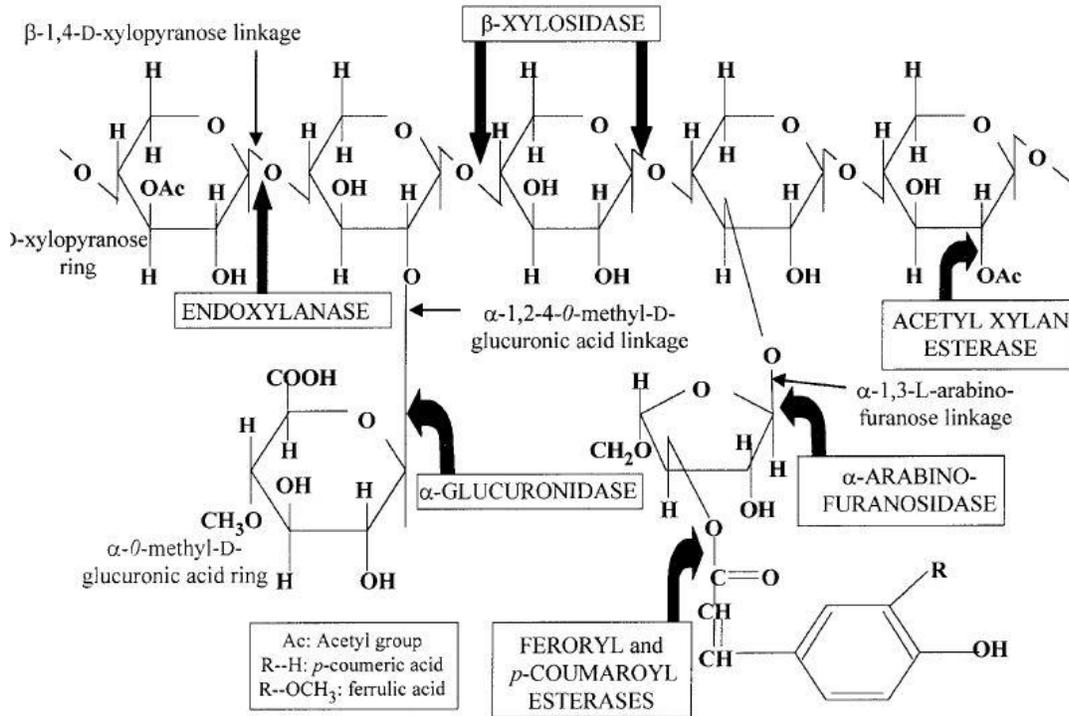


Figure 1-18 Structure du xylane végétale et des sites d'attaque des xylanases microbiennes (tiré de Beg et al., 2001).

Les xylanes solubles, pourraient augmenter la viscosité du digesta intestinal causant ainsi une diminution de la digestibilité des nutriments (Carré, 2004). Selon Carré (1994), la viscosité du digesta est variable et sera affectée par le type de céréales ingérées. Les céréales menant à une plus haute viscosité du digesta sont dans l'ordre croissant, le sorgho, le maïs, le blé, le triticale, l'orge et le seigle. Cette variabilité est marquée aussi au sein d'une même espèce en fonction des cultivars de céréales.

Bedford et al. (1992) ont montré que l'amélioration du gain de poids corporel ainsi que de l'efficacité alimentaire chez les poulets recevant une ration à base de blé supplémentée avec du seigle est attribuée à la diminution de la viscosité du contenu intestinal. La figure 1-19 illustre la relation présente entre le logarithme de la viscosité du contenu du digesta intestinal avec le gain du poids et l'efficacité alimentaire. De plus, Wang et al. (1992) ont montré l'existence d'une corrélation négative entre la viscosité du contenu intestinal et la digestibilité des protéines.

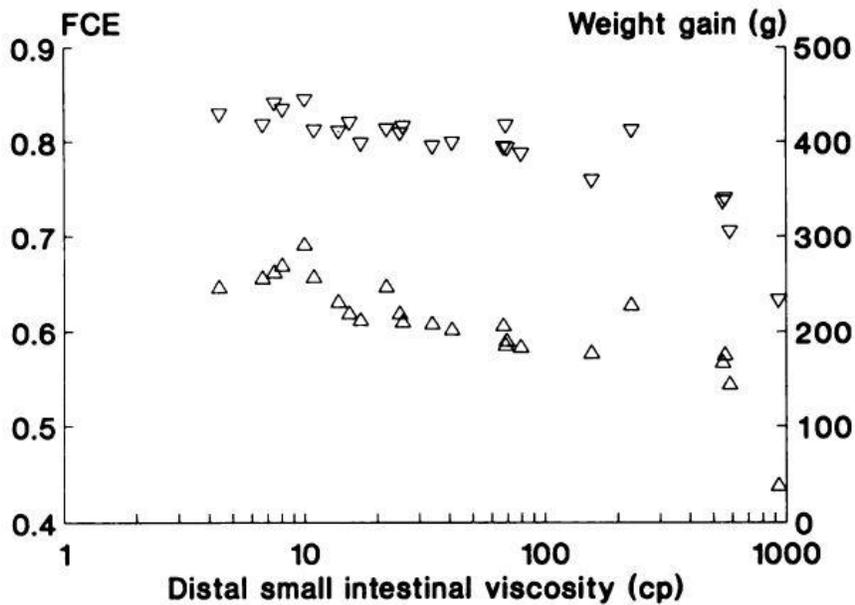


Figure 1-19 Effet de la viscosité de l'intestin grêle proximal en centipoise, cp, sur le gain de poids corporel et l'efficacité de la conversion alimentaire chez les poulets (tiré de Bedford et al., 1992).

En plus de la xylanase, on distingue divers enzymes hydrolysant les PNA et qui diffèrent quant aux substrats, dont la glucanase, la pectinase, la mannanase et la cellulase, entre autres (Bedford et Partridge, 2001).

1.6.4.2. Définition et description de la xylanase

L'hydrolyse complète du xylane nécessite la présence des xylanases. Ces enzymes appartiennent principalement au groupe des hydrolases et plus précisément aux familles des glycosides hydrolases. Les xylanases appartiennent aux familles des glycosides hydrolases GH10 et GH11, mais aussi aux familles GH5, 7, 8 et 43. La famille GH10 à laquelle appartient l'endo-1,4- β -xylanases et l'endo-1,3- β -xylanases comprend des xylanases d'origine végétale, bactérienne et fongique, tandis que la famille GH11 ne comprend que les xylanases d'origine fongique (Chakdar et al., 2016).

Annison (1992) a démontré que la xylanase réduit la viscosité du contenu intestinal grâce à la réduction du poids moléculaire du xylane soluble provoquant ainsi un temps de contact plus large entre les enzymes et leurs substrats pour une meilleure digestibilité des nutriments. En fait, le milieu visqueux peut constituer une barrière qui ralentit et empêche l'accès des enzymes à leurs substrats (White et al., 1983). Ainsi, la diminution de la couche d'eau augmente la vitesse de passage des nutriments au niveau de l'intestin des animaux (White et al., 1983). Bedford et Classen (1992) ont montré que la xylanase engendre une diminution de la viscosité du contenu intestinal à toutes les concentrations de seigle dans l'aliment : 0, 200, 400, et 600 g/kg (Figure 1-20). En revanche, la concentration d'enzyme optimale pour la diminution de la viscosité augmente avec la concentration du seigle dans la ration. De ce fait, il se pourrait que les facteurs à l'origine de cette viscosité soient surtout présents à des concentrations élevées de seigle ou bien que les xylanes du seigle soient plus résistants à l'hydrolyse comparée à ceux présents dans le blé. En fait, ceci est conforme aux résultats cités ci-dessus concernant la forte viscosité trouvée dans le seigle comparée aux autres céréales.

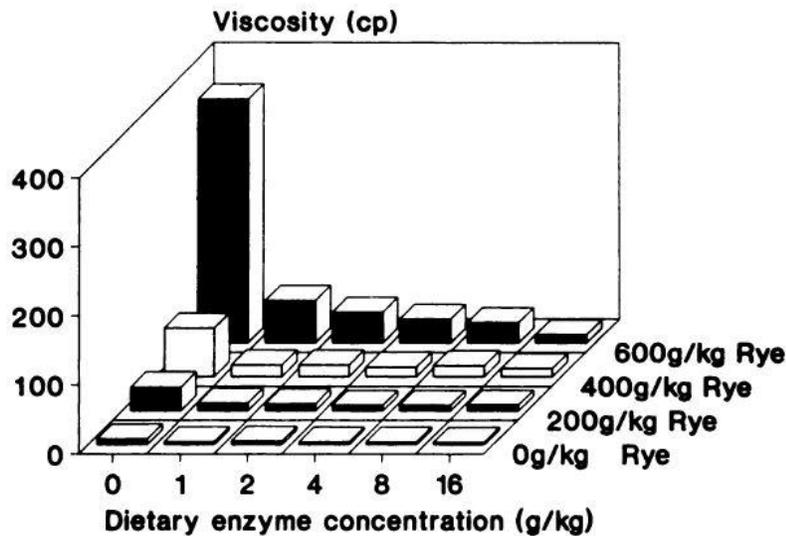


Figure 1-20 Effet de la concentration du seigle et de la xylanase sur la viscosité de l'intestin grêle proximal chez les poulets (tiré de Bedford et Classen, 1992).

Ces enzymes permettent aussi la perforation de la paroi cellulaire de l'endosperme. En fait, cette paroi est composée de xylanes et de β -glucanes dont les proportions sont variables selon la céréale considérée. Cette paroi encapsule l'amidon et les protéines. De plus, ces enzymes permettent la production d'oligosaccharides fermentescibles utilisés comme une source d'énergie (Slominski, 2011).

Les xylanases ont été récupérées dans des *Bacillus*, des *Streptomyces* ainsi que dans d'autres bactéries sans aucun effet pathogène sur les végétaux (Motta et al., 2013). Ces bactéries ont attiré l'attention grâce à la production de xylanases thermostables et alcalines avec un pH optimal supérieur à celui des xylanases fongiques. En plus des bactéries, les xylanases peuvent être produites à partir des champignons filamenteux dont les principaux sont *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, et *Pichia*. Ces derniers produisent des quantités d'enzymes plus importantes que les bactéries et les levures (Motta et al., 2013).

1.6.4.3. *Effet de la xylanase microbienne sur la digestibilité iléale apparente des acides aminés*

En alimentation animale, le rôle principal de la xylanase est l'amélioration de l'efficacité énergétique chez les monogastriques (Flores et al., 2017). Cependant, l'ajout de cette enzyme a bien montré des effets positifs concernant la digestibilité des protéines et des AA alimentaires ce qui confirme que les PNA peuvent causer une diminution de la digestibilité des AA ou encore augmenter les excréments endogènes (Angkanaporn et al., 1994). En fait, Angkanaporn et al. (1994) ont montré que l'addition de pentosanes équivalente à 5g et 35g d'arabinoxylanes de blé /kg chez le poulet provoque une diminution significative de la digestibilité de tous les AA couplée d'une augmentation significative des pertes endogènes des AA. De plus, Cadogan et Choct (2015) ont montré que la réduction du niveau de PNA dans l'iléon coïncide avec une diminution de la quantité de fucose, qui est un constituant important des polysaccharides muqueux, confirmant l'effet négatif des PNA dans l'augmentation des pertes endogènes. Aussi, les PNA peuvent être une cause de la diminution de la réabsorption des AA endogènes ce qui augmente la perte d'AA. En fait, la capacité de la xylanase à améliorer la DIA des AA a été bien démontrée auparavant chez le poulet par Hew et al. (1998) et Bedford et Schulze, (1998). Hew et al. (1998) ont suggéré que les xylanases exogènes augmentent la solubilité des arabinoxylanes permettant l'obtention de composants de faibles poids moléculaires et engendrant une diminution de la viscosité des digesta ce qui améliore la digestion et l'absorption des AA.

Cowieson et Bedford (2009) ont résumé l'effet de la xylanase sur la DIA des AA sur un ensemble de 19 études, dont 8 sur le porc et 11 sur le poulet. La réponse de tous les AA face à la xylanase était significative. En moyenne l'amélioration de la DIA des AA était de 4,8%. L'amélioration la plus importante était pour la glycine et la plus faible pour la méthionine avec respectivement, 7,1% et 2,9% d'amélioration. Pour mieux illustrer l'effet de la xylanase, le calcul de la fraction des AA qui a été digérée grâce à l'action de la xylanase chez le porc et le poulet a montré que pour tous les AA, le pourcentage était aux alentours de 16% et ceci pour la plupart des ingrédients végétaux (Cowieson et Bedford, 2009). En revanche, cette proportion est variable. Elle est plus importante dans les ingrédients qui renferment des quantités élevées

de fibres solubles à savoir, le seigle et l'orge dont le pourcentage d'amélioration de la fraction indigestible des AA peut atteindre 30%. De même, elle peut être réduite dans les ingrédients renfermant des quantités élevées de fibres insolubles comme dans le blé et les drêches avec 5% seulement d'amélioration de la fraction non digestible des AA.

Les céréales renferment des inhibiteurs de xylanases dont le contenu est variable selon les espèces de céréales, le génotype et les facteurs environnementaux. De plus, l'effet des xylanases pourrait varier avec la structure de l'aliment. Il est 1,5 à 6 fois plus important dans les régimes ayant reçu un traitement thermique comparé aux régimes non transformés. En fait, le traitement thermique entraîne une modification de l'architecture de la paroi cellulaire facilitant l'accès des enzymes aux PNA et ainsi engendrant une meilleure efficacité des xylanases (Gebruers et al., 2010).

1.6.4.4. Effet combiné de la phytase et de la xylanase sur la digestibilité iléale apparente des acides aminés

Bien que la phytase et la xylanase agissent sur des substrats distincts, les améliorations les plus importantes observées pour la DIA des AA chez les monogastriques sont le résultat de la combinaison de suppléments des deux enzymes. Ravindran et al. (1999b) ont montré que l'incorporation individuelle de la phytase et de la xylanase dans des régimes alimentaires à base de blé chez le poulet augmentait significativement de l'ordre de 5% la moyenne de la DIA des AA tandis que cette amélioration a atteint 8,6% lors de l'ajout combiné des deux enzymes. L'effet synergique des deux enzymes a été observé pour les DIA de l'alanine, l'histidine, la phénylalanine, la tyrosine, la lysine, l'arginine, la leucine, et la glycine dont les valeurs de la DIA étaient plus élevées comparées à celles trouvées sous l'action de la phytase ou de la xylanase seule. Debicki-Garnier et al. (2014) ont révélé que l'introduction de la phytase et de la xylanase dans des régimes alimentaires à base de maïs avec 20 % de drêche de maïs et à faible teneur en P chez des porcs en croissance améliorait la DIA des AA de 3% quand les enzymes ont été ajoutées seules et de 4,5 % quand elles ont été combinées.

Ravindran et al. (1999b) ont montré chez le poulet que la supplémentation simultanée de la phytase et de la xylanase est bien bénéfique du fait que la xylanase, par sa libération des nutriments encapsulés d'une part et par la réduction de la viscosité des digesta d'autre part, engendre une meilleure action de la phytase sur l'AP et donc améliore encore plus la disponibilité et la digestibilité des nutriments dont les AA. En revanche, dans l'étude de Woyengo et al. (2008), la phytase et la xylanase n'ont pas montré une action synergique entre eux dans un régime alimentaire à base de blé chez les porcs. Ceci a été attribué probablement soit à la présence de P non phytique en quantité importante ou à la présence d'une activité phytasique endogène dans le blé (Woyengo et al., 2008).

Pour conclure, les améliorations observées suite à l'ajout de la phytase et de la xylanase seraient les résultats de la suppression des effets antinutritionnels de l'AP et des arabinoxylanes (Angkanaporn et al., 1994). En fait, la présence d'arabinoxylanes dans les membranes des cellules empêche l'hydrolyse de l'AP puisque la phytase serait incapable d'y accéder. Ainsi la xylanase pourrait faciliter l'accès de la phytase à son substrat (Parkkonen et al., 1997). On parle donc d'effet synergique qui se manifeste par l'hydrolyse de l'arabinoxylanes par la xylanase ce qui libère l'AP pour être hydrolysé à son tour sous l'action de la phytase.

1.7. Analyse des données par méta-analyse

1.7.1. Définition et concepts

L'ensemble des études réalisées sur l'impact de la phytase ou de la xylanase sur la DIA des AA forme un ensemble de données montrant une grande variabilité dans l'amplitude des réponses. Bien que l'analyse traditionnelle par une revue de littérature systématique puisse nous donner une réponse satisfaisante des réponses globales, la quantification des effets des suppléments d'enzymes reste difficile avec ce type d'analyse (Sauvant et al., 2008). L'analyse par méta-analyse permet de quantifier ces effets. Des études précédentes ont montré que cet outil pouvait être utilisé pour quantifier les effets de la phytase sur la digestibilité du P, du PP

et du Ca chez le porc et le poulet (Létourneau-Montminy et al., 2010; Létourneau-Montminy et al., 2011).

C'est surtout au cours des dernières années que la méta-analyse en sciences animales a été beaucoup utilisée en réponse à l'augmentation du nombre de recherches et de publications dans ce domaine (Figure 1-21). Sur un sujet d'intérêt donné, réaliser une seule expérience ne permet pas de tirer toutes les conclusions et d'arriver à une connaissance utilisable et une généralité sur ce thème. En fait, une seule expérimentation reste toujours de petite taille. De plus, chaque expérience possède ses propres conditions expérimentales qui ne sont pas identiques pour tous les essais. En effet, pour comprendre un sujet donné, plusieurs paramètres doivent être mesurés et étudiés ce qui ne peut pas être réalisé dans une seule expérience et nécessite donc le recours à la répétition de plusieurs études. En conséquence, la disponibilité de plusieurs expérimentations et publications pour un même sujet d'intérêt est avantageuse. Ces expérimentations peuvent se différencier par l'année de la réalisation, l'auteur, mais aussi par les conditions expérimentales qui sont propres à chacune d'elle. Comme mentionné précédemment, la synthèse bibliographique classique qualitative a été considérée comme la méthode de base pour récupérer et intégrer les résultats des expérimentations afin d'en faire une synthèse utile. Par contre, cette démarche manque d'objectivité et d'exhaustivité. Suite à la mauvaise utilisation des techniques statistiques, les interprétations et les conclusions tirées des résultats font souvent débat. Par conséquent, il est impossible de bien intégrer et interpréter les résultats au-delà de 12 à 15 expérimentations (Sauvant et al., 2005), d'où l'intérêt de la méta-analyse comme approche alternative d'examen des résultats d'expériences déjà publiés.

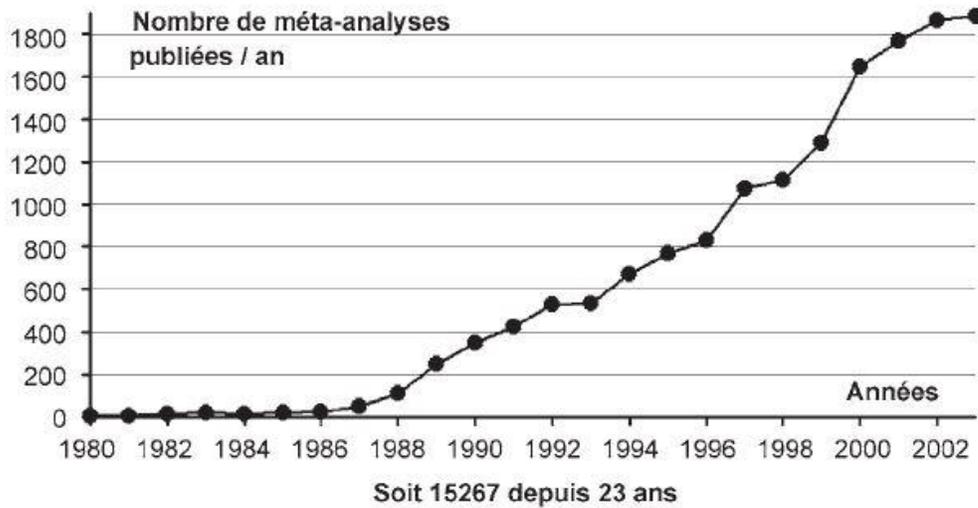


Figure 1-21 Évolution du nombre de méta-analyses au cours des années (tiré de Sauvant et al., 2005).

1.7.2. Étapes d'une méta-analyse

Plusieurs étapes définissent la bonne pratique d'une méta-analyse (Figure 1-22). La rigueur des démarches est nécessaire pour réaliser une méta-analyse de qualité (Sauvant et al., 2005).

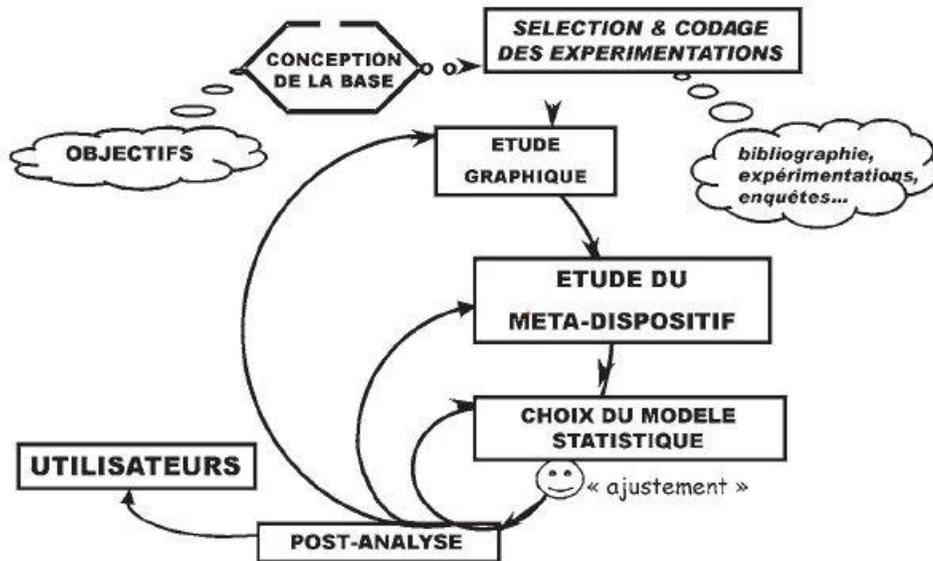


Figure 1-22 Principales étapes d'une méta-analyse (tiré de Sauviant et al., 2005).

1.7.2.1. Caractérisation de l'objectif de l'étude de méta-analyse

Caractériser et clarifier l'objectif de la méta-analyse est une première étape à réaliser. En fait, c'est connaître la problématique qui va permettre l'avancement de la méta-analyse et la définition des étapes suivantes (Sauviant et al., 2005). Dans la présente étude, l'objectif général était d'étudier l'effet de la phytase sur la DIA des AA chez le porc et le poulet ainsi que l'effet de la xylanase sur la DIA des AA et sur le contenu en EMA chez le poulet. Dans une méta-analyse, la problématique pourra évoluer suite aux premiers résultats trouvés et en fonction des données disponibles.

1.7.2.2. Recherche bibliographique et constitution de la base de données

Suite à la définition de l'objectif, la seconde étape de la méta-analyse consiste à rassembler d'une façon exhaustive toutes les études publiées cohérentes avec les objectifs du travail (Sauviant et al., 2005). Dans le présent travail, il faudra rassembler toutes les publications

traitant l'effet de la phytase sur la DIA des AA chez le porc et le poulet et l'effet de la xylanase sur la DIA des AA et sur le contenu en EMA chez le poulet, en constituant trois bases de données : l'une pour le porc (enzyme étudiée : phytase) et deux pour le poulet (enzymes étudiées : phytase et xylanase).

1.7.2.3. Sélection des publications

Cette sélection consiste à s'assurer que la publication est cohérente avec les objectifs prédéfinis de la méta-analyse. Dans cette thèse, il faudra s'assurer que les publications scientifiques contiennent les coefficients de digestibilités iléales des AA mesurés sous l'effet des actions de la phytase et de la xylanase et des valeurs de l'EMA sous l'effet de la xylanase. Si la publication est considérée comme « recevable », on pourra transférer ses données avec prudence dans la base de données (Sauvant et al., 2005).

1.7.2.4. Codage des données

C'est une étape essentielle et importante de la méta-analyse. Elle consiste à coder d'abord les publications présentes dans la base de données. Ensuite il s'agit de coder précisément à l'intérieur de chaque expérience les paramètres à étudier (Sauvant et al., 2005).

1.7.2.5. L'étude du méta-dispositif expérimental

a. L'étude graphique des données

C'est une phase essentielle de la méta-analyse. La visualisation graphique permet d'avoir une première idée globale sur le degré d'hétérogénéité des données et de s'assurer de la cohérence des données en détectant « les valeurs aberrantes » (Sauvant et al., 2005).

b. Statistiques descriptives

Afin de décrire d'une façon « synthétique et parlante » les données, les variables quantitatives doivent être décrites à l'aide de statistiques descriptives : moyenne, écart-type, minimum, maximum (Loncke, 2009).

c. Corrélation entre variables

On distingue deux types de corrélation : la corrélation classique (interétudes) qui permet d'établir l'existence d'un lien entre les deux variables (X et Y) et de mesurer l'intensité de la liaison entre ces deux variables qui peuvent être issues de la même étude. Cette corrélation donne une idée sur la dispersion globale des données. Pour la corrélation en intraétudes, elle est testée par un modèle GLM afin d'inclure l'effet publication et ainsi elle permet de tester la liaison entre les variables (X et Y) tout en sachant que certains résultats proviennent de la même étude (Sauvant et al., 2005).

1.7.2.6. Le choix du modèle statistique

Choisir le modèle statistique revient au mode de prise en compte de l'effet étude : fixe ou aléatoire. Dans le cas où l'effet étude est choisi comme étant fixe, on considère que chaque étude est issue d'une population particulière. Dans le cas contraire où l'effet étude est choisi comme aléatoire, on considère que chaque étude constitue un échantillon pris au hasard d'une population unique (Sauvant et al., 2005). Dans notre analyse, l'effet étude a été considéré comme étant aléatoire. En fait une grande diversité au niveau des méthodologies existe entre les publications scientifiques, ce qui influe sur les données : effet lié aux publications.

Le modèle statistique de base est donc le modèle général de variance covariance sous la forme suivante :

$$Y_{ij} = \mu + \mu_i + \beta X_{ij} + \beta_i X_{ij} + e_{ij} \quad \text{avec :}$$

i : indice de l'étude
 j : indice du traitement
 Y_{ij} : variable expliquée
 X_{ij} : variable explicative
 e_{ij} : erreur résiduelle

μ_i : effet fixe de l'étude i sur l'ordonnée à l'origine
 β : coefficient général fixe de régression
 β_i : effet fixe de l'étude i sur la pente
 μ : l'ordonnée générale fixe à l'origine

Des relations autres que linéaires peuvent exister entre les variables X et Y. Pour le modèle quadratique, la forme est la suivante :

$$Y_{ij} = \mu + \mu_i + \beta_1 X_{ij} + \beta_{1i} X_{ij} + \beta_2 X_{ij}^2 + \beta_{2i} X_{ij}^2 + e_{ij}$$

1.7.2.7. Étude des facteurs interférents

Cette étape a pour objectif la vérification de la stabilité du modèle par la détection d'autres variables qui sont susceptibles de moduler la réponse de la variable expliquée à un traitement. Ces variables peuvent être à la fois quantitatives ou qualitatives. Pour étudier ces facteurs interférents, il faut regarder leurs influences sur les pentes individuelles, sur les moyennes des moindres carrés et sur les résidus du modèle (Sauvant et al., 2005).

1.7.2.8. Les post analyses

Les démarches post analytiques sont nécessaires pour connaître les limites de l'analyse effectuée et pour savoir s'il est nécessaire d'effectuer d'autres analyses complémentaires. La répartition des résidus doit suivre une loi normale, ce qui peut être testé par le test de Chi², de Shapiro-Wilk et la méthode de graphiques (QQplot). Le calcul des résidus «studentisés» permet de repérer les données aberrantes. En effet, les résidus trop grands qui sont exclus de l'intervalle [-2 ; 2] peuvent identifier une donnée influente sur la variable dépendante Y. Pour

supprimer une donnée aberrante, il faut faire attention aux conséquences sur le jeu de données et sur les paramètres du modèle, et il faut posséder également une explication concernant la présence de telle valeur aberrante (Sauvant et al., 2005). Le calcul des effets de levier et des distances de Cook permet de déterminer le poids des divers traitements dans la détermination des paramètres du modèle statistique en détectant la présence de valeurs influentes sur la variable explicative X. Ainsi, les traitements qui sont trop influents peuvent être retirés du modèle, mais il faut tester l'impact de ce retrait sur le modèle (Sauvant et al., 2005).

1.7.2.9. Évaluation du modèle

Cette étape finale est indispensable, tout modèle construit nécessite une évaluation qui permet de s'assurer de sa pertinence et d'un risque d'erreur minimum dans la prédiction des valeurs observées. En fait, une validation du modèle nécessite des données externes (Steyerberg et al., 2001). Dans le présent travail, la validation externe n'était pas possible vu que toutes les données récoltées ont été utilisées pour générer les modèles. Ainsi, une évaluation interne a été réalisée par des analyses GLM incluant l'effet publication afin de comparer les valeurs de Y observées (Yobs, en variable expliquée) aux valeurs de Y prédites (Ypred, en variable explicative). Ensuite, la vérification de l'absence de biais est établie si la valeur de l'ordonnée à l'origine de cette analyse GLM était non différente de 0, si la pente était non significativement différente de 1, si le RMSE n'était pas trop élevé et si le R^2 était élevé (Loncke, 2009). Dans notre étude une validation croisée sera réalisée comme validation interne. Dans ce type de validation, il s'agit de segmenter l'échantillon de base en deux ou plusieurs échantillons (p) selon la méthode choisie (tests et validation ou holdout method, k-fold cross-validation et leave-one-out cross-validation). Pour résumer, un des k échantillons de base est utilisé pour l'établissement du modèle et les (p-1) autres échantillons seront utilisés pour la validation de l'échantillon testé (Messad, 2016).

1.7.3. Limites et contraintes de la méta-analyse

En dépit des avantages de la méta-analyse déjà cités, cette méthode possède également des contraintes qui limitent l'analyse des données. D'une part, la méta-analyse combine des résultats provenant d'un grand nombre d'études ce qui rend difficile l'interprétation des données. D'autre part, la qualité des études pourrait affecter la méta-analyse. En fait, Wolf (1986) (cité par St-Amand et Saint-Jacques, 2013), rappelle qu'il y a des études qui démontrent que plus la méthodologie est solide est plus les grandeurs d'effet sont faibles alors que d'autres études ne démontrent pas cette relation entre la qualité de la méthodologie et les grandeurs d'effet. De plus, les études utilisées dans les méta-analyses sont majoritairement publiées d'où l'échantillon utilisé pourrait être non représentatif de l'ensemble des données utilisé dans la résolution d'une question de recherche. Mais encore, le manque de variabilité intraétude des données imposée en raison des designs expérimentaux constitue une autre contrainte de la méta-analyse (Sauvant et al., 2008), limitant l'étude des interactions entre les variables dans la base de données.

1.7.4. Conclusions et objectifs

Les monogastriques, porcs et poulets, transforment les aliments en produits animaux disponibles pour l'alimentation humaine. Au Québec, en 2015, la production porcine était la deuxième production la plus importante après la production laitière et a généré 1,32 milliard \$, ce qui représente 25 % des recettes monétaires générées par les productions animales au Québec (CDPQ, 2016). Quant à la production totale de poulets au Canada, elle a enregistré une augmentation annuelle de 1,7% entre 1999 et 2009 (Dallaire et al., 2011). Entre 2013 et 2014, cette production a enregistré une hausse de 1,8% au Canada et 2,3% au Québec. Au Canada, la production de poulets a atteint 2 milliards de kilogrammes en 2016 dont 61% provenaient du Québec et de l'Ontario (AAC, 2018). L'alimentation constitue le poste le plus coûteux dans l'élevage des monogastriques. Dans l'élevage des porcs, les coûts d'alimentation représentent

à eux seuls plus de 60 % du coût de production d'un porc (CDPQ, 2015). Pour réduire les coûts d'alimentation, il faut savoir maîtriser l'efficacité d'utilisation des ingrédients. Les additifs alimentaires, dont les enzymes, permettent d'améliorer l'efficacité nutritionnelle des régimes alimentaires. Les enzymes exogènes ciblent d'une manière spécifique les facteurs antinutritionnels présents dans l'aliment permettant aux porcs et aux poulets une bonne assimilation des nutriments, d'où une amélioration de l'efficacité alimentaire. Selon Bedford et Cowieson (2012), les deux principaux avantages de l'introduction des enzymes sont d'une part, la diminution de la variation de la qualité des aliments entre les meilleurs et les mauvais grains et d'autre part, la teneur moyenne en éléments nutritifs est clairement améliorée par comparaison aux aliments sans enzyme. De ce fait, les enzymes pourraient constituer un élément principal à considérer par les nutritionnistes afin d'assurer une bonne alimentation avec une teneur en éléments nutritifs bien équilibrés couvrant les besoins des animaux pour la production et l'entretien (Bedford et Cowieson, 2012). Parmi les enzymes les plus utilisées dans l'alimentation des porcs et des poulets, on trouve la phytase et les carbohydrases dont la xylanase. Ces deux dernières agissent positivement sur la digestibilité des AA par l'élimination des substances anti-nutritionnelles abondantes dans les aliments des monogastriques.

Les facteurs antinutritionnels sont abondants dans l'alimentation des porcs et des poulets, en particulier les phytates et les PNA. L'incorporation de la phytase microbienne comme enzyme dans les régimes alimentaires des porcs et des poulets constitue une solution efficace pour réduire l'ajout de P minéral, ce qui contribue positivement et directement à la protection de l'environnement. En parallèle, la réduction de l'impact négatif de ces phytates sur la digestibilité des protéines et des AA a pu être mise en évidence. De même, les PNA sont indigestibles et résistants aux enzymes endogènes et affectent la digestibilité des constituants intracellulaires des graines ce qui diminue la digestibilité des AA (Simon, 1998) et de l'énergie (Hew et al., 1998). Ainsi l'apport de carbohydrases, dont la xylanase pourrait améliorer la digestibilité des PNA et celles des AA et de l'énergie.

À cet égard, il est d'une grande importance de connaître le rôle des enzymes exogènes dans l'élimination des facteurs antinutritionnels et leurs actions vis-à-vis la digestibilité des AA sachant que plusieurs études ont été réalisées et apportent de multiples résultats et explications possibles. De ce fait, pour mieux illustrer la relation entre les deux composantes : enzymes

exogènes et digestibilité des AA, des analyses par méta-analyses sont nécessaires. Le but principal de ces méta-analyses est de développer des équations de prédiction de la valeur nutritive en AA digestibles des régimes alimentaires des porcs et des poulets suite à l'ajout de la phytase. Le second but consiste à développer des équations de prédiction de la valeur nutritive en AA digestibles et du contenu en EMA des aliments pour poulets sous l'action de la xylanase (Figure 1-23).

L'approche par des méta-analyses permettra également de mieux comprendre et éclaircir l'effet de la phytase sur la digestibilité des AA chez le porc et le poulet ainsi que l'effet de la xylanase sur la digestibilité des AA et le contenu en EMA chez le poulet. En conséquence, à partir de bases de données établies en se basant sur l'ajout ou non de la phytase et de la xylanase, il sera possible de prédire la digestibilité des AA des ingrédients chez le porc et le poulet ainsi que de prédire le contenu en EMA chez le poulet, permettant ainsi de tenir en compte de cette variabilité dans la formulation des rations en alimentation porcine et avicole.

- Prédiction de la digestibilité iléale des AA chez le porc et le poulet sous l'action de la phytase.
- Prédiction de la digestibilité iléale des AA et du contenu en EMA chez le poulet sous l'action de la xylanase.



Mieux connaître les valeurs nutritives en AA et en EMA des régimes alimentaires sous l'effet des enzymes exogènes.



Effets directs :

- Formulation plus précise des rations en alimentation porcine et avicole.
- Réduction des coûts de l'alimentation.

Effets indirects :

- Diminution des effluents d'élevage dans l'environnement.

Figure 1-23 Représentation schématisée des objectifs et défis du projet de recherche proposé.

Bibliographie

- Adeola, O., Sands, J., 2003. Does supplemental dietary microbial phytase improve amino acid utilization? A perspective that it does not. *Journal of Animal Science*. 81, 78-85.
- Agriculture et Agroalimentaire Canada (AAC). 2018. <http://www.agr.gc.ca/fra/industrie-marches-et-commerce/information-sur-les-marches-par-secteur/volaille-et-ufs/information-sur-le-marche-de-la-volaille-et-des-oeufs-industrie-canadienne/poulet/?id=1384971854392> (Page consulté le 26 juin 2018).
- Amipig, 2000. Digestibilités iléales standardisées des acides aminés des matières premières chez le porc. Aventis Animal Nutrition, INRA – UMRVP.
- Angel, R., Tamim, N., Applegate, T., Dhandu, A., Ellestad, L., 2002. Phytic acid chemistry: influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. *Journal of Applied Poultry Research*. 11, 471-480.
- Angkanaporn, K., Choct, M., Bryden, W.L., Annison, E.F., Annison, G., 1994. Effects of wheat pentosans on endogenous amino acid losses in chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 66, 399-404.
- Annison, G., 1992. Commercial enzyme supplementation of wheat based diets raises ileal glycanase activities and improves apparent metabolisable energy, starch and pentosan digestibilities in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*. 38, 105-121.
- Awad, E.A., Zulkifli, I., Farjam, A.S., Chwen, L.T., Hossain, M.A., Aljuobori, A., 2016. Effect of low-protein diet, gender and age on the apparent ileal amino acid digestibility in broiler chickens raised under hot-humid tropical condition. *Indian Journal of Animal Sciences*. 86, 696-701.
- Baker, D.H., Han, Y., 1994. Ideal amino acid profile for chicks during the first three weeks posthatching. *Poultry Science*. 73, 1441-1447.
- Barnett, B.J., Clarke, W.A., Batterham, E.S., 1993. Has phytase a proteolytic effect in diets for weaner pigs. *Manipulating Pig Production* .p. 227.
- Barrier-Guillot, B., Casado, P., Maupetit, P., Jondreville, C., Gatel, F., Larbier, M., 1996. Wheat Phosphorus Availability: 2—In vivo Study in broilers and pigs; Relationship with endogenous phytasic activity and phytic phosphorus content in wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 70, 69-74.
- Batterham, E.S., 1992. Availability and utilization of amino acids for growing pigs. *Nutrition Research Reviews*. 5, 1-18.
- Beckers, Y., Piron, F. Utilisation des enzymes exogènes en alimentation porcine et avicole. Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège.
- Bedford, M. R., Classen, H. L., 1992. Reduction of intestinal viscosity through manipulation of dietary rye and pentosanase concentration is effected through changes in the carbohydrate composition of the intestinal aqueous phase and results in improved growth rate and food conversion efficiency of broiler chicks. *The Journal of Nutrition*. 122, 560-569.
- Bedford, M. R., Cowieson, A. J., 2012. Exogenous enzymes and their effects on intestinal microbiology. *Animal Feed Science and Technology*. 173, 76-85.

- Bedford, M. R., Walk, C. L., Masey O'Neill, H. V., 2015. Assessing measurements in feed enzyme research: Phytase evaluations in broilers. *The Journal of Applied Poultry Research*. 25, 305-314.
- Bedford, M.R., 2000. Exogenous enzymes in monogastric nutrition—their current value and future benefits. *Animal Feed Science and Technology*. 86, 1-13.
- Bedford, M.R., Classen, H.L., 1992. Reduction of intestinal viscosity through manipulation of dietary rye and pentosanase concentration is effected through changes in the carbohydrate composition of the intestinal aqueous phase and results in improved growth rate and food conversion efficiency of broiler chicks. *The Journal of Nutrition*. 122, 560-569.
- Bedford, M.R., Cowieson, A.J., 2012. Exogenous enzymes and their effects on intestinal microbiology. *Animal Feed Science and Technology*. 173, 76-85.
- Bedford, M.R., Partridge, G.G., 2001. *Enzymes in farm animal nutrition*. Centre for Agricultural Bioscience International.
- Bedford, M.R., Scott, T., Silversides, F., Classen, H., Swift, M., Pack, M., 1998. The effect of wheat cultivar, growing environment, and enzyme supplementation on digestibility of amino acids by broilers. *Canadian Journal of Animal Science*. 78, 335-342.
- Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G., 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied microbiology and biotechnology*. 56, 326-338.
- Besson, L.A., 2015. An investigation of the health promoting modes of action of regular- and super- doses of phytase. (Unpublished doctoral thesis). School of Veterinary, Medical and Life Sciences. University of Glasgow.
- Blum, J.C., Leclercq, B., Henry, Y., Perez, J., Larbier, M., Sauveur, B., Seve, B., Lebas, F., Stevens, P., Bourdon, D., 1989. *L'alimentation des animaux monogastriques : porc, lapin, volailles*. Éditions Quae.
- Bruce, J., Sundstøl, F., 1995. The effect of microbial phytase in diets for pigs on apparent ileal and faecal digestibility, pH and flow of digesta measurements in growing pigs fed a high-fibre diet. *Canadian Journal of Animal Science*. 75, 121-127.
- Cabahug, S., Ravindran, V., Selle, P.H., Bryden, W.L., 1999. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus contents. I. Effects on bird performance and toe ash. *British Poultry Science*. 40, 660-666.
- Cadogan, D.J., Choct, M., 2015. Pattern of non-starch polysaccharide digestion along the gut of the pig: Contribution to available energy. *Animal Nutrition*. 1, 160-165.
- Carré, B., 2004. Causes for variation in digestibility of starch among feedstuffs. *World's Poultry Science Journal*. 60, 76-89.
- Carré, B., Gomez, J., Melcion, J., Giboulot, B., 1994. La viscosité des aliments destinés à l'aviculture. Utilisation pour prédire la consommation et l'excrétion d'eau. *INRA Productions Animales*. 7, 369-379.
- Centeno, C., Arija, I., Viveros, A., Brenes, A., 2007. Effects of citric acid and microbial phytase on amino acid digestibility in broiler chickens. *British Poultry Science*. 48, 469-479.
- Centre de développement du porc du Québec (CDPQ) .2015. <http://www.cdpq.ca/default.aspx>. (Page consultée le 6 juin 2018).

- Centre de développement du porc du Québec (CDPQ) .2016. <http://www.cdpq.ca/default.aspx>. (Page consultée le 6 juin 2018).
- Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P.L., Srivastava, A.K., 2016. Bacterial xylanases: biology to biotechnology. 3 Biotech 6. 150.
- Chesson, A., 1993. Feed enzymes. *Animal Feed Science and Technology*. 45, 65-79.
- Conde-Aguilera, J. A., Le Floc'h, N., Le Huërou-Luron, I., Mercier, Y., Tesseraud, S., Lefaucheur, L., van Milgen, J., 2016a. Splanchnic tissues respond differently when piglets are offered a diet 30% deficient in total sulfur amino acid for 10 days. *European journal of nutrition*. 55, 2209-2219.
- Conde-Aguilera, J. A., Lefaucheur, L., Tesseraud, S., Mercier, Y., Le Floc'h, N., van Milgen, J., 2016b. Skeletal muscles respond differently when piglets are offered a diet 30% deficient in total sulfur amino acid for 10 days. *European journal of nutrition*. 55, 117-126.
- Cosgrove, D.J., 1966. The chemistry and biochemistry of inositol polyphosphates. *Reviews of pure and applied chemistry*. 16, 209-224.
- Costello, A.J., Glonek, T., Myers, T.C., 1976. Nuclear magnetic resonance-pH titrations of myo-inositol hexaphosphate. *Carbohydrate Research*. 46, 159-171.
- Cowieson, A. J., Wilcock, P., Bedford, M. R., 2011. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. *World's Poultry Science Journal*. 67, 225-236.
- Cowieson, A., Acamovic, T., Bedford, M., 2006. Supplementation of corn–soy-based diets with an *Escherichia coli*-derived phytase: effects on broiler chick performance and the digestibility of amino acids and metabolizability of minerals and energy. *Poultry Science*. 85, 1389-1397.
- Cowieson, A.J., Acamovic, T., Bedford, M.R., 2004. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. *British Poultry Science*. 45, 101-108.
- Cowieson, A.J., Bedford, M., 2009. The effect of phytase and carbohydrase on ileal amino acid digestibility in monogastric diets: complimentary mode of action? *World's Poultry Science Journal*. 65, 609-624.
- Cowieson, A.J., Fru-Nji, F., Adeola, O., 2014. Dietary phosphate equivalence of four forms of Pi contrasted with a novel microbial phytase from *Citrobacter braakii* in broiler chickens. *Animal Production Science*. 55, 1145-1151.
- Cowieson, A.J., Ravindran, V., 2007. Effect of phytic acid and microbial phytase on the flow and amino acid composition of endogenous protein at the terminal ileum of growing broiler chickens. *British Journal of Nutrition*. 98, 745-752.
- Cowieson, A.J., Ruckebusch, J., Knap, I., Guggenbuhl, P., Fru-Nji, F., 2016. Phytate-free nutrition: A new paradigm in monogastric animal production. *Animal Feed Science and Technology*. 222, 180-189.
- Cowieson, A.J., Ruckebusch, J., Sorbara, J., Wilson, J., Guggenbuhl, P., Roos, F., 2017. A systematic view on the effect of phytase on ileal amino acid digestibility in broilers. *Animal Feed Science and Technology*. 225, 182–194.
- Crevieu-Gabriel, I., 1999. Digestion des protéines végétales chez les monogastriques. Exemple des protéines de pois. *INRA Productions Animales*. 12, 147-161.
- Cunningham, H. M., Friend, D. W., Nicholson, J. W. G., 1962. Note on a re-entrant fistula for digestion studies with pigs. *Canadian Journal of Animal Science*. 42, 112-113.

- Dallaire, P., Poiré, A., 2011. Monographie de l'industrie de la volaille au Québec. Agriculture, Pêche et alimentation.
- Darragh, A.J., Moughan, P.J., Smith, W.C., 1990. The effect of amino acid and peptide alimentation on the determination of endogenous amino acid flow at the terminal ileum of the rat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 51, 47-56.
- De Lange, C., Sauer, W., Souffrant, W., 1989. The effect of protein status of the pig on the recovery and amino acid composition of endogenous protein in digesta collected from the distal ileum. *Journal of Animal Science*. 67, 755-762.
- Debicki-Garnier, A.M., Messenger, B., Plumstead, P., 2014. Effet de l'addition de xylanase et de phytase sur la digestibilité de l'énergie et des nutriments chez des porcs en croissance nourris avec des aliments à base de maïs et contenant 20% de drèches de maïs. *Journées Recherche Porcine*. 46, 121-122.
- Dersjant-Li, Y., Awati, A., Schulze, H., Partridge, G., 2015. Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 95, 878-896.
- Düngelhof, M., Rodehutschord, M., Spiekens, H., Pfeffer, E., 1994. Effects of supplemental microbial phytase on availability of phosphorus contained in maize, wheat and triticale to pigs. *Journal of Animal Science and Technology*. 49, 1-10.
- Eeckhout, W., De Paepe, M., 1994. Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology*. 47, 19-29.
- Fan, M., Sauer, W., Hardin, R., Lien, K., 1994. Determination of apparent ileal amino acid digestibility in pigs: effect of dietary amino acid level. *Journal of Animal Science*. 72, 2851-2859.
- Fan, M., Sauer, W., McBurney, M., 1995. Estimation by regression analysis of endogenous amino acid levels in digesta collected from the distal ileum of pigs. *Journal of Animal Science*. 73, 2319-2328.
- Favero, A., Ragland, D., Vieira, S. L., Owusu-Asiedu, A., Adeola, O., 2014. Digestibility marker and ileal amino acid digestibility in phytase-supplemented soybean or canola meals for growing pig. *Journal of Animal Science*. 92, 5583-5592.
- Flores, C., Williams, M., Smith, K., Pieniazek, J., Latham, R., Wang, J., Tyus, J., Lee, J., 2017. Evaluation of a thermotolerant xylanase on broiler growth performance and dietary ileal digestible energy value. *The Journal of Applied Poultry Research*. 26, 60-71.
- Fuller, M. F., Cadenhead, A., 1991. Effect of the amount and composition of the diet on galactosamine flow from the small intestine. *Proceedings of the Vth international symposium on digestive physiology in pigs*. p. 330-333.
- Fuller, M. F., Livingstone, R. M., 1982. Annual report of studies in Animal Nutrition and Allied Sciences. Rowett Research Institute. p. 39.
- Furuya, S., Kaji, Y., 1989. Estimation of the true ileal digestibility of amino acids and nitrogen from their apparent values for growing pigs. *Animal Feed Science and Technology*. 26, 271-285.
- Furuya, S., Kaji, Y., 1992. The effects of feed intake and purified cellulose on the endogenous ileal amino acid flow in growing pigs. *British Journal of Nutrition*. 68, 463-472.
- Gebruers, K., Dornez, E., Bedo, Z., Rakszegi, M., Courtin, C.M., Delcour, J.A., 2010. Variability in xylanase and xylanase inhibition activities in different cereals in the HEALTHGRAIN diversity screen and contribution of environment and genotype to

- this variability in common wheat. *Journal of agricultural and food chemistry*. 58, 9362-9371.
- Gloaguen, M., Le Floch, N., Van Milgen, J., 2013. Couverture des besoins en acides aminés chez le porcelet alimenté avec des régimes à basse teneur en protéines. *INRA Productions Animales*. 26, 277-288.
- Guillaume, J., 1999. *Nutrition et alimentation des poissons et crustacés*. Editions Quae.
- Harland, B.F., Morris, E.R., 1995. Phytate: a good or a bad food component? *Nutrition Research* .15, 733-754.
- Hew, L., Ravindran, V., Mollah, Y., Bryden, W., 1998. Influence of exogenous xylanase supplementation on apparent metabolisable energy and amino acid digestibility in wheat for broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*. 75, 83-92.
- Johnson, R.J., 1992. Principles, problems and application of amino acid digestibility in poultry. *World's Poultry Science Journal*. 48, 232-246.
- Johnston, S. L., Williams, S. B., Southern, L. L., Bidner, T. D., Bunting, L. D., Matthews, J. O., Olcott, B. M., 2004. Effect of phytase addition and dietary calcium and phosphorus levels on plasma metabolites and ileal and total-tract nutrient digestibility in pigs. *Journal of Animal Science*, 82, 705-714.
- Jongbloed, A., Kemme, P., 1990. Effect of pelleting mixed feeds on phytase activity and the apparent absorbability of phosphorus and calcium in pigs. *Animal Feed Science and Technology*. 28, 233-242.
- Kemme, P., Jongbloed, A., Van der Klis, J., 1997. The impact of microbial phytase on the nutrition of monogástric and the environment. *Feed manufacturing in Southern Europe-CIHEAM-IAMZ, New challenges, Zaragoza*. 26, 135-147.
- Kiarie, E., Walsh, M., Romero, L., Arent, S., Ravindran, V., 2017. Nutrient and fiber utilization responses of supplemental xylanase in broiler chickens fed wheat based diets are independent of the adaptation period to test diets². *Poultry Science*. 96, 3239-3245.
- Kies, A. K., Van Hemert, K. H. F., Sauer, W. C., 2001. Effect of phytase on protein and amino acid digestibility and energy utilisation. *World's Poultry Science Journal*. 57, 109-126.
- Kies, A., Kemme, P., Šebek, L., Van Diepen, J.T.M., Jongbloed, A., 2006a. Effect of graded doses and a high dose of microbial phytase on the digestibility of various minerals in weaner pigs. *Journal of Animal Science*. 84, 1169-1175.
- Kies, A.K., De Jonge, L.H., Kemme, P.A., Jongbloed, A.W., 2006b. Interaction between protein, phytate, and microbial phytase. In vitro studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 1753-1758.
- Lemme, A., Ravindran, V., Bryden, W.L., 2004. Ileal digestibility of amino acids in feed ingredients for broilers. *World's Poultry Science Journal*. 60, 423-438.
- Leterme, P., Thewis, A., 1995. La digestibilité iléale réelle des acides aminés chez le porc méthodes d'estimation et intérêt pratique. 27èmes Journées de la Recherche Porcine en France, 197-208.
- Létourneau-Montminy, M. P., Narcy, A., 2011. Méta-analyse de l'utilisation digestive et métabolique du P chez le porc en croissance : effet de l'apport alimentaire de phosphore, de calcium et de phytase. *Porcine*. 43, 127-128.
- Létourneau-Montminy, M. P., Narcy, A., Lescoat, P., Bernier, J. F., Magnin, M., Pomar, C., Nys, Y., Sauvart, D., Jondreville, C., 2010. Meta-analysis of phosphorus utilisation by

- broilers receiving corn-soyabean meal diets: influence of dietary calcium and microbial phytase. *Animal*. 4, 1844-1853.
- Liao, S., Kies, A., Sauer, W., Zhang, Y., Cervantes, M., He, J., 2005. Effect of phytase supplementation to a low-and a high-phytate diet for growing pigs on the digestibilities of crude protein, amino acids, and energy. *Journal of Animal Science*. 83, 2130-2136.
- Loncke, C., 2009. Modélisation des relations entre l'alimentation et les flux splanchniques de nutriments énergétiques chez le ruminant. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Thèse de Doctorat, Agro Paris Tech. France.
- Low, A. G., 1980. Nutrient absorption in pigs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 31, 1087-1130.
- Low, A., 1982. Digestibility and availability of amino acids from feedstuffs for pigs: a review. *Livestock Production Science*. 9, 511-520.
- Maenz, D.D., Engele-Schaan, C.M., Newkirk, R.W., Classen, H.L., 1999. The effect of minerals and mineral chelators on the formation of phytase-resistant and phytase-susceptible forms of phytic acid in solution and in a slurry of canola meal. *Animal Feed Science and Technology*. 81, 177-192.
- Maga, J.A., 1982. Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 30, 1-9.
- Martinez-Amezcuca, C., Parsons, C. M., Baker, D. H., 2006. Effect of microbial phytase and citric acid on phosphorus bioavailability, apparent metabolizable energy, and amino acid digestibility in distillers dried grains with solubles in chicks. *Poultry Science*. 85, 470-475.
- Mertz, E.T., Beeson, W.M., Jackson, H.D., 1952. Classification of essential amino acids for the weanling pig. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 38, 121-128.
- Messad, F., 2016. Prédiction de la digestibilité des acides aminés des ingrédients utilisés en alimentation porcine : approche par méta-analyse. Thèse de Doctorat, Université Laval, Canada.
- Morgan, N., Walk, C., Bedford, M., Burton, E., 2015. Contribution of intestinal-and cereal-derived phytase activity on phytate degradation in young broilers. *Poultry Science*. 94, 1577-1583.
- Motta, F., Andrade, C., Santana, M., 2013. A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass-Techniques, Applications and Commercialization*. Intech.
- Nagashima, T., Tange, T., Anazawa, H., 1999. Dephosphorylation of Phytate by Using the *Aspergillus niger* Phytase with a High Affinity for Phytate. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 4682-4684.
- Namkung, H., Leeson, S., 1999. Effect of phytase enzyme on dietary nitrogen-corrected apparent metabolizable energy and the ileal digestibility of nitrogen and amino acids in broiler chicks. *Poultry Science*. 78, 1317-1319.
- Nâsi M., 1990. Microbial phytase supplementation for improving availability of plant phosphorus in the diet of the growing pigs. *Journal of Agricultural Science*. 162, 435-443.

- Nelson, T. S., Shieh, T. R., Wodzinski, R. J., Ware, J. H., 1968. The availability of phytate phosphorus in soybean meal before and after treatment with a mold phytase. *Poultry Science*. 47, 1842-1848.
- Nitrayová, S., Patras, P., Sommer, A., Heger, J., 2006. Effect of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of phosphorus-adequate diets in growing pigs. *Archives of Animal Nutrition*. 60, 131-140.
- NRC, 1994. *Nutrient Requirements of Poultry: Ninth Revised Edition*.
- Nyachoti, C., Lange, C.d., McBride, B., Schulze, H., 1997. Significance of endogenous gut nitrogen losses in the nutrition of growing pigs: a review. *Canadian Journal of Animal Science*. 77, 149-163.
- Parkkonen, T., Tervilä-Wilo, A., Hopekoski-Nurminen, M., Morgan, A., Poutanen, K., Autio, K., 1997. Changes in wheat micro structure following in vitro digestion. *Acta Agriculturae Scandinavica B—Plant Soil Sciences*. 47, 43-47.
- Parra, M.A.M., 2001. Les phytases : structure, caractérisation et applications. 123 bio.net. *Biologie et Recherche*. Université de Genève, Faculté des Sciences, Département de Chimie Organique.
- Plumstead, P. W., 2015. *Winning with phytase*. Department of Animal and Wildlife Sciences, University of Pretoria, SA.
- Pointillart, A., 1994. Phytates, phytases : leur importance dans l'alimentation des monogastriques. *INRA Productions Animales*. 7, 29-39.
- Pontoppidan, K., Glitsoe, V., Guggenbuhl, P., Quintana, A.P., Nunes, C.S., Pettersson, D., Sandberg, A.S., 2012. In vitro and in vivo degradation of myo-inositol hexakisphosphate by a phytase from *Citrobacter braakii*. *Archives of Animal Nutrition*. 66, 431-444.
- Qian, H., Kornegay, E. T., Denbow, D. M., 1997. Utilization of phytate phosphorus and calcium as influenced by microbial phytase, cholecalciferol, and the calcium: total phosphorus ratio in broiler diets. *Poultry Science*. 76, 37-46.
- Quentin, M., Bouvarel, I., Bastianelli, D., Picard, M., 2004. Quels «besoins» du poulet de chair en acides aminés essentiels ? Une analyse critique de leur détermination et de quelques outils pratiques de modélisation. *Productions Animales*. 17, 19-34.
- Radcliffe, J., Pleasant, R., Kornegay, E., 2006. Estimating equivalency values of microbial phytase for amino acids in growing and finishing pigs fitted with steered ileo-cecal valve cannulas. *Journal of Animal Science*. 84, 1119-1129.
- Ravindran, V., Bryden, W.L., 1999. Amino acid availability in poultry - in vitro and in vivo measurements. *Australian Journal Agricultural Research*. 50, 889-908.
- Ravindran, V., Cabahug, S., Ravindra, G., Selle, P.H., Bryden, W.L., 2000. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorous levels. II. Effects on apparent metabolisable energy, nutrient digestibility and nutrient retention. *British Poultry Science*. 41, 193-200.
- Ravindran, V., Cabahug, S., Ravindran, G., Bryden, W., 1999a. Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broilers. *Poultry Science*. 78, 699-706.
- Ravindran, V., Morel, P., Partridge, G., Hruby, M., Sands, J., 2006. Influence of an *Escherichia coli*-derived phytase on nutrient utilization in broiler starters fed diets containing varying concentrations of phytic acid. *Poultry Science*. 85, 82-89.

- Ravindran, V., Selle, P., Bryden, W., 1999b. Effects of phytase supplementation, individually and in combination, with glycanase, on the nutritive value of wheat and barley. *Poultry Science*. 78, 1588-1595.
- Rutherford, S. M., Chung, T. K., Thomas, D. V., Zou, M. L., Moughan, P. J., 2012. Effect of a novel phytase on growth performance, apparent metabolizable energy, and the availability of minerals and amino acids in a low-phosphorus corn-soybean meal diet for broilers. *Poultry Science*. 91, 1118-1127.
- Rutherford, S.M., Chung, T.K., Moughan, P.J., 2002. The effect of microbial phytase on ileal phosphorus and amino acid digestibility in the broiler chicken. *British Poultry Science*. 43, 598-606.
- Rutherford, S.M., Chung, T.K., Thomas, D.V., Zou, M.L., Moughan, P.J., 2012. Effect of a novel phytase on growth performance, apparent metabolizable energy, and the availability of minerals and amino acids in a low-phosphorus corn-soybean meal diet for broilers. *Poultry Science*. 91, 1118-1127.
- Sauer, W. C., De Lange, C. F. M., 1992. Novel methods for determining protein and amino acid digestibilities in feedstuffs. *Modern Methods in Protein Nutrition and Metabolism*. p. 87-120.
- Sauer, W.C., Ozimek, L., 1986. Digestibility of amino acids in swine: Results and their practical applications. A review. *Livestock Production Science*. 15, 367-388.
- Sauvant, D., 2005. La modélisation de la réponse des porcs aux pratiques alimentaires et d'élevage. *Journées de la Recherche Porcine*, Paris.
- Sauvant, D., Schmidely, P., Daudin, J.J., 2005. Les méta-analyses des données expérimentales : applications en nutrition animale. *INRA Productions Animales*. 18, 63-73.
- Sauvant, D., Schmidely, P., Daudin, J.J., St-Pierre, N.R., 2008. Meta-analyses of experimental data in animal nutrition. *Animal*. 2, 1203-1214.
- Schulze, H., Van Leeuwen, P., Verstegen, M., Van den Berg, J., 1995. Dietary level and source of neutral detergent fiber and ileal endogenous nitrogen flow in pigs. *Journal of Animal Science*. 73, 441-448.
- Sebastian, S., Touchburn, S. P., Chavez, E. R., 1998. Implications of phytic acid and supplemental microbial phytase in poultry nutrition: a review. *World's Poultry Science Journal*. 54, 27-47.
- Sebastian, S., Touchburn, S., Chavez, E., Lague, P., 1997. Apparent digestibility of protein and amino acids in broiler chickens fed a corn-soybean diet supplemented with microbial phytase. *Poultry Science*. 76, 1760-1769.
- Selle, P., Ravindran, V., Ravindran, G., Pittolo, P., Bryden, W., 2003. Influence of phytase and xylanase supplementation on growth performance and nutrient utilisation of broilers offered wheat-based diets. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*. 16, 394-402.
- Selle, P.H., Cowieson, A.J., Cowieson, N.P., Ravindran, V., 2012. Protein-phytate interactions in pig and poultry nutrition: a reappraisal. *Nutrition Research Reviews*. 25, 1-17.
- Selle, P.H., Cowieson, A.J., Ravindran, V., 2009. Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. *Livestock Science*. 124, 126-141.
- Selle, P.H., Ravindran, V., 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology*. 135, 1-41.

- Selle, P.H., Ravindran, V., 2008. Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. *Livestock Science*. 113, 99-122.
- Selle, P.H., Ravindran, V., Caldwell, A., Bryden, W.L., 2000. Phytate and phytase: consequences for protein utilisation. *Nutrition Research Reviews*. 13, 255-278.
- Shah, N., Atallah, M.T., Mahoney, R.R., Pellett, P.L., 1982. Effect of dietary fiber components on fecal nitrogen excretion and protein utilization in growing rats. *The Journal of Nutrition*. 112, 658-666.
- Sibbald, I., 1987. Estimation of bioavailable amino acids in feedingstuffs for poultry and pigs: a review with emphasis on balance experiments. *Canadian Journal of Animal Science*. 67, 221-300.
- Simon, O., 1998. The mode of action of NSP hydrolysing enzymes in the gastrointestinal tract. *Animal Feed Science and Technology*. 7, 115-123.
- Simons, P., Versteegh, H.A., Jongbloed, A.W., Kemme, P., Slump, P., Bos, K., Wolters, M., Beudeker, R., Verschoor, G., 1990. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. *British Journal of Nutrition*. 64, 525-540.
- Siriwan, P., Bryden, W., Annison, E., 1994. Use of guanidinated dietary protein to measure losses of endogenous amino acids in poultry. *British Journal of Nutrition*. 71, 515-529.
- Slominski, B. A., 2011. Recent advances in research on enzymes for poultry diets. *Poultry Science*. 90, 2013-2023.
- Souffrant, W., 2001. Effect of dietary fibre on ileal digestibility and endogenous nitrogen losses in the pig. *Animal Feed Science and Technology*. 90, 93-102.
- St-Amand, A., Saint-Jacques, M. C., 2013. Comment faire?: une méta-analyse, méthode agrégative de synthèse des connaissances. Université Laval, Faculté des sciences sociales, Centre de recherche sur l'adaptation des jeunes et des familles à risque (JEFAR).
- Stein, H.H., Seve, B., Fuller, M., Moughan, P., De Lange, C., 2007. Invited review: Amino acid bioavailability and digestibility in pig feed ingredients: Terminology and application. *Journal of Animal Science*. 85, 172-180.
- Steyerberg, E. W., Harrell Jr, F. E., Borsboom, G. J., Eijkemans, M. J. C., Vergouwe, Y., Habbema, J. D. F., 2001. Internal validation of predictive models: efficiency of some procedures for logistic regression analysis. *Journal of Clinical Epidemiology*. 54. 774-781.
- Van der Klis, J. D., Versteegh, H. A. J. 1991. Ileal absorption of phosphorus in lightweight white laying hens using microbial phytase and various calcium contents in laying hen feed. Spelderholt publication.563.
- Van Milgen, J., Dourmad, J.Y., 2015. Concept and application of ideal protein for pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 6, 15.
- Vohra, A., Satyanarayana, T., 2003. Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 23, 29-60.
- Wang, L., Newman, R. K., Newman, C. W., Hofer, P. J., 1992. Barley β -glucans alter intestinal viscosity and reduce plasma cholesterol concentrations in chicks. *The Journal of Nutrition*. 122, 2292-2297.
- Wenk, C., 2001. The role of dietary fibre in the digestive physiology of the pig. *Animal Feed Science and Technology*. 90, 21-33.

- White, W. B., Bird, H. R., Sunde, M. L., Marlett, J. A. 1983. Viscosity of B-D-Glucan as a Factor in the Enzymatic Improvement of Barley for Chicks. *Poultry Science*. 62, 853-862.
- Williams, P., 1995. Digestible amino acids for non-ruminant animals: theory and recent challenges. *Animal Feed Science and Technology*. 53, 173-187.
- Woyengo, T. A., Nyachoti, C. M., 2013. Anti-nutritional effects of phytic acid in diets for pigs and poultry—current knowledge and directions for future research. *Canadian Journal of Animal Science*. 93, 9-21.
- Woyengo, T.A., Sands, J.S., Guenter, W., Nyachoti, C.M., 2008. Nutrient digestibility and performance responses of growing pigs fed phytase- and xylanase-supplemented wheat-based diets. *Journal of Animal Science*. 86, 848-857.
- Wu, G., Wu, Z., Dai, Z., Yang, Y., Wang, W., Liu, C., Wang, B., Wang, J., Yin, Y., 2013. Dietary requirements of “nutritionally non-essential amino acids” by animals and humans. *Amino Acids*. 44, 1107-1113.
- Yu, S., Cowieson, A., Gilbert, C., Plumstead, P., Dalgaard, S., 2012. Interactions of phytate and myo-inositol phosphate esters (IP) including IP isomers with dietary protein and iron and inhibition of pepsin. *Journal of Animal Science*. 90, 1824-1832.
- Zeng, Z., Li, Q., Zhao, P., Xu, X., Tian, Q., Wang, H., Pan, L., Yu, S., Piao, X., 2016. A new phytase continuously hydrolyzes phytate and improves amino acid digestibility and mineral balance in growing pigs fed phosphorous-deficient diet. *Journal of Animal Science*. 94, 629-638.
- Zhang, X., Roland, D., McDaniel, G., Rao, S., 1999. Effect of Natuphos phytase supplementation to feed on performance and ileal digestibility of protein and amino acids of broilers. *Poultry Science*. 78, 1567-1572.

Chapitre 2 Prédiction de l'effet de la phytase sur la digestibilité iléale apparente des acides aminés chez le porc : Méta-Analyse

Ce chapitre est présenté sous forme d'article et a été publié dans la revue *Animal Feed Science and Technology* : Zouaoui, M., Létourneau-Montminy, M. P., Guay, F., 2018. Effect of phytase on amino acid digestibility in pig: A meta-analysis. *Animal Feed Science and Technology*. 238, 18-28.

Prediction of the effect of microbial phytase on apparent ileal digestibility of amino acids in pig: A meta-analysis.

M. Zouaoui¹, M.P. Létourneau-Montminy¹, F. Guay^{1†}

¹*Département des sciences animales, Université Laval, Quebec City, Quebec, G1V 0A6, Canada*

Corresponding author: *Frederic Guay*, E-mail: frederic.guay@fsaa.ulaval.ca

Running head: Phytase and amino acid digestibility in pigs

Abbreviations: AID, apparent ileal digestibility; Ca, calcium; NDF, neutral detergent fibre ; P, phosphorus; NRC, National Research Council; R², coefficient of determination, RMSE, root mean square error; RMSEP, root mean square error of prediction.

2.1. Résumé

L'objectif de cette étude était d'estimer l'effet de la phytase sur la digestibilité des acides aminés chez le porc par méta-analyse. La phytase incorporée dans l'alimentation améliore la digestibilité des acides aminés. Les coefficients de digestibilité augmentent d'environ 2% suite à l'incorporation de 500 unités/kg. L'effet positif ($P < 0,05$) était maximal pour 800 unités/kg pour la plupart des acides aminés. La digestibilité augmente linéairement pour l'Arg ($R^2 = 0,99$), His ($R^2 = 0,98$), Ile ($R^2 = 0,97$), Leu ($R^2 = 0,97$), Met ($R^2 = 0,99$), Thr ($R^2 = 0,97$), Phe ($R^2 = 0,98$) et Val ($R^2 = 0,85$), et elle est quadratique pour la Lys ($R^2 = 0,99$) et la Tyr ($R^2 = 0,99$). La concentration en fibre et en acides aminés et la phytase n'interagissent pas ensemble sur la digestibilité iléale des acides aminés. L'étude actuelle a montré que la supplémentation de la phytase affecte positivement la digestibilité iléale apparente des acides aminés chez le porc.

2.2. Abstract

Phytic acid represents about 60% of the phosphorus in plant-based ingredients used in pig feed. It is known to bind to proteins and amino acids and thereby interfere with its digestion. The effectiveness of microbial phytase to improve the digestibility of amino acid in pig feed appears inconsistent. The objective of this study was to estimate the effect of microbial phytase on the digestibility of dietary indispensable amino acids, as a function of dietary crude protein content, amino acid content, calcium, phytic acid, neutral detergent fibre and acid detergent fibre, using a meta-analysis tool. A database derived from 34 papers published between 1994 and 2015 and describing 138 experimental treatments was compiled. Adding microbial phytase to pig feed appears to improve the digestibility of amino acids. Digestibility coefficients increased by about 2 % when feeds contained 500 FTU per kg. The positive effect ($P < 0.05$ or < 0.01) was maximal at 800 FTU/kg for most amino acids except Val and Met (700 FTU/kg) and Phe (900 FTU/kg). Coefficients of determination R^2 varied from 0.83 for Ile to 0.94 for Met. Digestibility increased linearly for Arg ($R^2 = 0.99$), His ($R^2 = 0.98$), Ile ($R^2 = 0.97$), Leu ($R^2 = 0.97$), Met ($R^2 = 0.99$) and Thr ($R^2 = 0.97$) and was quadratic for Lys ($R^2 = 0.99$), Val ($R^2 = 0.85$), Phe ($R^2 = 0.98$) and Tyr ($R^2 = 0.99$) with increasing dietary amino acid concentrations. Although, dietary NDF concentration was negatively associated with amino acid digestibility (variation and P values), fibre and phytase do not interact. The current study showed that microbial phytase supplementation affected positively the apparent ileal digestibility of amino acids and this effect was not modified by other dietary components such as amino acids, calcium, phytic acid and fibre. The current models allow quantifying the effect of microbial phytase on amino acids which is important to use phytase feed enzyme accurately in diet formulation.

Keywords: amino acids, digestibility, phytic acid, phytase, pigs, meta-analysis.

2.3. Introduction

Naturally present in plant tissues, phytic acid (myo-inositol hexaphosphate) is a non-digestible compound that forms complexes with various cations and other nutrients including proteins, lipids and starch (Cosgrove, 1966) and is the principal factor limiting phosphorus availability in animal feeds. The use of microbial phytase and other enzymes to improve digestion and nutrient absorption is a common practice in monogastric livestock production (Cowieson et al., 2014). The first phytases were commercialised in 1990 and within a decade phytases were being added routinely to swine and poultry feeds to break down phytic acid, thereby increasing absorption of phosphorus and reducing its excretion into the environment (Selle and Ravindran, 2008). Phytase used in this manner may be considered as a phosphorus supplement (Selle and Ravindran, 2008; Létourneau-Montminy et al., 2012). In addition to releasing phytate-bound P, phytase counteracts other anti-nutritional properties of phytic acid, in particular its interaction with dietary proteins and amino acids. These interactions are known to decrease the digestibility of proteins and decrease the bioavailability of amino acids (Mroz et al., 1994; Johnston et al., 2004; Adedokun et al., 2015). However, the benefits of adding phytase to livestock feed appear to be inconsistent (Adeola and Sands, 2003). Exactly how phytase improves amino acid digestibility in the animal gut is not clear. Proposed mechanisms include direct release of protein from intrinsic protein-phytate complexes, preventing formation of *de novo* binary and ternary protein-phytate complexes in the digestive tract, and decreasing inhibition of digestive proteases by phytic acid (Selle et al., 2000). In spite of numerous investigations, the factors that determine the outcome of the phytate-phytase interplay in the pig digestive tract remain unclear (Selle et al., 2012).

Meta-analysis is a statistical method of summarizing and quantifying knowledge acquired through examination of published research results (Sauvant et al., 2008). This method appeared suitable for gaining a better understanding of the processes that allow phytase to increase the bioavailability of amino acid in pig feed as previously performed for P (Létourneau-Montminy et al., 2012).

The objective of this study was therefore to quantify the impact of dietary fibre, crude protein and amino acid contents and interactions of divalent cations with phytic acid on the

effectiveness of microbial phytase used to improve protein digestion and amino acid digestibility in pigs.

2.4. Materials and methods

Data collection and coding

Studies of the effect of microbial phytase on feed digestion and utilisation in pigs were retrieved from public databases (e.g. Web of Science, CAB abstracts, Prod INRA and Science Direct) using keywords such as amino acid, phytase, apparent ileal digestibility, pigs and swine. This yielded a dataset derived from 34 publications published between 1994 and 2015 and describing 138 experimental treatments. Seven types of diets were distinguishable: corn-soybean meal, cereal-soybean meal, corn/other protein sources, cereal/other protein sources, cereals, soybean meal, and other protein sources. General information (e.g. author name, date of publication, name of journal, objective of study), qualitative data (e.g. sex, surgical procedure, inert marker used, supplier and source of phytase) and quantitative data (e.g. crude dietary protein, amino acid, Ca, P, phytic acid, acid-detergent fibre, neutral-detergent fibre, plant phytase and microbial phytase) were included. Chromic oxide (CrO_2) was the inert marker of digestibility mentioned most often (80%), whereas titanium dioxide (TiO_2) or acid insoluble ash (AIA) was mentioned in the remaining cases.

The unit FTU refers to the phytase activity that liberates 1 μmol of inorganic P per minute from sodium phytate present in excess at 37°C at pH 5.5. When chemical composition was not provided in the publication, it was calculated from ingredient composition using NRC values (National Research Council, 1998 and 2012). Values were thus calculated for dietary crude protein (11% of cases), amino acids (33%), Ca (28%), P (7%), phytic acid (35%) and both acid-detergent and neutral-detergent fibre (100%). A code was assigned to each publication in the database (Sauvant et al., 2008). Most of the data referred to apparent rather than true or standardised digestibility in the ileum, and then apparent digestibility was used in the analysis.

Data investigation and statistical analysis models

All variables and possible interactions evaluated in the meta-analysis were tested as predictors of feed digestibility in terms of apparent indispensable amino acid digestibility in the pig ileum. Only the significant variables were retained in the models, namely microbial phytase (FTU/kg diet) supplementation, indispensable amino acid content (g/kg diet) and neutral detergent fibre content (g/kg diet). No interaction between the independent variables was found. The apparent digestible indispensable amino acid content was calculated from the indispensable amino acid content of the diet and the apparent digestibility coefficients.

The studies referred to three sources of microbial phytase, namely *Aspergillus Niger*, *Escherichia coli* and *Peniophora lycii*. Particular attention was paid to the meta-design (Sauvant et al., 2008), whereas the relationship between the independent variables taken two by two was identified graphically to assess the extent of variation in each experiment and to identify outliers. Co-linearity was not identified. Each dependent variable was graphed against each independent variable in order to observe the linearity (or lack thereof) of the relationship (Sauvant et al., 2008). The within-experiment and between-experiment responses of the dependent variables (coefficient of digestibility and digestible amino acid content) to covariates (dietary inclusion of microbial phytase, concentrations of crude protein, amino acids, Ca, phytic acid and neutral-detergent fibre) were examined carefully. Descriptive statistics were generated for each variable in the selected groups (Table 2-1).

Table 2-1 Descriptive statistics in the databases.

Variables	N	Mean	S.D.	Min	Max
Independent variables					
Body weight (kg)	138	35.25	16.570	7.12	86.10
<i>Feed composition</i>					
Crude protein (g/kg diet)	138	177.70	34.840	101.00	273.35
Neutral-detergent fibre (g/kg diet)	132	125.80	39.740	34.57	231.91
Calcium (g/kg diet)	138	6.63	1.555	3.96	11.60
Phytic acid (g/kg diet)	138	2.26	1.003	0.09	4.90
Exogenous phytase (FTU/kg diet)	137	440.30	475.000	0.00	1894.00
<i>Amino acid composition (g/kg diet)</i>					
Arg	136	11.26	2.592	3.26	18.00
His	128	4.53	0.740	2.90	5.90
Ile	138	7.52	1.588	3.70	11.30
Leu	138	14.76	2.545	7.90	19.06
Lys	138	10.08	2.502	4.10	15.10
Met	128	2.94	0.607	1.90	4.31
Phe	132	8.57	1.495	5.50	11.50
Thr	128	6.64	1.210	4.10	9.30
Val	124	8.69	1.564	5.10	11.90
Cys	138	3.30	0.862	1.70	5.96
Tyr	125	5.57	1.314	2.60	8.13
Dependent variables					
<i>Apparent ileal digestible amino acid (g/kg diet)</i>					
Arg	131	9.70	2.247	4.54	16.87
His	124	3.69	0.586	2.15	4.91
Ile	138	5.93	1.264	2.83	8.64
Leu	137	11.83	1.954	6.04	16.56
Lys	131	7.95	2.211	2.83	12.88
Met	107	2.30	0.531	1.14	3.55
Phe	127	6.86	1.289	3.99	9.19
Thr	138	5.06	1.639	2.56	12.66
Val	131	6.55	1.654	1.06	11.55
Cys	83	2.20	0.545	1.39	3.30
Tyr	107	4.15	1.057	1.99	6.51
<i>Apparent ileal digestibility (%)</i>					
Arg	138	84.96	4.527	71.19	93.70
His	138	80.37	5.102	63.40	90.70
Ile	137	78.87	5.339	65.82	89.90
Leu	138	80.00	5.289	63.40	89.21
Lys	138	79.24	6.247	62.10	90.70
Met	107	81.43	5.820	63.00	91.60
Phe	133	79.69	5.153	61.80	90.22
Thr	137	71.36	5.815	55.20	84.30
Val	133	75.45	5.278	64.00	87.20
Cys	84	74.61	6.049	60.90	85.40
Tyr	113	78.60	5.530	62.30	88.60

N = number of studies.

Arg = arginine, His = histidine, Ile = isoleucine, Leu = leucine, Lys = lysine, Met = methionine, Phe = phenylalanine, Thr = threonine, Val = valine, Cys = cysteine, Tyr = tyrosine.

Publications: (Mroz et al., 1994; Kemme et al., 1999; Traylor et al., 2001; Omogbenigun et al., 2003; Shim et al., 2003; Cervantes, 2004; Johnston et al., 2004; Fan et al., 2005; Liao et al., 2005a; Liao et al., 2005b; Nitrayová et al., 2006; Radcliffe et al., 2006; Nortey et al., 2007; Sands et al., 2007; Pomar et al., 2008; Woyengo et al., 2008; Nitrayová et al., 2009; Sands et al., 2009; Kiarie et al., 2010; Li et al., 2010; Cervantes et al., 2011; Sánchez-Torres et al., 2011; Yáñez et al., 2011; Zeng et al., 2011; Guggenbuhl et al., 2012; Morales et al., 2012; Olukosi et al., 2012; Almeida et al., 2013; Mok et al., 2013; Yáñez et al., 2013; Zeng et al., 2014; Adedokun et al., 2015; Kahindi et al., 2015).

The “study” was considered as random effect as suggested by Sauvant (2008) and St-Pierre (2001). The study effect should be considered random because when the database contains different individual studies, each study is a random outcome from a large population of studies and the study effect represent the sum of the effects of many factors, all with small effects on the dependent variable (St-Pierre, 2001; Sauvant et al., 2008).

Relationships between variable Y and the main explanatory variables X (microbial phytase, crude protein, amino acid, Ca, phytic acid and neutral detergent fibre concentrations) were studied using the following quadratic model:

$$Y_{ij} = \mu + \mu_i + \beta_1 X_{ij} + \beta_2 [X_{ij}]^2 + e_{ij}$$

Where Y_{ij} is the dependent variable Y in experiment i with level j of microbial phytase; X_{ij} is the independent variable; μ is the overall intercept across all studies; μ_i is the effect of experiment i on the intercept μ with the condition that $\sum \mu_i = 0$; β_1 and β_2 are respectively the linear and quadratic coefficients of the relationship and e_{ij} is the residual error. All statistical analyses were carried out using the MIXED procedure of SAS 9.4 software. All variables found significant ($P < 0.05$) were retained and the interactions between these variables were tested.

Model evaluation

The leave-one-out cross-validation was used to obtain the RMSEP (root mean square error of prediction) from the value of the PRESS (predicted residual sum of squares) statistic (Causeur, 2003). The RMSE and the RMSEP have been used to test the accuracy of equations of predictions of the apparent ileal digestibility of amino acids and apparent digestible amino acid contents in the diet.

2.5. Results

The models were evaluated separately for the three types of microbial phytase included in the database (from *Aspergillus niger*, *Escherichia coli* and *Peniophora lycii*). The three types had similar positive effects on amino acid digestibility, they were thus combined in the final models. The effect of feed types (corn-soybean meal, cereal-soybean meal, corn/other protein sources, cereal/other protein sources, cereals, soybean meal, other protein sources) was also investigated in the initial steps but was not significant when feed composition was included in the model. Phytase and feed composition (indispensable amino acid and neutral detergent fibre contents) affected apparent digestibility independently of feed type. All feeds were then included in the final models.

Prediction of apparent ileal digestibility based on indispensable amino acids

The general regression equations for apparent digestibility based on the indispensable amino acids tested in this study all had an intercept different from 0 ($P < 0.05$, Table 2-2). The effect of amino acid concentration (a coefficient) was positive and linear for Arg, Lys, Phe, Tyr ($P < 0.001$), His and Ile ($P < 0.01$) and Met ($P < 0.05$) and both linear and quadratic for Leu ($P = 0.01$ and 0.02) and Thr ($P = 0.009$ and 0.02). The phytase effect (b coefficient) was linear and quadratic for all indispensable amino acids (linear $P < 0.01$ except for Met ($P = 0.01$); quadratic $P < 0.05$ except for Arg ($P = 0.06$)), with R^2 ranging from 0.83 for Ile to 0.94 for Met. Digestibility and neutral detergent fibre (c coefficient) were related negatively and linearly for all indispensable amino acids ($P < 0.001$). Linear and quadratic responses were obtained for His, Met and Thr (quadratic $P < 0.01$). The final models of digestibility for all indispensable amino acids thus included phytase activity and dietary composition (amino acids and neutral detergent fibre). The current models presented low RMSE (1.4-4.2) and a low RMSEP (<3.4%). The assessment of the quality of prediction of the apparent ileal digestibility of Lys by the model showed a good accuracy (Figure 2-1).

Table 2-2 Prediction of apparent ileal digestibility of indispensable amino acid (%) of pig feed as a function of microbial phytase activity, indispensable amino acid concentration and neutral detergent fibre concentration.

										P-value		
Amino acid	N	General regression equation (model)	Intercept	AA	Phytase	NDF	AA *	Phytase *	NDF *	R ²	RMSE	RMSEP
							AA AA	Phytase Phytase	NDF NDF			
Arg	138	Y= 86.1+ 0.75a+0.30b-8.00 ×10 ⁻² c-1.60 ×10 ⁻² b ²	<0.001	<0.001	<0.01	<0.001	NS	NS	NS	0.87	1.4	2.14
His	138	y= 93.75+ 1.43a +0.29b-0.29c-1.70×10 ⁻² b ² +9.46 ×10 ⁻⁴ c ²	<0.001	<0.01	<0.01	<0.001	NS	<0.05	<0.001	0.91	2.8	2.17
Ile	137	y= 80.32+1.05a+0.41b-8.00 ×10 ⁻² c-2.60 ×10 ⁻² b ²	<0.001	<0.01	<0.01	<0.001	NS	<0.05	NS	0.83	1.7	2.81
Leu	138	y= 66.54+3.05a+0.43b-7.00×10 ⁻² c-0.10 a ² - 2.80×10 ⁻² b ²	<0.001	<0.05	<0.01	<0.001	<0.05	<0.05	NS	0.86	4.2	2.60
Lys	138	y= 73.90+1.30a+0.44 b-6.50 ×10 ⁻² c-2.60×10 ⁻² b ²	<0.001	<0.001	<0.01	<0.001	NS	<0.05	NS	0.85	1.7	3.08
Met	107	y=93.65+2.17a+0.27b-0.24c-1.80×10 ⁻² b ² +6.65×10 ⁻⁴ c ²	<0.001	<0.05	<0.05	<0.001	NS	<0.05	<0.001	0.94	2.6	1.99
Phe	133	y=80.34+1.04a+0.35b-8.00×10 ⁻² c-2.00 ×10 ⁻² b ²	<0.001	<0.001	<0.01	<0.001	NS	<0.05	NS	0.87	1.6	2.33
Thr	137	y=53.23+11.20a+0.44b-0.27c-0.78a ² -2.70×10 ⁻² b ² +7.62×10 ⁻⁴ c ²	<0.001	<0.01	<0.01	<0.001	<0.05	<0.05	<0.01	0.84	3.3	3.33
Val	133	y=79.27+0.40a+0.43b-6.40× 10 ⁻² c-2.90×10 ⁻² b ²	<0.001	NS	<0.001	<0.001	NS	<0.05	NS	0.91	1.6	2.15
Tyr	113	y=77.80+1.47a+0.44b-6.40× 10 ⁻² c-2.60×10 ⁻² b ²	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	NS	<0.01	NS	0.93	1.5	2.23

N = number of studies.

Arg = arginine, His = histidine, Ile = isoleucine, Leu = leucine, Lys = lysine, Met = methionine, Phe = phenylalanine, Thr = threonine, Val = valine, Tyr = tyrosine.

Y= apparent ileal digestibility (%).

a = effect of amino acid concentration (g/ kg diet).

b = effect of added microbial phytase activity (FTU/kg).

c = effect of neutral-detergent fibre concentration (g/kg diet).

NS = effect not significant.

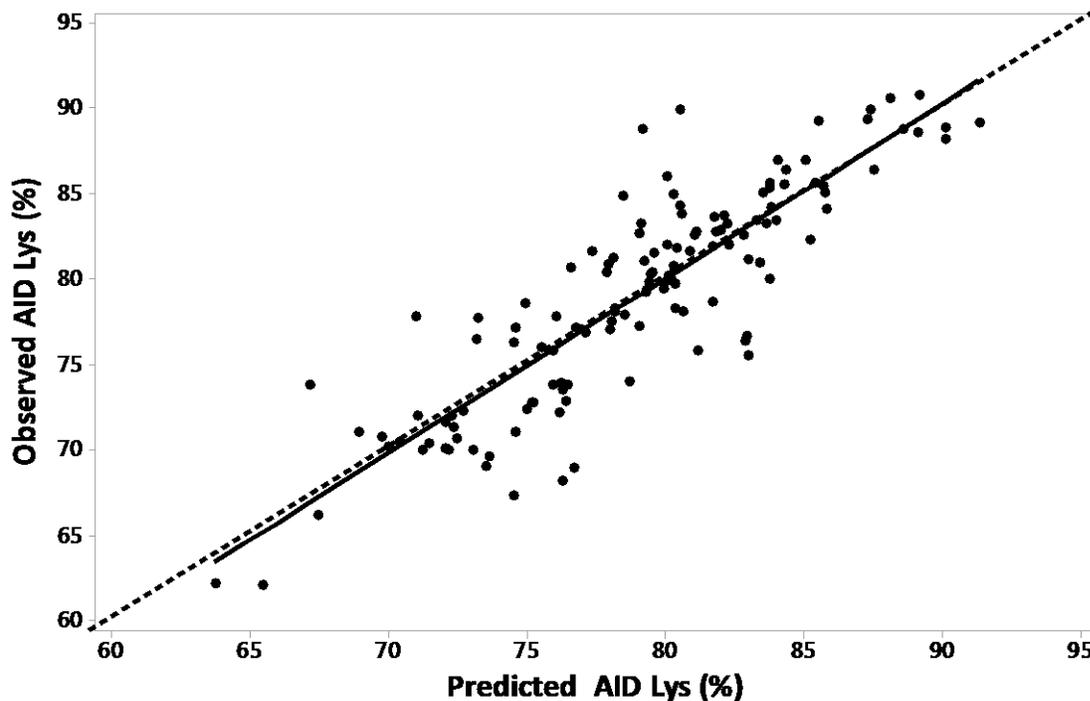


Figure 2-1 Regression analysis of the relationship between observed apparent ileal digestibility of Lysine (Lys) and apparent ileal digestibility predicted by the model. Dashed line represents $Y = X$. Black = tested model.

Prediction of digestible indispensable amino acid content

The general regression equations for digestible indispensable amino acid content are presented in Table 2-3; in these relations, the intercepts were not significantly different from 0 except for methionine. The best predictors were indispensable amino acid content (a coefficient), use of microbial phytase (b coefficient), and neutral-detergent fibre content (c coefficient). The coefficient before the “a” corresponds to the increase of digestible content for 1 g of total amino acid added. The relationship to fibre was linear for Arg, His, Ile, Leu, Lys, Thr, Val and Tyr (all $P < 0.001$) and Met ($P = 0.01$) and linear and quadratic for Phe (linear $P = 0.001$ and quadratic $P = 0.01$). The relationship to phytase was linear for Arg, Ile, Phe and Val ($P \leq 0.01$, $R^2 = 0.99$ for Arg, 0.97 for Ile, 0.98 for Phe and 0.97 for Val), His, Leu, Met, Thr, ($P \leq 0.05$,

$R^2 = 0.98$ for His, 0.97 for Leu, 0.99 for Met and 0.97 for Thr) and both linear and quadratic for Lys (linear $P < 0.01$, quadratic $P < 0.05$, $R^2 = 0.99$) and Tyr (linear $P < 0.001$, quadratic $P < 0.05$, $R^2 = 0.99$). The final models of digestibility for all indispensable amino acids thus included phytase activity and dietary composition (amino acids and neutral detergent fibre). The current models presented low RMSE (0.2-0.7) and a low RMSEP (<0.5%)

Table 2-3 Prediction of apparent ileal digestible indispensable amino acid content (g/kg) in pig feed containing microbial phytase, as a function of indispensable amino acid concentration and neutral detergent fibre content.

Amino acid	N	General regression equation (model)	Intercept	P-value								
				AA	Phytase	NDF	AA*	Phytase*	NDF*	R ²	RMSE	RMSEP
Arg	131	$Y = 0.25 + 0.92a + 1.25 \times 10^{-2}b - 8.70 \times 10^{-3}c$	NS	<0.001	<0.01	<0.001	NS	NS	NS	0.99	0.5	0.23
His	124	$Y = 0.25 + 0.83a + 4.50 \times 10^{-3}b - 3.00 \times 10^{-3}c$	NS	<0.001	<0.05	<0.001	NS	NS	NS	0.98	0.3	0.10
Ile	138	$Y = -0.27 + 0.85a + 1.42 \times 10^{-2}b - 6.53 \times 10^{-3}c$	NS	<0.001	<0.01	<0.001	NS	NS	NS	0.97	0.4	0.25
Leu	137	$Y = 1.60 + 0.77a + 1.95 \times 10^{-2}b - 9.90 \times 10^{-3}c$	NS	<0.001	<0.05	<0.001	NS	NS	NS	0.97	0.7	0.44
Lys	131	$Y = -0.17 + 0.87a + 4.30 \times 10^{-2}b - 5.44 \times 10^{-3}c - 2.44 \times 10^{-3}b^2$	NS	<0.001	<0.01	<0.001	NS	<0.05	NS	0.99	0.5	0.28
Met	107	$Y = 0.24 + 0.85a + 2.50 \times 10^{-3}b - 4.18 \times 10^{-3}c + 9.95 \times 10^{-6}c^2$	<0.05	<0.001	<0.05	<0.05	NS	NS	NS	0.99	0.2	0.05
Phe	127	$Y = 0.53 + 0.92a + 3.20 \times 10^{-2}b - 2.13 \times 10^{-2}c - 1.80 \times 10^{-3}b^2 + 6.50 \times 10^{-5}c^2$	NS	<0.001	<0.01	<0.01	NS	NS	<0.05	0.98	0.6	0.22
Thr	134	$Y = 0.43 + 0.75a + 9.50 \times 10^{-3}b - 5.72 \times 10^{-3}c$	NS	<0.001	<0.05	<0.001	NS	NS	NS	0.97	0.4	0.22
Val	131	$Y = 0.40 + 0.78a + 2.60 \times 10^{-2}b - 5.55 \times 10^{-3}c - 1.26 \times 10^{-3}b^2$	NS	<0.001	<0.01	<0.001	NS	NS	NS	0.85	0.4	0.17
Tyr	107	$Y = 0.12 + 0.85a + 2.20 \times 10^{-2}b - 1.20 \times 10^{-3}c - 1.27 \times 10^{-3}b^2$	NS	<0.001	<0.001	<0.001	NS	<0.05	NS	0.99	0.4	0.13

N = number of studies.

Arg = arginine, His = histidine, Ile = isoleucine, Leu = leucine, Lys = lysine, Met = methionine, Phe = phenylalanine, Thr = threonine, Val = valine, Tyr = tyrosine.

Y = apparent ileal digestible indispensable amino acid (g/kg diet).

a = effect of amino acid concentration (g/kg diet).

b = effect of added microbial phytase activity (FTU/kg).

c = effect of neutral-detergent fibre concentration (g/kg diet).

NS = effect not significant.

2.6. Discussion

The present work aimed at using meta-analysis tool to better understand and predict the impact of microbial phytase on amino acid digestibility. This has been done by fitting multiple linear regression models that included explanatory variables (microbial phytase, crude protein, amino acid, Ca) of both the ileal digestibility coefficient and the digestible content of amino acids. Cowieson et al., (2017b) recently published a work where they estimate the effects of microbial phytase on ileal amino acids digestibility coefficient in pigs. The difference between the two articles lies in the statistical analysis approach. Cowieson et al., (2017b) used an empirical approach with many simple regression models for the analysis of factor effects on apparent ileal digestibility coefficients while the current paper uses a more mechanistic approach to quantify but also rank the impact of main modulating factors by including all of them at the same time in the model.

Although many hypotheses have been advanced to explain the negative effect of phytic acid on feed digestibility, much uncertainty still shrouds the exact mechanism or mechanisms involved. It is generally accepted that negatively charged phytate ions form binary complexes with protein molecules, which bear a positive net charge at pH values below their isoelectric point, for example 4.7 in the case of certain proteins in soybean meal (Csonka et al., 1926). Above the isoelectric point, a cationic bridge (usually Ca^{2+}) links phytate to protein molecules bearing a net negative charge, thus forming ternary complexes.

Phytate-protein interactions appear to be key factors determining the effect of phytate on digestibility (Selle et al., 2012). These interactions can alter protein structure, thereby decreasing protein solubility, hydrolysis by proteases and hence utilization (Humer et al., 2015). New data show that the six anionic phosphoryl groups (HPO_3^{2-}) of phytic acid have strong kosmotropic effects and can stabilise proteins by interacting with the surrounding aqueous medium (Selle et al., 2012). Phytate increases mucin secretion into the gut (Selle and Ravindran, 2008), which increases endogenous amino acid flux, since the protein component of mucin remains largely undigested. Phytate also increases Na^+ influx into the small intestinal lumen, an effect counteracted by phytase. Sodium appears to be the counter ion of HCO_3^- generated to buffer hyper-secretion of HCl which is described as endogenous aggressor (Selle

et al., 2012). These observations showed that phytate stimulates mucin secretion and increases endogenous amino acid flows in pigs, which decreased the apparent digestibility of amino acids. These effects of phytate have been counteracted by the incorporation of phytase. The principal objective of this meta-analysis was therefore to study the effect of phytase on pig feed digestibility and to shed light on the factors modulating this effect. A positive linear relationship was found between digestibility and indispensable amino acid content except in the cases of Thr and Leu. For these two amino acids, a quadratic relationship was found. The dependence of the apparent digestibility of amino acid on the amino acid content has been reported previously (Fan et al., 1994). The apparent ileal digestibility increases with the dietary level of amino acid until reaching a plateau (Stein et al., 2007). This can explain the linear effect obtained for most amino acids in the present meta-analysis where dietary levels of amino acids were below the level to reach the plateau. The improvement in apparent digestibility due to the presence of larger amounts of amino acids in the feed is due to the mathematical effect of the dietary level of amino acid on the apparent values. In fact, when curvilinear shape of nutrient concentration and apparent digestibility was found it is the consequence of endogenous losses (Stein et al., 2007). The quadratic relationship between the apparent ileal digestibility of Thr and Leu and the dietary levels of amino acids may be explained by lower dietary level and higher basal endogenous losses of these amino acids.

Phytase was found to improve apparent digestibility for each indispensable amino acid. The effect of phytase on ileal digestibility of amino acids at the dose of 500 FTU/kg was described in Table 2-4. The main mechanisms responsible for the negative effect of phytic acid on digestibility thus appear to be formation of phytate-protein complexes in feedstuffs, *de novo* formation of phytate-protein complexes during digestion, and formation of phytate- protease complexes in the digestive tract (Selle et al., 2000; Adeola and Sands, 2003). The effect of phytase was independent of the amino acid content of the feed, indicating that variations in dietary level of amino acids did not influence the phytase effect. This effect of phytase on apparent digestibility of amino acids could come from a direct positive effect on amino acid digestibility or by reducing the flow of endogenous amino acids.

Table 2-4 Effect of microbial phytase on apparent ileal digestibility of indispensable amino acids (%) at the dose of 500 FTU/kg.

Amino acid	N	Apparent ileal digestibility (%)		Response to phytase (%)
		Nil	Phytase 500 FTU/kg	
Arg	138	87.10	88.20	1.26
His	138	82.79	83.82	1.24
Ile	137	79.67	81.07	1.76
Leu	138	82.79	84.24	1.75
Lys	138	80.08	81.63	1.94
Met	107	82.81	83.71	1.09
Phe	133	81.70	82.95	1.53
Thr	137	74.03	75.55	2.06
Val	133	76.47	77.90	1.86
Tyr	113	78.75	80.30	1.97

N = number of studies.

Arg = arginine, His = histidine, Ile = isoleucine, Leu = leucine, Lys = lysine, Met = methionine, Phe = phenylalanine, Thr = threonine, Val = valine, Tyr = tyrosine.

In this meta-analysis, the best improvement in digestibility associated to phytase effect was obtained for Thr. In fact, the percent improvement is about twice as high as for Met, which is consistent with previous results (Cowieson et al., 2017b) in pigs and (Cowieson et al., 2017a) in broiler chickens. This effect supports the hypotheses that a major effect of phytase is a reduction of endogenous losses of amino acids caused by the anti-nutritive effects of phytic acid (Pirgozliev et al., 2011). Secretions in the ileum of pigs and chickens are particularly rich in Thr (Lien et al., 1997; Ravindran et al., 1999a) and do not vary with diet or the method of determination (Cowieson et al., 2009). According to one report (Montagne et al., 2004), 28–35% of the amino acid residues in porcine mucin are Thr, which represents 11% of the total basal endogenous losses. In broilers, increasing the phytate content of the diet from 8.5 to 11.5 and 14.5 g/kg generally increased endogenous amino acid flux in the ileum (Cowieson and Ravindran, 2007). A positive correlation ($r = 0.782$; $P \leq 0.01$) was found between the phytase-induced reductions in endogenous amino acid flux and changes in the amino acid profile of mucin.

The effect of phytase appears maximal at 800 FTU/kg for most amino acids except Val and Met, for which a maximum is reached at 700 FTU /kg, and Phe at 900 FTU /kg. These results confirm what was found by Cowieson et al., (2017b) where dose responses for the effect of phytase on ileal amino acid digestibility was mainly beneficial from the dose of 250 FTU/Kg up 750 FTU/kg. Phytase increased the digestibility of Thr and Lys up to a dose of 800 FTU/kg (Figure 2-2). The mean improvements found in this meta-analysis are consistent with those reported previously (Selle and Ravindran, 2008). The median response to 905 FTU/kg in cannulated pigs was 1.7% compared to 1.9% in the present study.

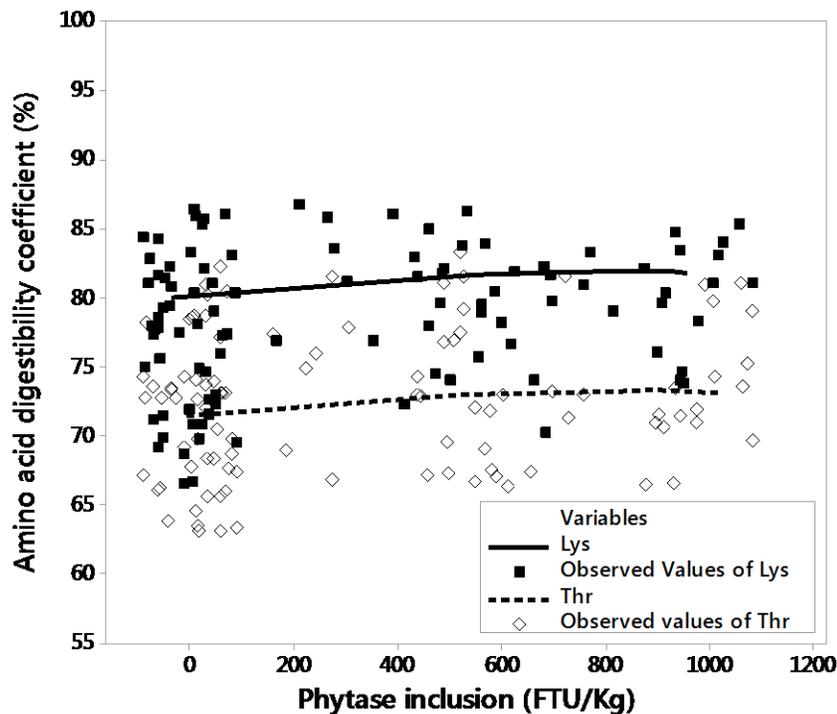


Figure 2-2 Relationship between phytase inclusion and apparent ileal amino acid digestibility coefficients of Lys (Lysine) (full line) and Thr (Threonine) (dashed line).

It should be noted that all of the studies in this analysis were conducted with cannulated pigs, in which the response to phytase does not appear as clearly as in slaughtered pigs. At 1.7%, the median response of cannulated pigs to 905 FTU/kg is somewhat smaller than the 6% in intact pigs given the same amount of phytase (Selle and Ravindran, 2008). Cannulation alters the gut microenvironment by affecting digesta pH and/or endogenous amino acid flux (Selle et al., 2000). In practice, cannulated pigs are generally meal fed, while intact pigs eat *ad libitum*, possibly explaining the different responses to phytase activity (Selle and Ravindran, 2008). In fact, Moter and Stein (2004) showed that higher feed intake increases apparent digestibility but increases also endogenous flow of amino acids, which reduces standardized digestibility. When pigs are restricted, standardized digestibility of amino acids would be already better limiting the effect of phytase. The equivalencies obtained for phytase therefore should be considered as minimal values that can be adjusted, in view of the strongest effect in intact pigs compared to cannulated pigs as discussed above.

The linear effect of phytase suggests that it should increase the digestibility of the indispensable amino acids in the feed at any level of supplementation. It is well known that phytase improves P digestion. Létourneau-Montminy et al., (2012) showed a quadratic effect of phytase on digestible P (g/kg) based on a database containing results for supplementation as high as 1.565 FTU/kg. However, a linear increase from 59.5% to 75.8% in P digestion as phytase supplementation increased from 1.000 to 20.000 FTU/kg has been observed (Zeng et al., 2014). Two mechanisms that might explain this are faster and more extensive breakdown of phytic acid and increased likelihood of phytase leaving the stomach in active form at larger doses (Kies et al., 2006). The linear effect of phytase observed in this study suggests that large doses of phytase might improve digestibility beyond the values reported for standard doses.

In the models that have emerged from the present analysis, neutral-detergent fibre has a negative effect on digestibility. In fact, this fibre was one of the best predictors, explaining 27% of the variance of apparent digestibility with respect to Lys and 66% with respect to His. Similar results have been obtained previously for standard digestibility of oilseed meal in the ileum (Messad et al., 2016).

A minimum level of dietary fibre is necessary given its important role in pig diets such as maintaining normal physiological functions and improving the functioning of the gastrointestinal tract (Wenk, 2001). As proposed by Conway (1994), fibers have three components influencing gut health, namely the diet, the mucosa and the commensal flora. The impact of the diet on gut health is important with beneficial or harmful effects (Jang et al., 2016). In fact, dietary fibre interact with mucosa and influences the composition and activity of microbiota (Williams et al., 2001), having an important beneficial effect on gut health control by providing protection against intestinal disorders, on intestinal functions and on the bacterial profile and fermentation. These effects are related to changes in the physicochemical characteristics of the digesta such as transit time, solubility, fermentability and water retention capacity of the digesta (Jha and Berrococo, 2016).

It has been reported that the source and the amount of fibre in a feed both affect the endogenous amino acid levels in the ileal digesta (Sauer and Ozimek, 1986). It has been shown repeatedly that fibre increases endogenous protein synthesis and losses of endogenous amino acids in the terminal ileum of monogastric livestock (Sauer et al., 1991; Nyachoti et al., 1997; Montagne

et al., 2004). Due to its physical characteristics and abrasive action, fibre accelerates sloughing of the intestinal mucosa and induces mucus production by the gut mucosa (Schulze et al., 1995; Nyachoti et al., 1997). It can also adsorb peptides, amino acids and digestive enzymes, thus slowing digestion and absorption, which can induce an increase in endogenous secretions (Nyachoti et al., 1997). Although, fibre affects negatively the apparent ileal digestibility of all amino acids, its effect is more pronounced in apparent ileal digestibility of Thr due to its high concentrations in endogenous amino acids in pig as mentioned above. Increasing the fiber content from 100 g/kg diet to 150 g/kg diet generates a decrease on apparent ileal digestibility of Thr (-5.3%) compared to (-3.1%) for His.

It would therefore come as no surprise that fibre also reduces the effectiveness of phytase. As a constituent of cell walls, it appears to protect phytic acid from hydrolysis by phytase, an effect that has been countered by combining phytase with carbohydrases to obtain greater improvement of feed digestibility in pigs (Ravindran et al., 1999b; Debicki-Garnier et al., 2014). Although the effect of neutral-detergent fibre on digestibility appeared strong in the present study, no interaction between fibre and microbial phytase was found. This seems in contradiction with the hypothesized effect of phytase on endogenous amino acid losses. However, this may be due to the absence of intra-study variability in neutral-detergent levels, which were not reported in the publications and were therefore calculated (NRC, 2012), leading to less variance than was likely present in reality.

Phytic acid and calcium levels did not have any significant effect on digestibility in the models and no interactions with microbial phytase were found. In the case of phytic acid, varying up to a maximum of 4.9 g/kg of feed maybe insufficient to show its negative effect on digestibility. It has been shown that phytase-supplemented diets containing phytic acid in the range of 2.2–4.8 g/kg were of similar digestibility in terms of amino acids (Liao et al., 2005a). The level of calcium had little or no effect on the efficacy of phytase for liberating digestible P in the digestive tract of pigs (Létourneau-Montminy et al., 2012). Dietary Ca database values vary between 3.96 g/kg and 11.60 g/kg, which cover most part of the data used in the field in growing pigs. However, within studies, dietary Ca was generally maintained fix while protein, amino acids and phytase varied precluding to study it accurately. Other than the effect of the database, this absence of prediction of the impact of ternary complexes on the effect of phytase

on digestibility of amino acids can be related to the animal model. Current models were based on cannulated pigs, so it will be important to study also the impact of the form of phytic acid on intact animals for a better understanding of the mechanism of action of phytic acid on amino acids digestibility.

It is premature to conclude that the lack of interaction noted in this study indicates that ternary complexes are not involved in the effect of phytase on feed digestibility. One of the aims of this study was to verify whether phytic acid concentration determines the ability of phytase to increase digestibility of amino acids. We found no such relationship, nor any interaction between crude protein or calcium and the effectiveness of phytase supplementation. Improvements in digestibility in terms of indispensable amino acids therefore may be due more to the chemical properties of phytic acid and the proteins present than to their concentrations in feeds, as suggested previously in studies of pigs (Liao et al., 2005a) and broiler chickens (Ravindran et al., 1999a). Meanwhile, a significant positive interaction ($P < 0.001$) between phytic acid concentration and microbial phytase activity has been demonstrated in terms of P absorption (Létourneau-Montminy et al., 2012). This is expected since the release of P is the direct result of phytase activity. However, in the prediction models obtained in present analysis, no difference was found between the diets, suggesting that the form or the amount of the phytic acid present does not appear to modulate the improvements in digestibility brought by the action of phytase.

As previously mentioned, the difference between current models and models of Cowieson et al., (2017b) is based on the statistical analysis approach. The empirical approach used by Cowieson et al., (2017b) allow to quantify each factor independently but, it does not integrate all modulating factors and could not be a predictive approach. Contrariwise, the current models, with a mechanistic approach, integrate all dietary and animal factors modulating the amino acid digestibility and then could be used to predict the effect of phytase on ileal digestibility of amino acids.

2.7. Conclusion

This study shows that supplementing pig feed with microbial phytase does increase feed digestibility in terms of amino acid digestibility. However, no factors modulating the efficacy of phytase were present in the models, in keeping with the absence of interactions between the independent variables and phytase. On the other hand, the models allow quantifying of the effect of phytase on digestibility, which is important for optimizing the use of phytase to increase the yield of livestock feeds and decrease the amount of nutrient that ends up being a burden on the environment. As most diets are formulated on a standardized ileal digestibility basis, it is important to mention that the effect of phytase on apparent ileal digestibility basis would be equivalent when standardised ileal digestibility is considered. In fact, phytase affects probably directly the dietary amino acid digestibility or indirectly by reducing specific endogenous amino acids losses but not basal amino acid losses.

Acknowledgement

The authors wish to thank Nutreco Canada, Prorec, Mixscience, Aliments Breton and NSERC for the financial support.

2.8. References

- Adedokun, S., Owusu-Asiedu, A., Ragland, D., Plumstead, P., Adeola, O., 2015. The efficacy of a new 6-phytase obtained from *Buttiauxella* spp. expressed in *Trichoderma reesei* on digestibility of amino acids, energy, and nutrients in pigs fed a diet based on corn, soybean meal, wheat middlings, and corn distillers' dried grains with solubles. *Journal of Animal Science*. 93, 168.
- Adeola, O., Sands, J., 2003. Does supplemental dietary microbial phytase improve amino acid utilization? A perspective that it does not. *Journal of Animal Science*. 81, 78-85.
- Almeida, F., Pahn, A., Petersen, G., Augspurger, N., Stein, H., 2013. Effects of phytase on amino acid and energy digestibility in corn–soybean meal diets fed to growing pigs. *The Professional Animal Scientist*. 29, 693-700.
- Causeur, D., Dumas, G., Dhorne, T., Engel, B., Fonti furnols, M., Højsgaard, S., 2003. *Statistical Handbook for Assessing Pig Classification Methods: Recommendations from the “EUPIGCLASS” Project Group.*, pp.132.
- Cervantes, M., 2004. Ileal amino acid digestibility and performance of pigs fed grain sorghum-based diets supplemented with phytase. *Interciencia*. 29, 527-531.
- Cervantes, M., Gomez, R., Fierro, S., Barrera, M.A., Morales, A., Araiza, B.A., Zijlstra, R.T., Sanchez, J.E., Sauer, W.C., 2011. Ileal digestibility of amino acids, phosphorus, phytate and energy in pigs fed sorghum-based diets supplemented with phytase and Pancreatin(R). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 95, 179-186.
- Conway, P.L., 1994. Function and regulation of the gastrointestinal microbiota of the pig. In: Souffrant, W.B., Hagemester, H. (Eds.), *Proceedings of the VIth International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*. EAAP Publication no. 80, Dummerstorf, pp. 231–240.
- Cosgrove, D.J., 1966. The chemistry and biochemistry of inositol polyphosphates. *Reviews of Pure and Applied Chemistry*. 16, 209-224.
- Cowieson, A., Ravindran, V., 2007. Effect of phytic acid and microbial phytase on the flow and amino acid composition of endogenous protein at the terminal ileum of growing broiler chickens. *British Journal of Nutrition*. 98, 745-752.
- Cowieson, A., Ruckebusch, J.-P., Sorbara, J., Wilson, J., Guggenbuhl, P., Roos, F., 2017a. A systematic view on the effect of phytase on ileal amino acid digestibility in broilers. *Journal of Animal Science*. 225, 182–194.
- Cowieson, A., Ruckebusch, J.-P., Sorbara, J., Wilson, J., Guggenbuhl, P., Tanadini, L., Roos, F., 2017b. A systematic view on the effect of microbial phytase on ileal amino acid digestibility in pigs. *Journal of Animal Science*. 231, 138-149.
- Cowieson, A.J., Bedford, M.R., Selle, P.H., Ravindran, V., 2009. Phytate and microbial phytase: implications for endogenous nitrogen losses and nutrient availability. *World's poultry science journal*. J. 65, 401-418.
- Cowieson, A.J., Fru-Nji, F., Adeola, O., 2014. Dietary phosphate equivalence of four forms of Pi contrasted with a novel microbial phytase from *Citrobacter braakii* in broiler chickens. *Animal Production Science*. 55, 1145-1151.
- Csonka, F.A., Murphy, J.C., Jones, D.B., 1926. The iso-electric points of various proteins. *Journal of the American Chemical Society*. 48, 763–768.

- Debicki-Garnier, A.-M., Messenger, B., Plumstead, P., 2014. Effet de l'addition de xylanase et de phytase sur la digestibilité de l'énergie et des nutriments chez des porcs en croissance nourris avec des aliments à base de maïs et contenant 20% de drèches de maïs. *Journées Recherche Porcine*. 46, 121-122.
- Fan, M., Li, T., Yin, Y., Fang, R., Tang, Z., Hou, Z., Huang, R., Deng, Z., Zhong, H., Zhang, R., 2005. Effect of phytase supplementation with two levels of phosphorus diets on ileal and faecal digestibilities of nutrients and phosphorus, calcium, nitrogen and energy balances in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 81, 67-75.
- Fan, M., Sauer, W., Hardin, R., Lien, K., 1994. Determination of apparent ileal amino acid digestibility in pigs: effect of dietary amino acid level. *Journal of Animal Science*. 72, 2851-2859.
- Guggenbuhl, P., Waché, Y., Simoes Nunes, C., Fru, F., 2012. Effects of a 6-phytase on the apparent ileal digestibility of minerals and amino acids in ileorectal anastomosed pigs fed on a corn-soybean meal-barley diet. *Journal of Animal Science*. 90, 182-184.
- Humer, E., Schwarz, C., Schedle, K., 2015. Phytate in pig and poultry nutrition. *Journal of animal physiology and animal nutrition*. 99, 605-625.
- Jang, Y., Wilcock, P., Boyd, R., Lindemann, M., 2016. Effect of xylanase supplementation of a phytase-supplemented diet on apparent total tract digestibility in pigs. *Journal of Animal Science*. 94, 260-263.
- Jha, R., Berrocoso, J.F., 2016. Dietary fiber and protein fermentation in the intestine of swine and their interactive effects on gut health and on the environment: A review. *Animal Feed Science and Technology*. 212, 18-26.
- Johnston, S., Williams, S., Southern, L., Bidner, T., Bunting, L., Matthews, J., Olcott, B., 2004. Effect of phytase addition and dietary calcium and phosphorus levels on plasma metabolites and ileal and total-tract nutrient digestibility in pigs. *Journal of Animal Science*. 82, 705-714.
- Kahindi, R.K., Thacker, P.A., Nyachoti, C.M., 2015. Nutrient digestibility in diets containing low-phytate barley, low-phytate field pea and normal-phytate field pea, and the effects of microbial phytase on energy and nutrient digestibility in the low and normal-phytate field pea fed to pigs. *Animal Feed Science and Technology*. 203, 79-87.
- Kemme, P.A., Jongbloed, A.W., Mroz, Z., Kogut, J., Beynen, A.C., 1999. Digestibility of nutrients in growing-finishing pigs is affected by *Aspergillus niger* phytase, phytate and lactic acid levels: 1. Apparent ileal digestibility of amino acids. *Livestock Science*. 58, 107-117.
- Kiarie, E., Owusu-Asiedu, A., Simmins, P.H., Nyachoti, C.M., 2010. Influence of phytase and carbohydrase enzymes on apparent ileal nutrient and standardized ileal amino acid digestibility in growing pigs fed wheat and barley-based diets. *Livestock Science*. 134, 85-87.
- Kies, A., Kemme, P., Šebek, L., Van Diepen, J.T.M., Jongbloed, A., 2006. Effect of graded doses and a high dose of microbial phytase on the digestibility of various minerals in weaner pigs. *Journal of Animal Science*. 84, 1169-1175.
- Létourneau-Montminy, M., Jondreville, C., Sauviant, D., Narcy, A., 2012. Meta-analysis of phosphorus utilization by growing pigs: effect of dietary phosphorus, calcium and exogenous phytase. *Animal*. 6, 1590-1600.

- Li, Y., Fang, Z., Dai, J., Partridge, G., Ru, Y., Peng, J., 2010. Corn extrusion and enzyme addition improves digestibility of corn/soy based diets by pigs: In vitro and in vivo studies. *Animal Feed Science and Technology*. 158, 146-154.
- Liao, S., Kies, A., Sauer, W., Zhang, Y., Cervantes, M., He, J., 2005a. Effect of phytase supplementation to a low-and a high-phytate diet for growing pigs on the digestibilities of crude protein, amino acids, and energy. *Journal of Animal Science*. 83, 2130-2136.
- Liao, S., Sauer, W., Kies, A., Zhang, Y., Cervantes, M., He, J., 2005b. Effect of phytase supplementation to diets for weanling pigs on the digestibilities of crude protein, amino acids, and energy. *Journal of Animal Science*. 83, 625-633.
- Lien, K., Sauer, W., Fenton, M., 1997. Mucin output in ileal digesta of pigs fed a protein-free diet. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*. 36, 182-190.
- Messad, F., Létourneau-Montminy, M., Charbonneau, E., Sauvart, D., Guay, F., 2016. Meta-analysis of the amino acid digestibility of oilseed meal in growing pigs. *Animal*. 10, 1635-1644.
- Mok, C.H., Lee, J.H., Kim, B.G., 2013. Effects of exogenous phytase and β -mannanase on ileal and total tract digestibility of energy and nutrient in palm kernel expeller-containing diets fed to growing pigs. *Animal Feed Science and Technology*. 186, 209-213.
- Montagne, L., Piel, C., Lallès, J.P., 2004. Effect of Diet on Mucin Kinetics and Composition: Nutrition and Health Implications. *Nutrition Reviews*. 62, 105-114.
- Morales, A., García, H., Sánchez, J.E., Araiza, B.A., Zijlstra, R.T., Cervantes, M., 2012. Apparent ileal amino acid digestibility and activities of trypsin and chymotrypsin in pigs fed sorghum–soybean meal diets supplemented with a microbial phytase. *Animal Feed Science and Technology*. 172, 247-251.
- Moter, V., Stein, H., 2004. Effect of feed intake on endogenous losses and amino acid and energy digestibility by growing pigs. *Journal of Animal Science*. 82, 3518-3525.
- Mroz, Z., Jongbloed, A., Kemme, P., 1994. Apparent digestibility and retention of nutrients bound to phytate complexes as influenced by microbial phytase and feeding regimen in pigs. *Journal of Animal Science*. 72, 126-132.
- Nitrayová, S., Patras, P., Brestensky, M., Zelenka, J., Broz, J., Heger, J., 2009. Effect of microbial phytase and diet fermentation on ileal and total tract digestibility of nutrients and energy in growing pigs. *Czech Journal of Animal Science*. 54, 163-174.
- Nitrayová, S., Patras, P., Sommer, A., Heger, J., 2006. Effect of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of phosphorus-adequate diets in growing pigs. *Archives of animal nutrition*. 60, 131-140.
- Nortey, T.N., Patience, J.F., Simmins, P.H., Trottier, N.L., Zijlstra, R.T., 2007. Effects of individual or combined xylanase and phytase supplementation on energy, amino acid, and phosphorus digestibility and growth performance of grower pigs fed wheat-based diets containing wheat millrun. *Journal of Animal Science*. 85, 1432-1443.
- NRC (National Research Council), 2012. *Nutrient Requirements of Swine*, 11th revised ed. National Academy Press, Washington, DC.
- NRC, 1998. *Nutrient Requirements of Swine* 10th edition, 10th revised ed. National Academy Press, Washington, DC, pp. 211.
- Nyachoti, C., Lange, C.d., McBride, B., Schulze, H., 1997. Significance of endogenous gut nitrogen losses in the nutrition of growing pigs: a review. *Canadian Journal of Animal Science*. 77, 149-163.

- Olukosi, O., Bolarinwa, O., Cowieson, A., Adeola, O., 2012. Marker type but not concentration influenced apparent ileal amino acid digestibility in phytase-supplemented diets for broiler chickens and pigs. *Journal of Animal Science*. 90, 4414-4420.
- Omogbenigun, F., Nyachoti, C., Slominski, B., 2003. The effect of supplementing microbial phytase and organic acids to a corn-soybean based diet fed to early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*. 81, 1806-1813.
- Pirgozliev, V., Bedford, M.R., Acamovic, T., Mares, P., Allymehr, M., 2011. The effects of supplementary bacterial phytase on dietary energy and total tract amino acid digestibility when fed to young chickens. *British poultry science*. 52, 245-254.
- Pomar, C., Gagne, F., Matte, J.J., Barnett, G., Jondreville, C., 2008. The effect of microbial phytase on true and apparent ileal amino acid digestibilities in growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science*. 86, 1598-1608.
- Radcliffe, J., Pleasant, R., Kornegay, E., 2006. Estimating equivalency values of microbial phytase for amino acids in growing and finishing pigs fitted with steered ileo-cecal valve cannulas. *Journal of Animal Science*. 84, 1119-1129.
- Ravindran, V., Cabahug, S., Ravindran, G., Bryden, W., 1999a. Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broilers. *Poultry Science*. 78, 699-706.
- Ravindran, V., Selle, P., Bryden, W., 1999b. Effects of phytase supplementation, individually and in combination, with glycanase, on the nutritive value of wheat and barley. *Poultry Science*. 78, 1588-1595.
- Sánchez-Torres, E., Barrera-Silva, M., Cervantes-Ramírez, M., Morales-Trejo, A., Landero-Viera, J.L., Araiza-Piña, B., Yáñez-Hernández, J., 2011. Digestibilidad de proteína, aminoácidos, fósforo, calcio y energía en dietas sorgo-pasta de soya adicionadas con fitasa en cerdos jóvenes. *Agrociencia*. 45, 315-324.
- Sands, J.S., Dilger, R.N., Ragland, D., Adeola, O., 2007. Ileal amino acid and phosphorus digestibility responses of pigs to microbial phytase supplementation of high-phytin diets. *Livestock Science*. 109, 208-211.
- Sands, J.S., Ragland, D., Dilger, R.N., Adeola, O., 2009. Responses of pigs to *Aspergillus niger* phytase supplementation of low-protein or high-phytin diets. *Journal of Animal Science*. 87, 2581-2589.
- Sauer, W., Mosenthin, R., Ahrens, F., Den Hartog, L., 1991. The effect of source of fiber on ileal and fecal amino acid digestibility and bacterial nitrogen excretion in growing pigs. *Journal of Animal Science*. 69, 4070-4077.
- Sauer, W.C., Ozimek, L., 1986. Digestibility of amino acids in swine: Results and their practical applications. A review. *Livestock Production Science*. 15, 367-388.
- Sauvant, D., Schmidely, P., Daudin, J.J., St-Pierre, N.R., 2008. Meta-analyses of experimental data in animal nutrition. *Animal*. 2, 1203-1214.
- Schulze, H., Van Leeuwen, P., Verstegen, M., Van den Berg, J., 1995. Dietary level and source of neutral detergent fiber and ileal endogenous nitrogen flow in pigs. *Journal of Animal Science*. 73, 441-448.
- Selle, P.H., Cowieson, A.J., Cowieson, N.P., Ravindran, V., 2012. Protein-phytate interactions in pig and poultry nutrition: a reappraisal. *Nutrition Research Reviews*. 25, 1-17.
- Selle, P.H., Ravindran, V., 2008. Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. *Livestock Science*. 113, 99-122.

- Selle, P.H., Ravindran, V., Caldwell, A., Bryden, W.L., 2000. Phytate and phytase: consequences for protein utilisation. *Nutrition Research Reviews*. 13, 255-278.
- Shim, Y., Chae, B., Lee, J., 2003. Effects of phytase and carbohydrases supplementation to diet with a partial replacement of soybean meal with rapeseed meal and cottonseed meal on growth performance and nutrient digestibility of growing pigs. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*. 16, 1339-1347.
- St-Pierre, N., 2001. Invited review: Integrating quantitative findings from multiple studies using mixed model methodology1. *Journal of dairy science*. 84, 741-755.
- Stein, H.H., Seve, B., Fuller, M., Moughan, P., De Lange, C., 2007. Invited review: Amino acid bioavailability and digestibility in pig feed ingredients: Terminology and application. *Journal of Animal Science*. 85, 172-180.
- Taylor, S., Cromwell, G., Lindemann, M., Knabe, D., 2001. Effects of level of supplemental phytase on ileal digestibility of amino acids, calcium, and phosphorus in dehulled soybean meal for growing pigs. *Journal of Animal Science*. 79, 2634-2642.
- Wenk, C., 2001. The role of dietary fibre in the digestive physiology of the pig. *Animal Feed Science and Technology*. 90, 21-33.
- Williams, B.A., Verstegen, M.W., Tamminga, S., 2001. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutrition Research Reviews*. 14, 207-228.
- Woyengo, T.A., Sands, J.S., Guenter, W., Nyachoti, C.M., 2008. Nutrient digestibility and performance responses of growing pigs fed phytase- and xylanase-supplemented wheat-based diets. *Journal of Animal Science*. 86, 848-857.
- Yáñez, J., Landero, J., Owusu-Asiedu, A., Cervantes, M., Zijlstra, R., 2013. Growth performance, diet nutrient digestibility, and bone mineralization in weaned pigs fed pelleted diets containing thermostable phytase. *Journal of Animal Science*. 91, 745-754.
- Yáñez, J.L., Beltranena, E., Cervantes, M., Zijlstra, R.T., 2011. Effect of phytase and xylanase supplementation or particle size on nutrient digestibility of diets containing distillers dried grains with solubles cofermented from wheat and corn in ileal-cannulated grower pigs. *Journal of Animal Science*. 89, 113-123.
- Zeng, Z.K., Piao, X.S., Wang, D., Li, P.F., Xue, L.F., Salmon, L., Zhang, H.Y., Han, X., Liu, L., 2011. Effect of Microbial Phytase on Performance, Nutrient Absorption and Excretion in Weaned Pigs and Apparent Ileal Nutrient Digestibility in Growing Pigs. *Asian-australas. Journal of Animal Science*. 24, 1164-1172.
- Zeng, Z.K., Wang, D., Piao, X.S., Li, P.F., Zhang, H.Y., Shi, C.X., Yu, S.K., 2014. Effects of Adding Super Dose Phytase to the Phosphorus-deficient Diets of Young Pigs on Growth Performance, Bone Quality, Minerals and Amino Acids Digestibilities. *Asian-australas. Journal of Animal Science*. 27, 237-246.

Chapitre 3 Prédiction de l'effet de la phytase sur la digestibilité iléale apparente des acides aminés chez le poulet : Méta-Analyse

Ce chapitre est présenté sous forme d'article et sera soumis dans la revue *Animal*.

Prediction of the effect of microbial phytase on the apparent amino acid digestibility of broiler chicken feeds: A meta-analysis

M. Zouaoui¹, F. Guay¹, M.P. Létourneau-Montminy^{1†}

¹*Département des sciences animales, Université Laval, Quebec City, Quebec, G1V 0A6, Canada*

Corresponding author : *Marie-Pierre Létourneau-Montminy*

E-mail : marie-pierre.letourneau-montminy@fsaa.ulaval.ca

Running title: Phytase and amino acid digestibility

3.1. Résumé

Le but de cette étude était de caractériser l'effet de la phytase sur la digestibilité des acides aminés chez le poulet par méta-analyse. L'ajout de 500 unités par kg d'aliment semble améliorer les coefficients de digestibilité selon l'acide aminé mesuré, cette amélioration est d'environ 2% en moyenne (Arg 1,36%, His 1,94%, Ile 1,88%, Leu 1,88%, Lys 1,33%, Met 0,73%, Phe 1,82%, Thr 2,62%, Val 1,71%, Tyr 2,17%, Cys 3,03%, Ala 1,69%, Asp 2,02%, Glu 1,59%, Gly 2,38%, Ser 2,47%, Pro 2,26%). La digestibilité (g d'acide aminé utilisé par kg d'aliment) augmente avec l'activité de la phytase et la teneur en acides aminés, avec des R^2 variant de 0,93 à 0,99. Aucune interaction n'a été décelée entre l'acide phytique et l'activité de la phytase. Cette étude confirme que la phytase améliore la digestibilité apparente des acides aminés dans les régimes alimentaires des poulets.

3.2. Abstract

Phytic acid is an indigestible phosphorus compound and anti-nutritional factor in monogastric animal diets. In broiler chickens, the negative effects of phytic acid over time go beyond limiting phosphorus absorption and affect protein and starch digestion. These effects can be reversed with phytase, an enzyme that breaks down phytic acid. The purpose of this study was to characterize the effect of microbial phytase on protein digestibility in terms of amino acid utilization and to quantify the impact of modulating factors such as amino acid and phytic acid contents using a meta-analysis tool in order to optimize feed formulation. The findings of 31 articles published between 1997 and 2016 describing 198 experimental dietary treatments of broiler chickens were entered into a database. Meta-analysis confirmed that microbial phytase improved apparent ileal digestibility (AID). Adding 500 units per kg of feed appears to improve AID coefficients by about 2% on average, depending on the amino acid measured (Arg 1.36%, His 1.94%, Ile 1.88%, Leu 1.88%, Lys 1.33%, Met 0.73%, Phe 1.82%, Thr 2.62%, Val 1.71%, Tyr 2.17%, Cys 3.03%, Ala 1.69%, Asp 2.02%, Glu 1.59%, Gly 2.38%, Ser 2.47%, Pro 2.26%). Coefficients of determination (R^2) varied from 0.72 for Gly to 0.90 for Arg. Digestibility (g of amino acid utilized per kg of feed) increased with microbial phytase activity and amino acid content, with R^2 varying from 0.93 for Cys to 0.99 for most amino acids. Phytic acid interferes with digestibility measured in terms of all amino acids except Arg, Met, Cys and Pro but does not decrease phytase activity on amino acid digestibility. This study confirms that microbial phytase improves the apparent amino acid digestibility of broiler chicken diets in terms of amino acid utilization.

Keywords: amino acids, apparent digestibility, broiler, meta-analysis, phytase.

3.3. Introduction

Phytate, the mixed salt of phytic acid (myo-inositol hexaphosphate) derived from plant-sourced feed ingredients, is present in broiler chicken feeds at a fairly constant level of about 0.2%. The anti-nutritional properties of phytate are well known. This compound may bind many nutrients, including cations, protein and starch. It is also a major source of phosphorus in the broiler diet, but only if sufficient phytase activity is present. In monogastric animals, this activity is weak in the upper portion of the gastrointestinal tract (Kies et al., 2001). In the case of broiler chickens, about 82% of the phytic acid ends up in excreta unless phytase is added to the feed (Cowieson et al., 2004). A microbial phytase is used for this purpose, and has been classified as an alternative source of phosphorus and viable means of reducing phosphorus excretion for environmental benefits (Selle et al., 2008). In addition to releasing phosphorus, phytate hydrolysis improves the availability of cations (primarily Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} and Mg^{2+}) by reducing the ability of phytates to chelate with these ions (Selle et al., 2012). Chelation of divalent cations between proteins and phytate is observed *in vitro*. Van der Klis and Versteegh (1991) were among the first to report a beneficial effect of microbial phytase on protein availability in poultry, but the mechanism involved remains unknown (Selle et al., 2008). Among the ways that phytate might increase endogenous losses of nutrients is *de novo* formation of binary and ternary complexes between proteins, minerals and phytate in the gastrointestinal tract (Cowieson and Ravindran, 2007). Some complexes formed with released peptides or amino acids might also be non-absorbable. These factors may be interdependent. Given the considerable number of publications on the effect of phytase on feed digestibility in broilers and the inconsistency of the results, the meta-analysis tool was chosen in order to gain better understanding of the processes involved. Meta-analysis is suitable for summarizing and quantifying knowledge acquired through published research (Sauvant et al., 2008). This method was used previously to study the effect of phytase on feed digestibility in growing pigs (Zouaoui et al., 2018). This study showed that microbial phytase provided an improvement in apparent ileal digestibility (amino acid utilization) and that the phytic acid and fibre contents had no effect on this response, suggesting that the mechanism of greatest concern is the one involving endogenous losses of amino acids.

Since phytic acid and amino acid contents play a significant role in apparent digestibility and phytic acid interacts with other components such as divalent cations, the objective of this meta-analysis was to quantify and hierarchize the impact of these factors and their interactions on digestibility in response to microbial phytase in broiler chickens.

3.4. Materials and methods

Data collection and coding

Studies of the effect of microbial phytase on the digestibility of broiler feeds were retrieved from public databases (e.g. Web of Science, CAB abstracts, Prod INRA and Science Direct) using keywords such as amino acid, phytase, apparent ileal digestibility and broilers. This yielded a dataset derived from 31 publications published between 1997 and 2016 describing 198 experimental treatments. General information (e.g. author name, date of publication, name of journal, objective of study), qualitative data (e.g. sex, inert marker used, supplier and source of phytase) and quantitative data (e.g. dietary crude protein, amino acid, calcium, phosphorus, phytic acid, acid-detergent fibre, neutral-detergent fibre, plant phytase and microbial phytase) were included. The phytase activity unit “FTU” refers to the phytase activity that liberates 1 μmol of inorganic P per minute from sodium phytate present in excess at 37°C at pH 5.5. When chemical composition was not provided in the publication, it was calculated from INRA tables of feedstuffs (Sauvant et al., 2004). Values were thus calculated for amino acids (65% of cases), calcium (20 %), phytic acid (43 %) and neutral-detergent fibre (94%). A code was assigned to each publication in the database (Sauvant et al., 2008). All data collected referred to apparent rather than true or standardised digestibility in the ileum.

Data compilation and statistical analysis models

All variables and possible interactions evaluated in the meta-analysis were tested as predictors of apparent feed digestibility by broiler chickens, in terms of amino acid availability expressed

as the AID coefficient (%) and the digestible amino acid content (g/kg diet), which was calculated from the product of AID and total amino acid content of the feed.

Particular attention was given to the meta-design (Sauvant et al., 2008), whereas the relationship between the independent variables taken two by two was identified graphically to assess the extent of variation in each experiment and to identify outliers and co-linearity. A graphical analysis of independence with respect to each dependent variable was performed to classify relationship structure as linear or nonlinear (Sauvant et al., 2008). The within-experiment and between-experiment responses of dependent variables (coefficient of apparent ileal digestibility and apparent ileal digestible content) to covariates (added microbial phytase, concentrations of amino acids, calcium, phytic acid and neutral-detergent fibre) were examined carefully. Descriptive statistics were generated for each variable in the selected groups (Table 3-1). The “study” was considered as a random effect as suggested by Sauvant (2008) and St-Pierre (2001), since the database is being treated as a large population of studies, each of which represents the sum of the effects of many factors, all with small effects on the dependent variable (St-Pierre, 2001; Sauvant et al., 2008).

Relationships between response Y and the main explanatory variables X (microbial phytase, amino acid, calcium, phytic acid and neutral detergent fibre concentrations) were studied using the following quadratic model:

$$Y_{ij} = \mu + \mu_i + \beta_1 X_{ij} + \beta_2 [X_{ij}]^2 + e_{ij}$$

Where Y_i is the dependent variable Y in experiment i with level j of microbial phytase, X_{ij} is the independent variable, μ is the overall intercept across all studies; μ_i is the effect of experiment i on the intercept μ with the condition that $\sum \mu_i = 0$, β_1 and β_2 are respectively the linear and quadratic coefficients of the relationship and e_{ij} is the residual error. All statistical analyses were carried out using the MIXED procedure of SAS software version 9.4. All variables found significant ($P < 0.05$) were retained and the interactions between these variables were tested.

Table 3-1 Descriptive statistics extracted from the databases.

Variable	n	Mean	s.d.	Min	Max
Independent variables					
Composition of diet					
Crude protein (g/kg diet)	198	209.76	49.020	73.30	483.00
Neutral-detergent fibre (g/kg diet)	174	104.76	15.970	0.00	136.00
Calcium (g/kg diet)	194	8.65	1.831	5.10	13.00
Phytic acid (g/kg diet)	188	2.95	1.402	0.08	7.80
Exogenous phytase (FTU/kg)	115	993.35	974.888	125.00	5000.00
Amino acid composition (g/kg diet)					
Arginine	198	14.18	5.441	3.10	51.90
Histidine	198	5.59	2.039	1.30	14.60
Isoleucine	198	8.65	2.567	2.90	23.70
Leucine	198	16.97	3.883	7.30	38.80
Lysine	198	11.54	3.363	1.90	30.60
Methionine	185	4.90	1.403	1.37	11.60
Phenylalanine	198	9.86	2.904	0.00	25.30
Threonine	198	7.78	2.389	0.93	18.40
Tryptophan	188	2.31	0.597	0.45	5.65
Valine	197	10.23	2.968	3.90	25.80
Tyrosine	198	7.01	2.070	2.10	19.50
Cysteine	188	3.37	0.635	1.65	6.18
Alanine	198	10.18	2.195	3.80	20.90
Aspartic acid	198	19.67	6.158	3.00	56.80
Glutamic acid	194	37.94	8.789	14.80	82.30
Glycine	192	8.46	2.405	2.60	20.00
Serine	198	9.70	2.168	2.90	20.90
Proline	185	11.74	2.065	6.83	21.63
Dependent variables					
Digestible amino acids (g/kg diet)					
Arginine	193	12.72	4.884	2.39	46.13
Histidine	195	4.60	1.629	0.94	12.19
Isoleucine	197	7.05	2.200	2.24	20.28
Leucine	196	14.19	3.468	6.08	33.17
Lysine	196	9.97	2.988	1.37	26.86
Methionine	131	4.61	1.264	1.50	10.62
Phenylalanine	196	8.27	2.519	0.00	21.83
Threonine	198	5.94	1.888	0.69	14.62
Tryptophan	61	1.97	0.472	0.47	3.19
Valine	195	8.27	2.421	2.92	21.77
Tyrosine	139	5.63	2.101	1.41	17.10
Cysteine	107	2.43	0.480	1.05	3.28
Alanine	141	8.23	2.016	2.83	17.74
Aspartic acid	147	15.95	5.547	2.13	47.31
Glutamic acid	49	36.57	13.830	12.25	79.29
Glycine	139	6.50	2.075	1.72	16.52
Serine	148	7.61	1.932	2.08	17.38
Proline	102	9.56	1.472	4.81	12.28
Apparent ileal digestibility (%)					

Arginine	193	88.81	4.110	69.00	96.00
Histidine	198	82.98	5.013	69.60	97.30
Isoleucine	197	81.27	6.227	55.80	97.80
Leucine	198	83.50	5.651	64.20	96.60
Lysine	196	86.07	5.466	57.60	96.00
Methionine	132	90.71	3.178	78.00	95.00
Phenylalanine	198	83.56	4.862	55.70	91.80
Threonine	198	76.11	6.156	52.40	91.70
Tryptophan	61	80.74	4.854	65.10	88.62
Valine	196	80.80	5.159	57.00	96.60
Tyrosine	139	82.43	7.571	54.80	97.86
Cysteine	107	72.73	8.260	51.80	89.00
Alanine	141	81.83	4.214	66.90	89.20
Aspartic acid	147	81.51	5.243	60.60	90.10
Glutamic acid	149	87.52	3.899	72.00	94.40
Glycine	139	77.61	5.215	62.10	86.50
Serine	148	79.77	5.720	60.80	90.40
Proline	102	82.07	5.082	69.30	91.50

Model evaluation

A cross validation was added to test the accuracy of equations generated. The predicted values (X) and observed values (Y) were compared ($X - Y$) to provide internal validation, given that all data were used to run the model. The model was considered unbiased when the intercept was not significantly different from 0 ($P > 0.05$) and the slope was not significantly different from 1 ($P > 0.05$). The leave-one-out cross-validation was used to obtain the RMSEP (root mean square error of prediction) from the value of the PRESS (predicted residual sum of squares) statistic (Causeur, 2003). The RMSE (root mean square error) and the RMSEP were used to test the accuracy of equations at predicting the apparent amino acid digestibility and the apparent digestible content (amino-acid-yielding) of the diet.

3.5. Results

Prediction of apparent ileal digestibility based on amino acid utilization

The general regression equations for apparent ileal digestibility based on essential and non-essential amino acids had a significant positive intercept for all amino acids (Table 3-2). The “study” effect on the intercept was significant ($P < 0.001$) for all amino acids. Amino acid concentration had positive and linear effect on apparent digestibility in the cases of Arg, His, Lys, Tyr, Ala, Asp, Gly, Ser ($P < 0.001$), Ile, Thr, Val ($P = 0.001$) and Phe ($P < 0.01$) but not Leu, Met, Cys, Glu or Pro. Phytase had a linear ($P < 0.001$) and quadratic effect ($P < 0.01$) for all amino acids. Apparent ileal digestibility and phytic acid were correlated negatively and linearly for all amino acids ($P < 0.05$) except Arg, Met, Cys and Pro. However, when the analysis was carried out on a sub-database containing treatments with diets containing less than 0.2% phytic acid, which is more common in broiler diets, phytic acid had no effect on apparent ileal digestibility (results not shown). No interactions between microbial phytase and other variables were found, regardless of the database subset used. The coefficient of determination (R^2) ranged from 0.72 for Gly to 0.90 for Arg. About 50–60% of the variance was attributable to the experimental effect.

Using cross validation, discrepancies between experimental means and predicted means were determined ($d = \text{mean} [\text{observed value} - \text{predicted value}]$) for essential amino acids (Table 3-3) and non-essential amino acids (Table 3-4).

Table 3-2 Prediction of apparent ileal digestibility of broiler feed based on essential and non-essential amino acids (%) as a function of microbial phytase activity, amino acid concentration and phytic acid content.

Amino acid	N	General regression equation (model)	P-value					R ²	RMSE	RMSEP
			Intercept	AA	Phytase	Phytic acid	Phytase*Phytase			
Arginine	193	Y=84.21+0.28a+0.26b -0.19c-4.43 ×10 ⁻³ b ²	<0.001	<0.001	<0.001	NS	<0.001	0.90	0.81	1.63
Histidine	198	Y=80.64+0.56a+0.35b -0.71c-6.47×10 ⁻³ b ²	<0.001	<0.001	<0.001	<0.01	<0.001	0.79	0.94	2.68
Isoleucine	197	Y= 80.23+ 0.32a+ 0.33b - 0.89c- 5.76×10 ⁻³ b ²	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.84	1.02	2.73
Leucine	198	Y= 83.99+ 0.10a+ 0.34b - 1.14c- 6.25×10 ⁻³ b ²	<0.001	NS	<0.001	<0.001	<0.001	0.85	1.04	2.55
Lysine	196	Y= 81.56+ 0.43a+ 0.25b - 0.33c- 4.48 ×10 ⁻³ b ²	<0.001	<0.001	<0.001	<0.05	<0.001	0.88	0.81	1.86
Methionine	132	Y=89.34+0.29a+0.15b-0.33c-3.19×10 ⁻³ b ²	<0.001	NS	<0.001	NS	<0.01	0.80	1.16	1.57
Phenylalanine	198	Y= 82.51+ 0.24a+ 0.33b - 0.85c- 5.91×10 ⁻³ b ²	<0.001	<0.01	<0.001	<0.001	<0.001	0.77	0.87	2.36
Threonine	198	Y= 72.04+ 0.72a+ 0.43b - 0.98c -7.65 ×10 ⁻³ b ²	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.78	1.00	3.18
Valine	196	Y= 79.24+ 0.33a+ 0.30b - 0.90c -5.38×10 ⁻³ b ²	<0.001	0.001	<0.001	0.001	<0.001	0.78	0.94	2.74
Tyrosine	139	Y=77.85+0.88a+0.39b-0.73c-7.07×10 ⁻³ b ²	<0.001	<0.001	<0.001	<0.01	<0.001	0.89	1.14	3.06
Cysteine	107	Y=81.51-3.42a+0.48b+0.34c-8.36×10 ⁻³ b ²	<0.001	NS	<0.001	NS	<0.01	0.82	2.80	4.66
Alanine	141	Y=79.08+ 0.45a+0.30b-1.13c-5.66×10 ⁻³ b ²	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.74	0.95	2.51
Aspartic acid	147	Y= 78.75+ 0.15a+ 0.35b - 0.61c -5.61×10 ⁻³ b ²	<0.001	<0.001	<0.001	<0.01	<0.001	0.86	0.94	2.30

Glutamic Acid	149	$Y=86.62+0.03a+0.30b-0.59c-5.25\times 10^{-3} b^2$	<0.001	NS	<0.001	<0.01	<0.001	0.81	0.98	2.08
Glycine	139	$Y=75.70+0.64a+0.40b-1.55c-7.51\times 10^{-3} b^2$	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.72	0.96	3.34
Serine	148	$Y= 77.98+ 0.47a+ 0.42b - 1.45c -7.40\times 10^{-3} b^2$	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.75	1.07	3.21
Proline	102	$Y=89.74-0.93a+0.40b+0.73c-6.90\times 10^{-3} b^2$	<0.001	NS	<0.001	NS	<0.001	0.76	2.65	3.17

N = number of studies.

Y = apparent ileal digestibility (%)

a = effect of amino acid concentration (g/kg diet)

b = effect of added microbial phytase activity (FTU/kg)

c = effect of phytic acid concentration (g/kg diet)

NS = effect not significant

Table 3-3 Apparent essential amino acid digestibility of observed in experimental diets and predicted by the tested models

	Arginine AID	Histidine AID	Isoleucine AID	Leucine AID	Lysine AID	Methionine AID	Phenylalanine AID	Threonine AID	Valine AID	Tyrosine AID	Cysteine AID
Experimental mean	0.886	0.828	0.813	0.835	0.863	0.909	0.835	0.760	0.810	0.829	0.724
Predicted mean	0.886	0.827	0.814	0.836	0.864	0.909	0.836	0.760	0.809	0.830	0.723
d ^a	0.000	0.001	-0.001	-0.001	-0.001	0.000	-0.001	0.000	0.001	-0.001	0.001
Regression equation ^b											
a	1.441	0.828	0.395	1.358	1.113	2.795	1.553	1.943	2.108	2.113	2.667
P-value ^c	0.650	0.845	0.907	0.693	0.717	0.631	0.731	0.633	0.627	0.555	0.583
b	0.984	0.990	0.995	0.983	0.987	0.969	0.981	0.974	0.973	0.974	0.964
P-value ^c	0.644	0.844	0.906	0.690	0.714	0.629	0.728	0.630	0.624	0.546	0.587
R ^{2d}	0.82	0.68	0.77	0.77	0.82	0.66	0.66	0.65	0.66	0.81	0.69
RMSEP ^e	1.63	2.68	2.73	2.55	1.86	1.57	2.36	3.18	2.74	3.06	4.66

AID, apparent ileal digestibility.

^a Mean deviation from the bisector expressed.

^b The equation is: $Y_{obs} = a + bY_{pred}$.

^c P-value that a and b differ from 0 and 1 respectively.

^d R², coefficient of determination.

^e RMSEP, root mean square error of prediction.

Table 3-4 Apparent non-essential amino acid digestibility observed in experimental diets and predicted by the tested models.

	Alanine AID	Aspartic Acid AID	Glutamic Acid AID	Glycine AID	Serine AID	Proline AID
Experimental mean	0.818	0.815	0.876	0.778	0.797	0.819
Predicted mean	0.819	0.816	0.876	0.777	0.796	0.818
d ^a	-0.001	-0.001	0.000	0.001	0.001	0.001
Regression equation ^b						
a	3.581	0.813	2.465	2.064	0.449	1.901
P-value ^c	0.562	0.838	0.640	0.723	0.932	0.772
b	0.955	0.989	0.971	0.973	0.994	0.977
P-value ^c	0.555	0.832	0.637	0.723	0.933	0.774
R ^{2d}	0.58	0.77	0.68	0.58	0.64	0.62
RMSEP ^e	2.51	2.30	2.08	3.34	3.21	3.17

AID, apparent ileal digestibility.

^a Mean deviation from the bisector expressed.

^b The equation is: $Y_{obs} = a + bY_{pred}$.

^c P-value that a and b differ from 0 and 1 respectively.

^d R², coefficient of determination.

^e RMSEP, root mean square error of prediction.

For all amino acids, the intercept was not significantly different from 0 and the slope was not significantly different from 1. The models presented low RMSE (0.81–2.80). The coefficients of determination were high (0.58–0.82) and the RMSEP was low (< 4.7%). Assessment of the quality of prediction of AID by the model using the example of lysine showed good accuracy (Figure 3-1).

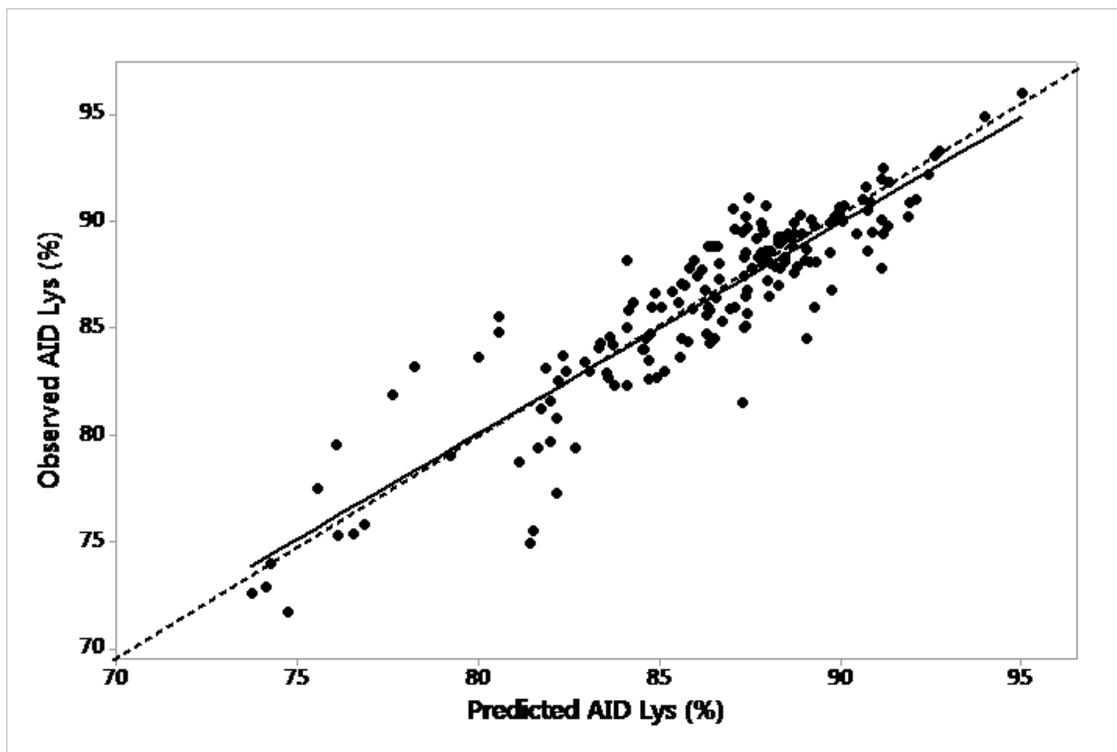


Figure 3-1 Regression analysis of the relationship between observed apparent ileal digestibility based on lysine (Lys) and apparent ileal digestibility predicted by the model. Dashed line represents $Y = X$. Black = tested model.

Prediction of ileal digestible content

The intercept was non-significant for digestible content for all amino acids except for Lys, Ala and Asp ($P < 0.05$, Table 3-5). Concentration of amino acids in the feed had a positive and linear effect on digestible content for all amino acids ($P < 0.001$). Added phytase had both linear ($P < 0.001$) and quadratic ($P < 0.05$) effects on digestible content for all amino acids

except Glu, which showed only a linear effect ($P < 0.05$). The R^2 values of the models ranged from 0.93 for Cys to 0.96–0.99 for the other amino acids, and the experiment effect was significant but small (1–4% except for Cys for which it represented 23% of the variance). The apparent digestible content and phytic acid concentration were negatively and linearly correlated for most amino acids ($P < 0.05$) except Met, Cys and Pro. No interactions between microbial phytase and other variables were found.

For all amino acids, cross-validation showed non-significant intercepts and slopes not significantly different from 1 (Table 3-6 and Table 3-7). The developed models presented low RMSE (0.20–0.90), the coefficient of determination was high (0.89–0.99) and the RMSEP was low (< 1%).

Table 3-5 Prediction of apparent ileal digestible content of broiler feed based on essential and non-essential amino acids as function of microbial phytase activity, amino acid concentration and phytic acid content.

Amino acid	N	General regression equation (model)	P-value					R ²	RMSE	RMSEP
			Intercept	AA	Phytase	Phytic acid	Phytase * Phytase			
Arginine	193	Y= -0.11+ 0.90a+ 0.03b - 0.09c- 5.80 ×10 ⁻⁴ b ²	NS	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.99	0.27	0.19
Histidine	195	Y=-0.08+ 0.85a+ 0.02b- 0.02c-3.10×10 ⁻⁴ b ²	NS	<0.001	<0.001	<0.05	<0.001	0.99	0.21	0.13
Isoleucine	197	Y=-0.14+0.85a+0.03b-0.08c-4.90×10 ⁻⁴ b ²	NS	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.99	0.30	0.22
Leucine	196	Y= 0.02+ 0.85a+ 0.05b- 0.15c- 9.00×10 ⁻⁴ b ²	NS	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.99	0.41	0.35
Lysine	196	Y= 0.17+ 0.88a+ 0.03b -0.12c-4.50×10 ⁻⁴ b ²	<0.05	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.99	0.26	0.21
Methionine	131	Y=-0.06+0.92a+0.01b-0.02c-1.60×10 ⁻⁴ b ²	NS	<0.001	<0.001	NS	<0.001	0.99	0.25	0.07
Phenylalanine	196	Y= -0.10+ 0.86a+0.03 b -0.07c-5.10×10 ⁻⁴ b ²	NS	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.99	0.26	0.20
Threonine	198	Y= 0.01+ 0.78a+ 0.03b - 0.09c -5.60×10 ⁻⁴ b ²	NS	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.98	0.27	0.25
Valine	195	Y= -0.07+ 0.84a+ 0.03b -0.12c -5.20×10 ⁻⁴ b ²	NS	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.99	0.29	0.28
Tyrosine	139	Y=-0.15+0.88a+0.02b-0.08c-4.30×10 ⁻⁴ b ²	NS	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.99	0.27	0.16
Cysteine	107	Y=0.57+0.53a+0.02b+4.81×10 ⁻³ c-2.50×10 ⁻⁴ b ²	NS	<0.001	<0.001	NS	<0.05	0.93	0.51	0.15
Alanine	141	Y=-0.25+0.86a+0.03b-0.11c-5.60×10 ⁻⁴ b ²	<0.05	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.99	0.29	0.22
Aspartic acid	147	Y= 0.51+ 0.80a+ 0.06b -0.14c -9.4×10 ⁻⁴ b ²	<0.05	<0.001	<0.001	<0.05	<0.001	0.99	0.43	0.39

Glutamic Acid	49	$Y = -0.90 + 0.89a + 0.06b - 0.27c - 1.10 \times 10^{-3}b^2$	NS	<0.001	<0.05	<0.05	NS	0.99	0.88	0.93
Glycine	139	$Y = 0.13 + 0.82a + 0.03b - 0.20c - 6.30 \times 10^{-4}b^2$	NS	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.97	0.30	0.37
Serine	148	$Y = -0.04 + 0.83a + 0.04b - 0.15c - 7.00 \times 10^{-4}b^2$	NS	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.98	0.33	0.31
Proline	102	$Y = 1.43 + 0.66a + 0.05b + 0.07c - 8.20 \times 10^{-4}b^2$	NS	<0.001	<0.001	NS	<0.001	0.96	0.90	0.36

N = number of studies

Y = apparent ileal digestible indispensable amino acid (g/kg diet)

a = effect of amino acid concentration (g/ kg diet)

b = effect of added microbial phytase activity (FTU/kg)

c = effect of phytic acid concentration (g/kg diet)

NS = effect not significant

Table 3-6 Apparent digestible essential amino acid observed in experimental diets and predicted by the tested models.

	Arginine	Histidine	Isoleucine	Leucine	Lysine	Methionine	Phenylalanine	Threonine	Valine	Tyrosine	Cysteine
Experimental mean	12.426	4.570	6.982	14.103	9.923	4.718	8.176	5.893	8.191	5.625	2.426
Predicted mean	12.427	4.570	6.980	14.102	9.922	4.717	8.176	5.892	8.190	5.624	2.425
d ^a	-0.001	0.000	0.002	0.001	0.001	0.001	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001
Regression equation ^b											
a	-0.004	0.001	0.014	-0.016	-0.022	0.003	0.002	-0.004	-0.016	-0.017	0.001
P-value ^c	0.931	0.989	0.808	0.887	0.694	0.909	0.975	0.945	0.836	0.698	0.988
b	1.000	1.000	1.000	1.001	1.002	0.999	0.999	1.000	1.002	1.003	1.000
P-value ^c	0.947	0.978	0.777	0.875	0.665	0.919	0.977	0.930	0.817	0.661	0.994
R ^{2d}	0.99	0.99	0.98	0.98	0.99	0.99	0.99	0.98	0.98	0.99	0.89
RMSEP ^e	0.19	0.13	0.22	0.35	0.21	0.07	0.20	0.25	0.28	0.16	0.15

^a Mean deviation from the bisector expressed.

^b The equation is: $Y_{obs} = a + bY_{pred}$.

^c P-value that a and b differ from 0 and 1 respectively.

^d R², coefficient of determination.

^e RMSEP, root mean square error of prediction

Table 3-7 Apparent digestible non-essential amino acid observed in experimental diets and predicted by the tested models.

	Alanine	Aspartic Acid	Glutamic Acid	Glycine	Serine	Proline
Experimental mean	8.084	15.854	33.560	6.432	0.756	9.518
Predicted mean	8.085	15.846	33.559	6.428	0.755	9.515
d ^a	-0.001	0.008	0.001	0.004	0.001	0.003
Regression equation ^b						
a	0.005	-0.216	0.107	-0.018	-0.034	0.034
P-value ^c	0.953	0.125	0.843	0.872	0.766	0.890
b	0.999	1.014	0.996	1.003	1.005	0.996
P-value ^c	0.937	0.093	0.836	0.836	0.738	0.897
R ^{2d}	0.98	0.99	0.99	0.96	0.97	0.94
RMSEP ^e	0.22	0.39	0.938	0.37	0.31	0.36

^a Mean deviation from the bisector expressed.

^b The equation is: $Y_{obs} = a + bY_{pred}$.

^c P-value that a and b differ from 0 and 1 respectively.

^d R², coefficient of determination.

^e RMSEP, root mean square error of prediction.

3.6. Discussion

The effect of microbial phytase on digestibility of amino acids in pig and broiler chicken feeds remains the subject of debate (Selle and Ravindran, 2007). As is the case for pig feed, variable results are obtained with chicken feed containing phytase and contradictory explanations are proposed. Meta-analysis should make some general conclusions possible regarding the effects on amino acid utilization (Sauvant et al., 2008). The models in the present study confirm and quantify the positive effect of microbial phytase on digestibility reported in previous meta-analyses of pig feed studies (Cowieson et al., 2017a; Zouaoui et al., 2018).

In this study, a negative relationship was found between phytic acid concentration and the AID for most amino acids, which is consistent with previous findings (Cowieson et al., 2017b), thus confirming that phytic acid decreases feed digestibility in terms of amino acid utilization. For example, increasing phytic P from 1.5 to 2.5 g/kg reduced lysine utilization by 0.12 g/kg. It has been shown that increasing phytic acid from 2.8 to 3.8 g/kg resulted in a significant decrease in amino acid utilization ($P < 0.05$) in broiler chicken feed (Ravindran et al., 2006). Similar effects have been noted in earlier studies (Ravindran et al., 2000). The mechanisms underlying the changes in protein digestibility and amino acid utilization observed in response to added phytase are not clear. One objective of the present study was to understand how phytase improves digestibility in the animal gut and to quantify its effect. In feedstuffs, ternary protein – phytate – mineral (Ca and Mg) are present (Selle et al., 2006). The fate of phytic acid in the gastrointestinal tract depends largely on pH. Ingested phytic acid can form binary complexes with proteins at the pH encountered in the proventriculus (Selle and Ravindran, 2007), which is below the isoelectric point of most proteins (Cosgrove, 1966). Such complexes are refractory to digestion by pepsin (Camus and Laporte, 1976). It has been shown that the formation of these complexes is a bi-phase reaction beginning with phytate binding to change the conformation of the protein, which then forms aggregates that eventually exceed a critical size and precipitate (Selle and Ravindran, 2008). It has been shown *in vitro* that phytate can reduce the solubility of soy protein concentrate at pH 2 by 82% (Gifford and Clydesdale, 1990). In the small intestine, the pH is above the isoelectric

point of proteins and ternary complexes between protein, phytic acid and minerals are formed (Selle et al., 2012). In the gastrointestinal tract of broiler chickens, *de novo* formation of calcium-phytate complexes is extensive (Selle et al., 2009). Phytate binds to protein *via* Ca^{2+} , which provides a cationic bridge. Magnesium and zinc also provide cationic bridges (Selle et al., 2009).

Phytic acid has also been shown to increase mucin secretion by 50% in the broiler chicken small intestine (Onyango et al., 2009), which increases endogenous amino acid flux (Ravindran et al., 1999). This is another mechanism that might explain the increase in amino acid utilization efficiency obtained by adding phytase to the feed. Mucins are proteins that cover and protect epithelial cells and are rich in Thr, Pro and Ser (Lang et al., 2007). Their synthesis and sloughing can represent non-negligible losses. In most studies in monogastric animals, Thr presents the greatest response to phytase among the essential amino acids (Selle et al., 2012). This is consistent with results noted recently in pigs (Zouaoui et al., 2018). In the present study, Cys digestibility was found to respond very well to the action of phytase (Figure 3-2), which is in agreement with recent results in broilers (Cowieson et al., 2017b). The greatest effect of phytase on Thr, Ser and Asp and their abundance in mucin and pepsin support the hypothesis that breaking down phytic acid decreases secretions rich in these amino acids. In older studies, Cowieson (2004) observed an increase in excretion of sialic acid (a constituent of mucoprotein) in broilers, from 1.87 mg per bird per 48 h to 5.33 mg per bird per 48 h following the addition of 1 g of phytic acid per kg to the diet. The increased losses of amino acids were very likely caused by phytic acid stimulating secretion of mucin (Selle and Ravindran, 2007). Increases in mucin secretion appear to accompany compensation for inhibition of digestive enzymes by protein-phytate complexes (Selle and Ravindran, 2008; Onyango et al., 2009), which includes increased secretion of HCl in addition to pepsin in order to hydrolyse protein (Cowieson and Ravindran, 2007).

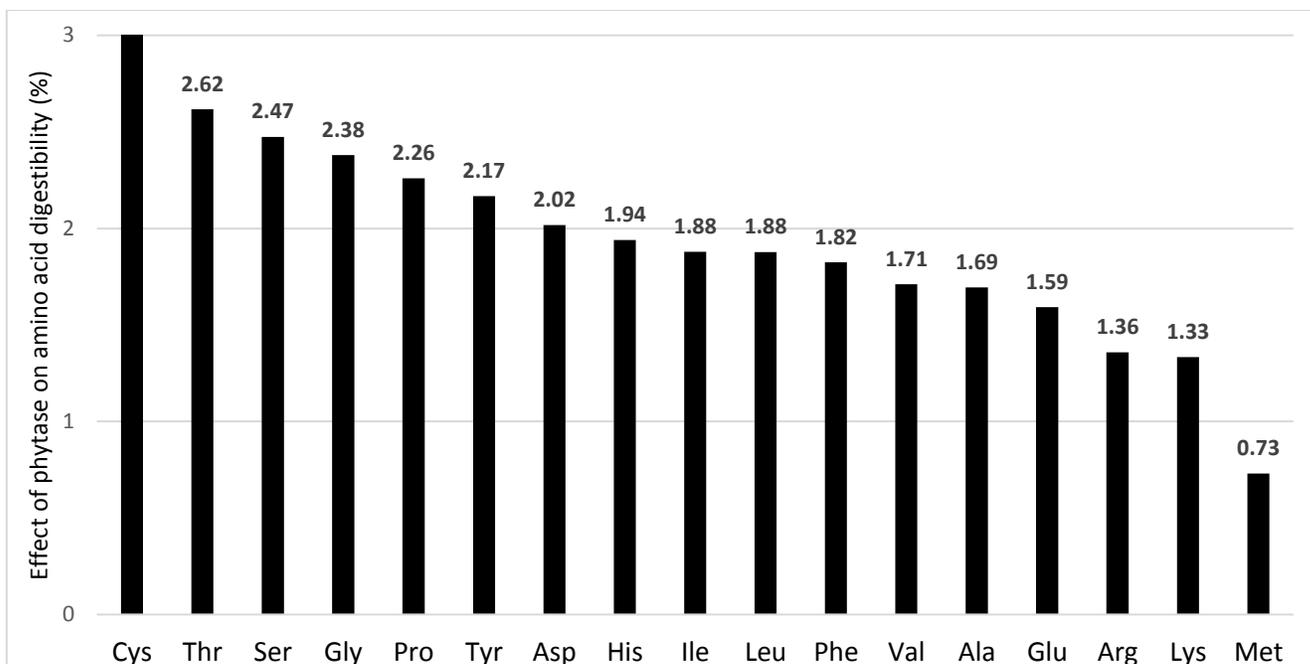


Figure 3-2 Effect of microbial phytase (500 FTU/kg) on the apparent ileal digestibility of broiler chicken feed.

In summary, phytic acid appears to reduce apparent protein digestibility by increasing endogenous losses of amino acids, and adding phytase improves amino acid utilization, thus resulting in increased apparent ileal digestibility. With 500 FTU per kg of feed, the apparent digestibility is improved regardless of which amino acid is measured (Arg 1.36%, His 1.94%, Ile 1.88%, Leu 1.88%, Lys 1.33%, Met 0.73%, Phe 1.82%, Thr 2.62%, Val 1.71%, Tyr 2.17%, Cys 3.03%, Ala 1.69%, Asp 2.02%, Glu 1.59%, Gly 2.38%, Ser 2.47%, Pro 2.26%). According to this study, 500 FTU of phytase could replace 0.14, 0.17 and 0.05 g of Lys, Thr and Met respectively. At 600 FTU per kg, this study shows an average improvement of 1.9% of apparent ileal digestible essential amino acid content, compared to 0.3% reported previously (Selle et al., 2012). Adding phytase at these levels appears to be more economical than increasing the supply of nutrients in the feed. In this study, digestibility appears to increase with phytase activities of 2.500 FTU/kg and 3.500 FTU/kg, regardless of the amino acid measured. Based on cysteine, digestibility continues to increase with phytase up to 4.000 FTU/kg. However, it should be noted that only 6.6% of the studies in the database examined the effects of feeds containing phytase at these levels of activity.

This high level of phytase may improve amino acid utilization over its effect on P phytic releases. In fact, the additional effect of “super-doses” of phytase can be attributed to an increase in phytic acid destruction. This notion has appeared in recent years and is receiving attention because of its advantages in terms of N digestibility but also livestock performance and feed costs (Cowieson et al., 2011).

Although phytic acid affects protein digestibility negatively while phytase affects it positively, no interaction between phytic acid level and microbial phytase was found, which is in agreement with previous analysis (Cowieson et al., 2017b). Phytase appears to have the same impact on digestibility independently of phytic acid level, as found previously (Ravindran et al., 1999). Also, no interaction between calcium or phosphorus concentrations and phytase was demonstrated, which is consistent with what was found in recent studies of broiler chicken feed (Cowieson et al., 2017b) and pig feed (Zouaoui et al., 2018). This absence of interaction further supports the mucin mechanism rather than effects due to binary and tertiary complexes of phytic acid.

In addition to the phytase-phytate effect, a positive linear relationship was found between both the apparent ileal digestibility and the apparent ileal digestible content and dietary level regardless of amino acid. Since increases in the amino acid content of the feed reduce the relative endogenous contribution to the total amino acid contents of the ileal outflow, apparent ileal digestibility and apparent ileal digestible content should increase (Stein et al., 2007). It was suggested long ago that the contributions of endogenous amino acids decrease in response to increases in the feed (Fan et al., 1995). In general, this increase in apparent ileal digestibility is not linear but quadratic because it depends directly on the level of absorption and endogenous loss of amino acids and should continue as the content of the feed increases due to the relative lessening of the ileal endogenous flux (Fan et al., 1995). The quadratic effect does not appear at amino acid contents below the level at which the plateau is reached.

Meta-analysis relies on reviewing the literature to extract quantitative relationships between measurements of interest and deriving a regression equation for the prediction of future observations. Given that studies have more in common than observations across studies, the incorporation of the study effect as performed here, allows consideration of the blocking effect of studies and the heterogeneity of variances in order to estimate the parameters of the

regression without bias (St-Pierre et al., 2001). It is therefore interesting to note that in the models that predict the apparent ileal digestibility expressed as a percentage, the experiment explains up to 60% of the variance compared to about 4% for digestible amino acid content. This means that other criteria not included in examined scientific papers explain the digestible coefficient while the digestible content is related more to X (independent) variables.

In addition to quantifying the effect of phytase on the digestibility of broiler feed amino acid content, we sought to explain the difference between the digestibility responses of growing chickens and pigs to phytase. In broilers, the effect of phytase on ileal digestible content was both linear ($P < 0.001$) and quadratic ($P < 0.001$) for most amino acids. This is different from what has been shown in pigs, in which the effect of phytase was only linear for all amino acids. This may be due to larger doses of phytase in the broiler database, up to 5,000 FTU/kg compared to a largest dose of 1,900 FTU/kg in the pig database. It has been shown that ternary complexes of phytate and protein with calcium reduce phytase activity and phytate degradation (Selle and Ravindran, 2007). As was the case for pigs (Zouaoui et al., 2018), calcium does not affect digestibility in broilers. Calcium contents listed in the database vary between 5.10 g/kg and 13.00 g/kg, which covers the range used for broilers in the field. It should be noted also that within studies, calcium was generally maintained fixed while protein, amino acids and phytase varied, precluding the study of this interaction in any depth. Even though neutral-detergent fibre affects digestibility in pigs, its effect was absent in broilers. However, the phytase-supplemented pig feeds contained up to 23% neutral-detergent while the broiler feeds never contained more than 14%. It is well known that fibre reduces the utilization of feed amino acid content by increasing endogenous secretion either through accelerated sloughing of the intestinal mucosa or by adsorbing peptides, amino acids and digestive enzymes (Nyachoti et al., 1997). The absence of a negative effect of fibre on digestibility in broilers may be due to its lower level in broiler diets.

3.7. Conclusion

Reducing feed costs is a top priority in the poultry industry. Phytase can be a viable alternative to nutrient supplementation. This study confirmed that phytic acid is an anti-nutrient and quantified the positive effect of phytase on amino acid utilization in broilers. The beneficial effect of phytase seems to be related to the negative effect of phytic acid and independent of other dietary factors, given the absence of interactions between phytase and the other independent variables. The models examined in this study allow quantifying of the effect of microbial phytase on amino acid utilization for more efficient formulation of feeds.

Acknowledgement

The authors wish to thank Nutreco Canada, Prorec, Mixscience, Aliments Breton and NSERC for the financial support.

3.8. References

- Camus, M.C., Laporte, J.C., 1976. Inhibition de la protéolyse pepsique par le blé. Rôle de l'acide phytique des issues (Inhibition of pepsin proteolysis by wheat. Role of phytic acid in the outcome). *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*. 16, 719–729.
- Causeur, D., Daumas, G., Dhorne, T., Engel, B., Font, I., Fournols, M., Hojsgaard, S., 2003. *Statistical Handbook for Assessing Pig Classification Methods: Recommendations from the "EUPIGCLASS" Project Group*. EC working document.
- Cosgrove, D.J., 1966. The chemistry and biochemistry of inositol polyphosphates. *Reviews of pure and applied chemistry*. 16, 209–224.
- Cowieson, A. J., Acamovic, T., Bedford, M. R., 2004. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. *British Poultry Science*. 45, 101–108.
- Cowieson, A. J., Ruckebusch, J. P., Sorbara, J. O. B., Wilson, J. W., Guggenbuhl, P., Tanadini, L., Roos, F. F., 2017a. A systematic view on the effect of microbial phytase on ileal amino acid digestibility in pigs. *Animal Feed Science and Technology*. 231, 138–149.
- Cowieson, A. J., Ruckebusch, J. P., Sorbara, J. O. B., Wilson, J. W., Guggenbuhl, P., Roos, F. F., 2017b. A systematic view on the effect of phytase on ileal amino acid digestibility in broilers. *Animal Feed Science and Technology*. 225, 182–194.
- Cowieson, A. J., Wilcock, P., Bedford, M. R. 2011. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. *World's Poultry Science Journal*. 67, 225-236.
- Cowieson, A.J., Ravindran, V., 2007. Effect of phytic acid and microbial phytase on the flow and amino acid composition of endogenous protein at the terminal ileum of growing broiler chickens. *British Journal of Nutrition*. 98, 745–752.
- Fan, M. Z., Sauer, W. C., McBurney, M. I., 1995. Estimation by regression analysis of endogenous amino acid levels in digesta collected from the distal ileum of pigs. *Journal of Animal Science*. 73, 2319–2328.
- Gifford, S.R., Clydesdale, F.M., 1990. Interactions among calcium, zinc and phytate with three protein sources. *Journal of food science*. 55, 1720–1724.
- Kies, A. K., Van Hemert, K. H. F., Sauer, W. C., 2001. Effect of phytase on protein and amino acid digestibility and energy utilisation. *World's Poultry Science Journal*. 57, 109–126.
- Lang, T., Hansson, G. C., Samuelsson, T., 2007. Gel-forming mucins appeared early in metazoan evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104, 16209–16214.
- Nyachoti, C. M., Lange, C. D., McBride, B. W., Schulze, H., 1997. Significance of endogenous gut nitrogen losses in the nutrition of growing pigs: a review. *Canadian Journal of Animal Science*. 77, 149–163.
- Onyango, E. M., Asem, E. K., Adeola, O., 2009. Phytic acid increases mucin and endogenous amino acid losses from the gastrointestinal tract of chickens. *British journal of nutrition*. 101, 836–842.
- Ravindran, V., Morel, P. C., Partridge, G. G., Hruby, M., Sands, J. S., 2006. Influence of an *Escherichia coli*-derived phytase on nutrient utilization in broiler starters fed diets containing varying concentrations of phytic acid. *Poultry Science*. 85, 82–89.

- Ravindran, V., Cabahug, S., Ravindran, G., Bryden, W. L., 1999. Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broilers. *Poultry Science*. 78, 699–706.
- Ravindran, V., Cabahug, S., Ravindran, G., Selle, P. H., Bryden, W. L., 2000. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorous levels. II. Effects on apparent metabolisable energy, nutrient digestibility and nutrient retention. *British Poultry Science*. 41, 193–200.
- Sauvant, D., Schmidely, P., Daudin, J.J., St-Pierre, N.R., 2008. Meta-analyses of experimental data in animal nutrition. *Animal*. 2, 1203–1214.
- Sauvant, D., Perez, J. M., Tran, G., 2004. Tables of composition and nutritional value of feed materials: pigs, poultry, cattle, sheep, goats, rabbits, horses and fish.
- Selle, P. H., Cowieson, A. J., Ravindran, V., 2009. Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. *Livestock Science*. 124, 126–141.
- Selle, P. H., Cowieson, A. J., Cowieson, N. P., Ravindran, V., 2012. Protein–phytate interactions in pig and poultry nutrition: a reappraisal. *Nutrition Research Reviews*: 25:1–17.
- Selle, P.H., Ravindran, V., 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology*. 135, 1–41.
- Selle, P.H., Ravindran, V., 2008. Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. *Livestock Science*. 113, 99–122.
- Selle, P. H., Ravindran, V., Bryden, W. L., Scott, T., 2006. Influence of dietary phytate and exogenous phytase on amino acid digestibility in poultry: a review. *The journal of poultry science*. 43, 89–103.
- Stein, H. H., Seve, B., Fuller, M. F., Moughan, P. J., De Lange, C. F. M., 2007. Invited review: Amino acid bioavailability and digestibility in pig feed ingredients: Terminology and application. *Journal of Animal Science*. 85, 172–180.
- St-Pierre, N.R., 2001. Invited review: Integrating quantitative findings from multiple studies using mixed model methodology. *Journal of dairy science*. 84, 741–755.
- Zouaoui, M., M.P. Létourneau-Montminy, and F. Guay. 2018. Effect of phytase on amino acid digestibility in pig: A meta-analysis. *Animal Feed Science and Technology*. 238, 18–28.

**Chapitre 4 Prédiction de l'effet de la xylanase sur la
digestibilité iléale apparente des acides aminés et sur
l'énergie métabolisable apparente chez le poulet :
Méta-Analyse**

Ce chapitre est présenté sous forme d'article et sera soumis dans la revue Poultry Science.

**Prediction of the effect of xylanase on the apparent amino acid digestibility and apparent metabolizable energy of broiler chicken feeds:
Meta-analysis**

M. Zouaoui¹, M.P. Létourneau-Montminy¹, F. Guay^{1†}

*¹Département des sciences animales, Université Laval, Quebec City, Quebec, G1V 0A6,
Canada*

Corresponding author: *Frederic Guay, E-mail: frederic.guay@fsaa.ulaval.ca*

Running head: xylanase, digestible amino acids and metabolizable energy

Abbreviations: AID, apparent ileal digestibility; AME, apparent metabolisable energy; ATTD, apparent total tract digestibility; GE, gross energy; INRA, French national institute for agricultural research; NDF, neutral detergent fiber; NSP, non-starch polysaccharides; PRESS, predicted residual sum of squares; R^2 , coefficient of determination, RMSE, root mean square error; RMSEP, root mean square error of prediction.

4.1. Résumé

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet de la xylanase sur la digestibilité iléale apparente (DIA) des acides aminés (AA) et sur le contenu en énergie métabolisable apparente (EMA) chez les poulets par méta-analyse. La xylanase augmente linéairement l'EMA ($P < 0,01$, $R^2 = 0,91$) et la DIA des AA ($P < 0,001$: Ala ; $P < 0,01$: Thr, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Asp, Glu et Ser ; $P < 0,05$: Arg, Gly), elle a tendance à augmenter linéairement la digestibilité de l'His et de la Tyr ($P = 0,07$) et de la Val ($P = 0,08$). L'incorporation de 2000 XU kg^{-1} engendre une augmentation de la DIA de tous les AA (Thr, 2,0% ; His, 1,6% ; Ser, 1,1% ; Met, 1,0% ; Lys, 1,0% ; Ile, 1,0% ; Phe, 0,9% , Leu, 0,9% , Arg, 0,8% , Val, 0,7%). Ces modèles permettent de quantifier l'effet de la xylanase sur la DIA des AA et sur l'EMA.

4.2. Abstract

The key of nutrition consists in the combination of feed formula and ingredients in order to maximize nutrient utilization and optimize production cost. However, feedstuffs of plant origin used in broiler production contain indigestible components. In addition to phytic acid, carbohydrates known as non-starch polysaccharides (NSP) have lower digestibility of dietary components for broilers. Xylanase was known to hydrolyze the arabinoxylans and xylan, two main NSP present in plant cell wall, resulting in enhancement of nutrient digestibility and digestible energy content, which is first limiting component in broiler diets. The objective of this study is to evaluate, in first, the effect of xylanase supplementation on apparent ileal digestibility (AID) of amino acid and, in second, apparent metabolizable energy (AME) in broilers taking into account dietary chemical composition and gross energy (GE) through meta-analysis approach. Forty articles published between 1997 and 2018 and including 196 experiments were used. Multiple regression models were fitted including the random effect of the experiment. Xylanase supplementation increases linearly AME ($P < 0.01$, $R^2 = 0.91$); an improvement of $0.90 \text{ MJ kg}^{-1} \text{ DM}$ was demonstrated with 2000 XU kg^{-1} . In addition to improving the digestibility of AME, xylanase linearly improved the AID of almost amino acids ($P < 0.001$: Ala; $P < 0.01$: Thr, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Asp, Glu and Ser; $P < 0.05$: Arg, Gly) and tended to increase linearly the digestibility of His and Tyr ($P = 0.07$) and Val ($P = 0.08$). The incorporation of 2000 XU kg^{-1} generates an increase of AID of all essential amino acids (Thr, 2.0%; His, 1.6%; Ser, 1.1%; Met, 1.0%; Lys, 1.0%; Ile, 1.0%; Phe, 0.9%; Leu, 0.9%; Arg, 0.8%; Val, 0.7%). These improvements in AID of amino acid with xylanase may reflect reduced endogenous amino acid losses resulting from the reduction of the anti-nutritive effects of fibre. The current models allow quantifying the positive effect of xylanase and that of modulating factors on AID of amino acid and AME, which are important for broiler nutrition and feed industry.

Keywords: broiler, amino acids, apparent metabolisable energy, xylanase, meta-analysis

4.3. Introduction

Broiler diets are composed of plant rich on NSP (De Keyser et al., 2016). The NSPs are among the anti-nutritional factors present in the feed of broiler and engendering depress in animal performance (Choct and Annison, 1992; Zhang et al., 2014). Xylans are the major hemicellulose component of plant cell and accounting for 20%-30% of their total dry mass (He et al., 2009). In fact, these molecules represent principal component of plant cell wall affecting the digestibility of intracellular constituents since they are indigestible and resistant to endogenous enzymes secreted in digestive tract of broilers (Zhang et al., 2014). In recent years, the use of exogenous enzymes increased to improve the nutritive worth of feedstuffs and reduce feed cost to become nowadays, a strategic additive in broiler diets (Bedford, 2018). In addition to microbial phytase, which is the most popular enzyme in broiler nutrition since 1990s and until today, fibre-degrading enzymes “carbohydrases” are also important and provided visible benefits in broiler. Among carbohydrases, xylanases have considerable research interest due to their beneficial effects in broiler nutrition and feed industry (He et al., 2009). The mechanisms behind the xylanase activity are directly related to the antinutritional effects of fibre. In fact, xylanase can reduce water-holding capacity and subsequent gut fill, increase digestibility of the cell wall fraction and decrease gut viscosity (Simon, 1998). The xylanase also allows a greater exposure of the gut contents to absorptive surfaces (He et al., 2010). Several studies have reported an improvement of protein and energy digestibility of broilers when xylanase was added to diets. However the mode of action of xylanases is not well known. The present work aiming using meta-analysis tool to evaluate the effect of xylanase supplementation on amino acid and AME digestibility in broilers for a better understand of its mechanisms of action and for quantifying its effect on these parameters.

4.4. Materials and methods

Data collection and coding

Studies of the effect of xylanase on amino acid digestibility and AME in broilers were recovered from public databases (e.g. Web of Science, CAB abstracts, Prod INRA and Science Direct) using keywords such as amino acid, metabolizable energy, xylanase, apparent digestibility and broilers. This yielded a dataset derived from 40 articles published between 1997 and 2018 and including 196 experimental treatments. Nine types of diets were distinguishable: rye, wheat, triticale, sorghum, corn, wheat/sorghum, wheat/rye, wheat/soybean meal and corn/soybean meal. General information (e.g. author name, date of publication, name of journal, objective of study), qualitative data (e.g. sex, inert marker used, supplier and source of xylanase) and quantitative data (e.g. dietary crude protein (CP), amino acid, calcium (Ca), phosphorus (P), gross energy (GE), phytic acid (PP), acid-detergent fibre (ADF), neutral-detergent fibre (NDF), soluble NSP, insoluble NSP, digestible ADF and digestible NDF) were included. The xylanase activity unit “XU” is defined as the quantity of the enzyme that liberated 1 μmol of xylose equivalent per minute (Yáñez et al., 2011). When nutrients chemical composition was not provided in the publication, it was calculated from INRA table of feedstuffs (Sauvant et al., 2004). The amounts of NSP in diets were predicted from the NSP content of each ingredient in the diet based on data previously published (Slominski et al., 2004; Rosenfelder et al., 2013; Pedersen et al., 2014).

Data investigation and statistical analysis models

Descriptive statistics were generated for each variable in the selected groups (Table 4-1). Particular attention was given to the meta-design (Sauvant et al., 2008), whereas the relationship between the independent variables taken two by two was identified graphically to assess the extent of variation in each experiment and to identify outliers and co-linearity. A graphical analyses of independent to each dependent variable was performed to identify the structure of the relationship (namely, linear or nonlinear) (Sauvant et al., 2008). All

variables and the possible interactions between them were tested as predictors of apparent feed digestibility by broiler chickens in terms of amino acid digestibility expressed as the AID coefficient (%) and apparent metabolizable energy expressed as the AME (MJ kg⁻¹ DM). Only the significant variables were retained in the models, i.e., xylanase (XU/kg diet), NDF content (g/kg diet), NSP content (g/kg diet) and GE (MJ kg⁻¹ DM) for AME. No interaction between the independent variables was found. The within- and between-experiment responses of dependent variables (coefficient of AID of amino acids, AME) to covariates (dietary inclusion of xylanase, NDF, NSP and GE) was carefully examined. The “study” was considered as random effect because when the database contains different individual studies, each study is a random outcome from a large population of studies and the study effect represent the sum of the effects of many factors, all with small effects on the dependent variable (St-Pierre, 2001; Sauvant et al., 2008).

Relationships between response Y and the main explanatory variables X (exogenous xylanase, crude protein, amino acid, GE, NSP, and NDF concentrations) were studied using the following linear model:

$$Y_{ij} = \mu + \mu_i + \beta_1 X_{ij} + e_{ij}$$

Where Y_i is the dependent variable Y in experiment i with level j of xylanase (AID or AME), X_{ij} is the independent variable, μ is the overall intercept across all studies; μ_i is the effect of experiment i on the intercept μ with the condition that $\sum \mu_i = 0$, β_1 the linear coefficients of the relationship and e_{ij} is the residual error. All statistical analyses were carried out using the MIXED procedure of Minitab software version 18 and SAS software version 9.4. In this study, two models are presented for fiber effect: models based on the concentration of NDF and models based on the concentration of NSP. The NDF fraction was composed of hemicellulose, cellulose, pectin and lignin while NSP fraction is the same without lignin (Choct, 2015). The prediction of the digestibility of amino acids and energy are the same with both models (NDF and NSP).

Table 4-1 Descriptive statistics in the database

Variable	n	Mean	s.d.	Min	Max
Independent variables					
Composition of diet					
Crude protein (g/kg diet)	142	203.35	45.301	75.20	149.00
Neutral-detergent fibre (g/kg diet)	184	109.31	19.250	78.96	136.00
Non-Starch polysaccharides (g/kg)	182	22.01	12.867	9.61	97.00
Exogenous xylanase (XU/kg)	172	2080.00	4404.624	0.00	20000.00
Amino acid composition (g/kg diet)					
Arginine	57	9.00	4.463	3.80	16.97
Histidine	57	3.65	1.428	1.49	6.50
Isoleucine	57	5.77	2.285	2.54	10.60
Leucine	57	11.03	4.639	4.27	19.30
Lysine	59	9.30	3.898	2.20	14.10
Methionine	55	4.16	1.552	1.45	6.94
Phenylalanine	57	6.96	2.653	3.06	11.20
Threonine	57	7.02	2.365	3.10	9.90
Tryptophan	53	2.17	0.548	1.00	2.72
Valine	57	6.99	2.673	3.20	13.40
Tyrosine	57	4.70	1.996	1.87	7.90
Cysteine	53	2.96	0.963	1.34	4.35
Alanine	57	6.35	2.95	2.18	10.39
Aspartic acid	57	10.55	6.803	1.80	31.32
Glutamic acid	57	32.35	12.280	11.65	52.39
Glycine	57	5.90	2.356	2.24	9.22
Serine	57	6.57	2.685	2.24	11.21
Proline	53	10.75	3.640	5.10	18.07
Dependent variables					
Apparent metabolizable energy MJ /kg DM	73	13.39	1.103	10.80	15.16
Apparent ileal digestibility (%)					
Arginine	49	84.01	5.355	72.00	93.50
Histidine	54	75.06	13.94	39.30	93.00
Isoleucine	63	83.10	5.138	74.50	92.30
Leucine	62	85.22	4.899	74.90	93.30
Lysine	63	85.16	6.952	65.00	94.40
Methionine	39	88.97	5.300	74.00	98.80
Phenylalanine	63	85.58	5.848	67.80	93.80
Threonine	63	76.34	5.853	61.00	85.60
Valine	63	81.42	5.321	69.00	90.60
Tyrosine	50	83.89	7.240	69.00	95.70
Alanine	65	80.55	7.655	52.90	89.80
Aspartic acid	55	81.39	7.780	63.00	94.90
Glutamic acid	55	88.50	5.721	70.00	97.20
Glycine	61	79.61	6.874	63.70	93.00
Serine	63	81.48	5.968	69.10	90.70

Model evaluation

An internal validation was performed using cross validation for all models to test the accuracy of equations generated. GLM analyzes including study effect were performed to compare discrepancies between experimental means and predicted means ($d = \text{mean} [\text{observed value} - \text{predicted value}]$). The leave-one-out cross-validation was used to obtain the RMSEP (root mean square error of prediction) from the value of the PRESS (predicted residual sum of squares) statistic (Causeur et al., 2003). The RMSE (root mean square error) and the RMSEP (root mean square error of prediction) have been used to test the accuracy of equations of predictions of the AID of amino acid and the AME.

4.5. Results

Types of diets (rye, wheat, triticale, sorghum, corn, wheat/sorghum, wheat/rye, wheat/soybean meal and corn/soybean meal) was investigated in the initial steps but was not found significantly different when type of diet was included in the model. The prediction of fiber digestibility was not possible due to variable methods used to estimate fiber digestibility (i.e. apparent total tract digestibility (ATTD) of crude fiber, ADF and NDF as well as AID of crude fiber, ADF, and NDF).

Prediction of apparent ileal digestibility of amino acids

The general regression equations for AID based on essential and non-essential amino acids had a significant positive intercept for all amino acids ($P < 0.01$, Table 4-2). The “study” effect on the intercept was significant for all amino acids ($P < 0.001$). The effect of xylanase concentration was positive and linear for all essential amino acids (Thr, Ala, $P < 0.001$; Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Asp, Glu and Ser, $P < 0.01$; Arg, Gly, $P < 0.05$) and tended to increase linearly the digestibility of His and Tyr ($P = 0.07$) and Val ($P = 0.08$). The AID of amino acids and NDF were negatively related and the effect was linear: Met, Val, Ala, Asp, Glu ($P < 0.001$), Arg, ($P < 0.01$), Iso, Leu, Lys, Phe, Tyr ($P < 0.05$) except for His, Thr, Gly and Ser

where no effect was noted. The coefficient of determination (R^2) ranged from 0.61 for Thr to 0.93 for Asp. The NSP content negatively affects AID of amino acids but no interaction was observed between xylanase and NSP (Table 4-3). For all amino acids, cross-validation showed that the intercept was not significantly different from 0 and the slope was not significantly different from 1 (Table 4-4). The models presented low RMSE (1.40-3.45) and RMSEP (0.50-6.20%) and high coefficients of determination (R^2) (0.42-0.86). The best predicted amino acids are Arg, His, Lys, Met, Phe, Ala, Asp and Glu with R^2 varying from 0.70 for Arg to 0.86 for Asp. For Ile, Leu, Thr, Val, Tyr, Gly and Ser, the prediction is less accurate with R^2 varying from 0.42 for Thr to 0.67 for Gly and Ser.

Prediction of apparent metabolizable energy

The general regression equation for prediction of AME included the GE and had an intercept different from 0 ($P < 0.001$, Table 4-2) with $R^2 = 0.91$. The effect of gross energy concentration was positive and linear ($P < 0.01$). The xylanase effect was also positive and linear ($P < 0.01$). The AME and NDF was related negatively and linearly ($P < 0.01$). The xylanase effect was also positive and linear ($P < 0.01$). The cross validation showed that the intercept was not significantly different from 0 and the slope was not significantly different from 1 (Table 4-4). The current model presented low RMSE (1.4%) and RMSEP (0.50%). Assessment of the quality of prediction of AME by the model showed good accuracy (Figure 4-1).

Table 4-2 Prediction of apparent metabolizable energy (MJ kg⁻¹ DM) and apparent ileal digestibility of amino acids (%) as a function of xylanase activity and neutral detergent fiber content.

Amino acid	N treatment	General regression equation	Intercept	Gross energy	P-value				
					Xylanase	NDF	R ²	RMSE	RMSEP
Apparent metabolisable energy	73	12.16+0.42a+4.40×10 ⁻⁴ b-4.74×10 ⁻² c	<0.001	<0.01	<0.01	<0.01	0.91	1.40	0.50
Arginine	49	96.82+ 3.10×10 ⁻⁴ b-1.23×10 ⁻¹ c	<0.001	-	<0.05	<0.01	0.85	2.17	2.90
Histidine	54	67.20+6.33×10 ⁻⁴ b+8.70×10 ⁻² c	<0.001	-	0.07	NS	0.88	3.45	6.20
Isoleucine	63	91.20 +3.40×10 ⁻⁴ b-9.64×10 ⁻² c	<0.001	-	<0.01	<0.05	0.77	2.10	3.14
Leucine	62	94.65+3.80×10 ⁻⁴ b-1.05×10 ⁻¹ c	<0.001	-	<0.01	<0.05	0.79	2.09	2.97
Lysine	63	93.90+4.10×10 ⁻⁴ b-1.00×10 ⁻¹ c	<0.001	-	<0.01	<0.05	0.91	2.14	2.80
Methionine	39	104.70+4.42×10 ⁻⁴ b-1.40×10 ⁻¹ c	<0.001	-	<0.01	<0.001	0.91	2.09	2.82
Phenylalanine	63	93.60+3.82×10 ⁻⁴ b-3.81×10 ⁻² c	<0.001	-	<0.01	<0.05	0.85	2.21	3.06
Threonine	63	78.05+7.70×10 ⁻⁴ b-3.80×10 ⁻² c	<0.001	-	<0.001	NS	0.61	2.42	4.78
Valine	63	98.50+2.70×10 ⁻⁴ b-1.72×10 ⁻¹ c	<0.01	-	0.08	<0.001	0.76	2.25	3.52
Tyrosine	50	96.57+3.40×10 ⁻⁴ b-1.34×10 ⁻¹ c	<0.01	-	0.07	<0.05	0.79	2.54	4.25
Alanine	65	101.20+5.60×10 ⁻⁴ b-2.04×10 ⁻¹ c	<0.001	-	<0.001	<0.001	0.84	2.24	3.18
Aspartic acid	55	104.70+5.00×10 ⁻⁴ b-2.40×10 ⁻¹ c	<0.001	-	<0.01	<0.001	0.93	2.21	3.05
Glutamic Acid	55	108.90+3.90×10 ⁻⁴ b-2.03×10 ⁻¹ c	<0.001	-	<0.01	<0.001	0.90	2.04	2.42
Glycine	61	87.73+4.20×10 ⁻⁴ b-1.00×10 ⁻¹ c	<0.001	-	<0.05	NS	0.85	3.17	3.96
Serine	63	86.44+4.54×10 ⁻⁴ b-7.54×10 ⁻² c	<0.01	-	<0.01	NS	0.83	2.21	3.47

N = number of studies.

a= effect of gross energy concentration (MJ kg⁻¹ DM).

b= effect of added xylanase activity (XU/kg diet).

c= effect of neutral-detergent fibre concentration (g/kg diet).

NS = effect not significant.

Table 4-3 Prediction of apparent metabolizable energy (MJ kg⁻¹ DM) and apparent ileal digestibility of amino acids (%) as a function of xylanase activity and non-starch polysaccharides content.

Amino acid	N treatment	General regression equation	Intercept	Gross energy	P-value				
					Xylanase	NSP	R ²	RMSE	RMSEP
Apparent metabolisable energy	73	9.00+0.28a+4.67×10 ⁻⁴ b-1.41×10 ⁻² c	<0.001	<0.05	<0.01	NS	0.92	1.74	0.48
Arginine	49	90.92+ 3.25×10 ⁻⁴ b-3.96×10 ⁻¹ c	<0.001	-	<0.01	<0.05	0.87	3.89	2.80
Histidine	54	85.70+5.00×10 ⁻⁴ b-3.74×10 ⁻¹ c	<0.001	-	NS	NS	0.90	9.50	5.55
Isoleucine	63	86.62+4.00×10 ⁻⁴ b-2.90×10 ⁻¹ c	<0.001	-	<0.01	0.08	0.83	3.50	2.70
Leucine	62	92.89+3.60×10 ⁻⁴ b-4.67×10 ⁻¹ c	<0.001	-	<0.01	<0.01	0.84	3.20	2.50
Lysine	63	92.89+4.14×10 ⁻⁴ b-3.23×10 ⁻¹ c	<0.001	-	<0.01	NS	0.92	4.35	2.70
Methionine	39	101.83+4.75×10 ⁻⁴ b-6.15×10 ⁻¹ c	<0.001	-	<0.001	<0.001	0.94	3.90	2.60
Phenylalanine	63	94.73+3.62×10 ⁻⁴ b-5.45×10 ⁻¹ c	<0.001	-	<0.001	<0.001	0.89	3.47	2.57
Threonine	63	75.50+7.80×10 ⁻⁴ b-7.34×10 ⁻² c	<0.001	-	<0.001	NS	0.65	4.34	4.35
Valine	63	94.40+2.36×10 ⁻⁴ b-6.94×10 ⁻¹ c	<0.001	-	NS	<0.001	0.79	4.16	3.24
Tyrosine	50	89.05+3.94×10 ⁻⁴ b-3.82×10 ⁻¹ c	<0.001	-	<0.05	NS	0.83	5.84	3.65
Alanine	65	96.96+6.01×10 ⁻⁴ b-1.02c	<0.001	-	<0.001	<0.001	0.92	5.76	3.12
Aspartic acid	55	103.86+5.05×10 ⁻⁴ b-1.21c	<0.001	-	<0.001	<0.001	0.94	5.00	2.90
Glutamic Acid	55	109.53+4.00×10 ⁻⁴ b-1.09c	<0.001	-	<0.001	<0.001	0.93	4.30	2.23
Glycine	61	84.23+4.16×10 ⁻⁴ b-3.55×10 ⁻¹ c	<0.001	-	<0.05	NS	0.89	6.66	3.14
Serine	63	81.70+4.74×10 ⁻⁴ b-1.71×10 ⁻¹ c	<0.001	-	<0.001	NS	0.88	4.00	2.98

N = number of studies.

a= effect of gross energy concentration (MJ kg⁻¹ DM).

b= effect of added xylanase activity (XU/kg diet).

c= effect of non-starch polysaccharides concentration (g/kg diet).

NS = effect not significant.

Table 4-4 Apparent metabolizable energy and apparent amino acid digestibility observed in experimental diets and predicted by the tested models.

	AME	Arg AID	His AID	Ile AID	Leu AID	Lys AID	Met AID	Phe AID	Thr AID	Val AID	Tyr AID	Ala AID	Asp AID	Glu AID	Gly AID	Ser AID
Experimental mean	0.133	0.838	0.736	0.828	0.849	0.856	0.889	0.854	0.772	0.814	0.846	0.812	0.815	0.879	0.793	0.812
Predicted mean	0.134	0.839	0.738	0.829	0.850	0.857	0.890	0.855	0.773	0.815	0.848	0.813	0.816	0.880	0.795	0.813
d ^a	-0.001	-0.001	-0.002	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	-0.002	-0.001	-0.001	-0.001	-0.002	-0.001
Regression equation ^b																
a	0.059	3.477	1.397	2.960	3.215	1.003	5.521	3.017	4.914	2.919	0.180	1.028	1.288	0.055	4.693	5.354
P-value ^c	0.953	0.678	0.790	0.731	0.713	0.841	0.533	0.659	0.691	0.759	0.985	0.876	0.787	0.992	0.515	0.468
b	0.993	0.958	0.979	0.963	0.962	0.987	0.937	0.964	0.935	0.964	0.995	0.987	0.984	0.998	0.938	0.933
P-value ^c	0.932	0.670	0.767	0.722	0.706	0.831	0.523	0.652	0.682	0.754	0.966	0.871	0.777	0.986	0.491	0.455
R ^{2d}	0.78	0.70	0.81	0.62	0.63	0.84	0.75	0.73	0.42	0.58	0.65	0.73	0.86	0.81	0.67	0.67
RMSEP ^e	0.50	2.90	6.20	3.14	2.97	2.80	2.82	3.06	3.70	3.52	4.25	3.18	3.05	2.42	3.96	3.47

AID, apparent ileal digestibility.

AME= apparent metabolizable energy, Arg = arginine, His = histidine, Ile = isoleucine, Leu = leucine, Lys = lysine, Met = methionine, Phe = phenylalanine, Thr = threonine, Val = valine, Tyr= tyrosine, Ala=alanine, Asp= aspartic acid, Glu= glutamic acid, Gly= glycine, Ser= serine.

^a Mean deviation from the bisector expressed.

^b The equation is: $Y_{obs} = a + bY_{pred}$.

^c P-value that a and b differ from 0 and 1 respectively.

^d R², coefficient of determination.

^e RMSEP, root mean square error of prediction.

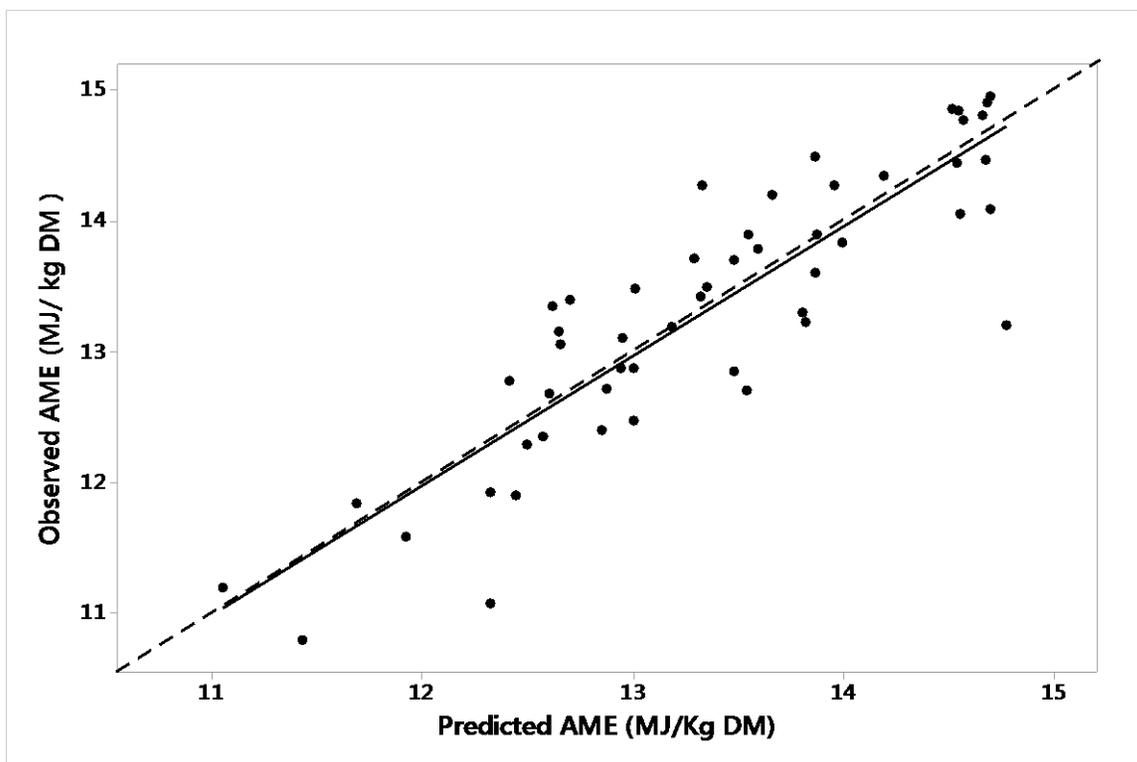


Figure 4-1 Regression analysis of the relationship between observed apparent metabolisable energy and apparent metabolisable energy predicted by the model. Dashed line represents $Y=X$. Black=tested model.

4.6. Discussion

The NSPs (soluble and insoluble) are considered low digested because broilers do not produce the endogenous enzymes required to break down cell wall NSP (Bedford and Partridge, 2001). The main NSPs found in cell walls of cereals are arabinoxylnes and β -glucans (Basic and Stone, 1991). Choct and Annison (1990) showed the presence of negative correlation between wheat NSP in the diet and its nutritive value in broiler. In fact, the supplementation of soluble NSP isolate from wheat in broiler diet based on sorghum and soybean meal caused a decrease in the digestibility of protein by 19% (Choct and Annison 1992). In this study, NSPs affect negatively the digestibility of amino acid and energy.

Increasing NSP content from 20 g/kg diet to 30g/kg diet generates a decrease on AID of all amino acids (until -15.00 % for Asp). The NSPs exert anti-nutritive activities in broiler chickens. The insoluble NSPs act as a physical barrier to effective nutrient hydrolysis and absorption (Nortey et al., 2007), which is known as the "cage effect". As described by Simon (1998), the "locking in" of nutrients in the cell lumen by NSP of the cell walls was called "cage effect". In addition, soluble NSPs increases digesta viscosity (Saki et al., 2010). Pettersson and Aman (1988) suggested that the negative effect of NSPs was rather attributed to the "cage effect" than to the viscosity of the soluble NSPs (Jeroch et al., 1995). This is different with Bedford (1992) which observed that hull-less cereals had a high gross energy but a low metabolisable energy suggesting that the increase in viscosity of digesta was the most convincing argument of the negative effect of soluble NSPs. Also, White et al., (1981) and Bedford and Classen (1992) have proved that the poor feeding value of rye and barley was attributed to the increased in digesta viscosity. In addition, NSP can also bind to nutrients and thereby interfere with digestion. It can also form complexes with digestive enzymes and some proteins in the gut (Choct, 1999). This study showed that NDF can depress the digestibility of amino acid and energy. Increasing NDF content from 100 g/kg diet to 130 g/kg diet generates a decrease on AID of all amino acids (until - 8.70% for Asp) and for AME (-10.0%). Broilers have a limited ability to digest NDF (Moran, 1982) thus increased NDF content is coupled with the decrease in amino acid and energy digestibility. The decreased apparent digestibility of amino acid might be due to increased endogenous amino acid secretion or reduced digestibility of feed amino acid caused by NSPs and NDF fibres. This can be due to the combination of both the physical and chemical structure of dietary fibre which affects protein-degrading enzymes (Yin et al., 2000). The beneficial effect of xylanase on amino acid digestibility was confirmed in this study. In the present study, xylanase incorporation improved amino acids and energy digestibility. With the incorporation of 2000 XU per kg of feed, the apparent digestibility is improved regardless which amino acid is measured (Thr 2.00%, His 1.56%, Ala 1.46%, Asp 1.31%, Ser 1.17%, Gly 1.10%, Tyr 0.99%, Met 0.96%, Lys 0.95%, Ile 0.95%, Glu 0.92%, Phe 0.89, Leu 0.88%, Arg 0.76%, Val 0.67%). The improvement observed in ileal amino acid digestibility coefficients may be due to an improved absorption of dietary amino acids and a reduced secretion of protein-rich endogenous amino acids (Im et al., 1999; Cowieson and Ravindran, 2008). As suggested by

Nortey et al. (2007) the digestibility of Lys, Met and Thr decreased when the content of NSP increased. These changes in absorption and losses of dietary amino acids are related to the elimination of negative effect of fibre. Adedokun et al. (2007) showed that endogenous amino acids largely originate from mucoproteins, and Thr, Ser and Asp were the prominent amino acids in the ileal digesta of broilers. Given that current results showed that amino acids with the highest improvement in digestibility by xylanase addition are the predominant amino acids in mucin proteins, this support the thesis that the degradation of fibre decreases endogenous secretion of these amino acids. This is consistent with Angkanaporn et al. (1994) which showed that the addition of soluble wheat pentosans to a broiler diet increased endogenous losses of amino acids causing a decrease in the apparent ileal digestibility of amino acids.

Supplementation of enzymes degrading fibre in diets for broilers can reduce its anti-nutritional effects and improve the value of diets. However, the fiber is essential for the development of the gut. It is recommended with moderate requirement to improve the development of organs, the enzyme production and the nutrient digestibility in poultry (Kiarie et al., 2017). As suggested by Kiarie et al. (2017), these effects of fiber are the consequence of a better gizzard function and an increase in gastroduodenal refluxes which facilitates contact between nutrients and digestive enzymes. A negative relationship between NSP/NDF and digestibility of nutrients is well known. Although the effect of NSP and NDF on digestibility appeared strong in the present study, no interaction between NSP/ NDF and xylanase was found which contradicts the effect of xylanase on fibre degradation. Contrariwise, analysis of the meta-design showed an absence of intra-study variability in NSP and NDF levels. Disappointingly, although publications were about xylanase that degrade fiber, values of NSP were not mentioned but were all predicted from published data (Slominski et al., 2004; Rosenfelder et al., 2013; Pedersen et al., 2014) leading to less variance than was likely present in experimental feed. Also, values of NDF in the diet were not reported in the publications and were therefore calculated from INRA table of feedstuffs (Sauvant et al., 2004). Therefore, the meta-design of the database may limit the meta-analysis powerfulness (Sauvant et al., 2008).

Mechanisms by which xylanase increases amino acid digestibility has been attributed to the reduce of digesta viscosity (Fengler and Marquardt, 1988), the degradation of endosperm cell wall structures (Pettersson et al., 1990) and the reduce of endogenous amino acids (Cowieson and Ravindran, 2008). The decrease in the viscosity of digesta is the result of the increasing of the digestibility of NSPs by xylanase. Improved amino acid digestibility due to decreased digesta viscosity is mainly explained by the facility of diffusion of substrates, digestive enzymes and products of digestion, the improved convection of the intestinal content by contractions and the improved contact of absorbable nutrients with the surface of enterocytes (Simon, 1998).

Cereals are rich sources of energy for broiler and represent from 60-70% of the diet but the efficiency of energy utilization varies and depends on adequacy of enzymes (Black et al., 2005). The lack of endogenous xylanase and the high viscosity of digesta caused by NSPs may affect the digestibility of energy. The current study showed that xylanase supplementation affected positively AME, an improvement of 0.90 MJ kg⁻¹ DM was estimated with 2000 XU per kg of feed indicating that xylanase may increase the digestibility of starch and fibre that increases the energy released. In addition, viscous gut reduces the mixing of digestive enzymes with their substrates, which prevent nutrient digestion. In fact, NSPs are recognized to bring change to the ecology of the gut represented by the proliferation of fermentative microbes in the small intestine (Choct, 1999) leading to an increase in the energy losses. A positive relationship was found between AME and xylanase activity which is consistent with previous findings (Hew et al., 1998; Im et al., 1999; Rutherford et al., 2007). Although xylanase has been shown to be effective in the digestibility of amino acids in this meta-analysis, its effect is more recognized on energy (Bedford and Partridge, 2001). In fact, xylanase was more associated with the improvement of energy utilization for broilers than for other nutrients which has been proved in this study; the current models showed that with 2000XU/kg, xylanase generates an improvement of 7.10% in AME versus 2.00% in the AID of Thr, the most improved amino acid digestibility (a difference of 5.10%; Figure 4-2).

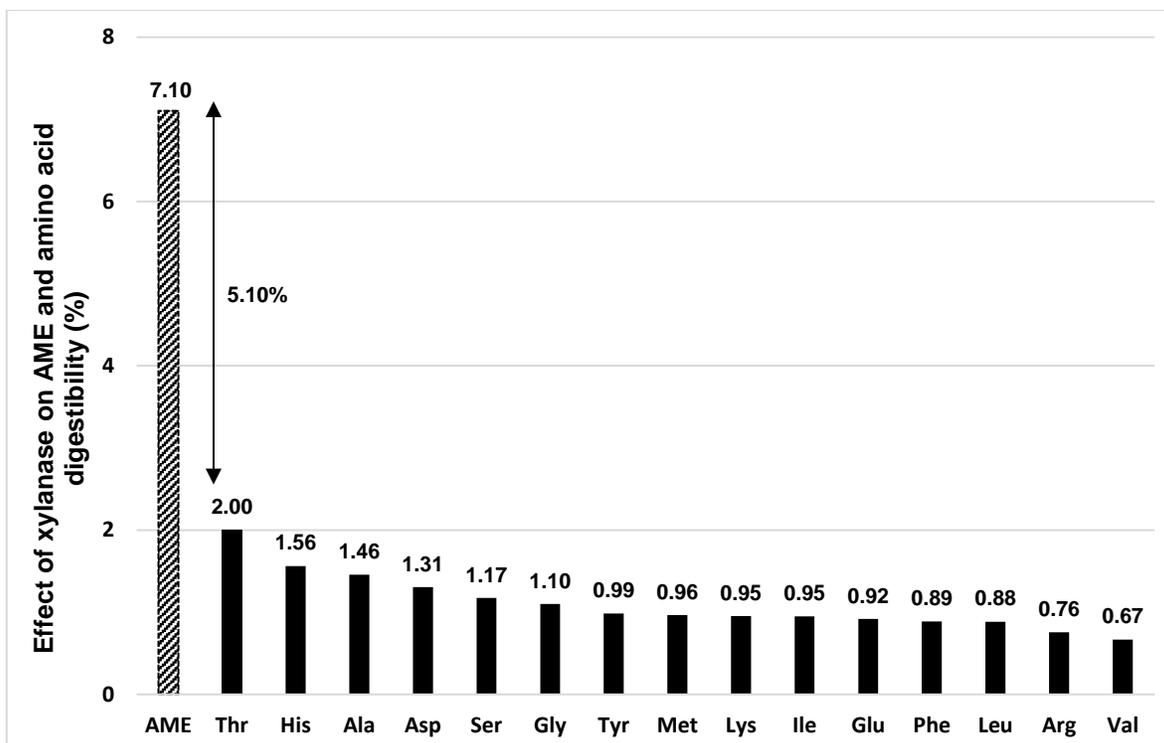


Figure 4-2 Effect of xylanase (2000XU/ Kg DM) on apparent metabolizable energy (AME) and amino acid digestibility in broilers.

Cozannet et al. (2017) showed a negative correlation between AME and arabinoxylan concentrations with r equal of 0.73. In this study, the gross energy appears to be the best predictor of AME, it affects linearly and positively the AME. The incorporation of xylanase may increase the activity of endogenous enzymes by increasing the availability of substrates (Horvatovic et al., 2015). Consequently, the AME content is improved via the gross energy. Choct (1999) showed that AME was increased by 29.1% following the incorporation of enzyme. The starch is the principal available source of energy in wheat but it is stored intracellularly and partly unavailable for broilers as their low endogenous capacity to degrade plant cell wall material (O'Neill et al., 2014). Hence, xylanase may facilitate the access of pancreatic enzymes to nutrients generating an improvement in metabolizable dietary energy (Pirgozliev et al., 2015).

In summary, based on this meta-analysis approach, xylanase supplementation is reliable way to improve the amino acid digestibility and energy utilization. These effects may explain by

reducing gut viscosity or by increasing the access of digestive enzymes to the contents of plant cell walls. Consequently, the supplementation of exogenous xylanase is believed to improve broiler performance.

4.7. Conclusion

The aim of the application of xylanase to broiler feed is the reduction of differences in feed ingredient quality by the suppression of fibre anti-nutritional effects. Carbohydrases are known by their positive effects on the digestibility of energy. In addition, other positive effects of xylanase appeared over time, it concerns the increase in amino acid digestibility and the improvement in protein availability in broiler. This study confirmed that supplementing broiler feed with xylanase does increase feed digestibility in terms of amino acids and energy utilisation, which is important for broiler nutrition and feed industry.

Acknowledgement

The authors wish to thank Nutreco Canada, Prorec, Mixscience, Aliments Breton and NSERC for the financial support.

4.8. Références

- Adedokun, S., Parsons, C., Lilburn, M., Adeola, O., Applegate, T., 2007. Endogenous amino acid flow in broiler chicks is affected by the age of birds and method of estimation. *Poultry science*. 86, 2590-2597.
- Angkanaporn, K., Choct, M., Bryden, W.L., Annison, E.F., Annison, G., 1994. Effects of wheat pentosans on endogenous amino acid losses in chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 66, 399-404.
- Basic, A., Stone, B., 1991. Chemistry and composition of aleurone cell wall components from wheat and barley. *Australian Journal of Plant Physiology*. 8, 475-495.
- Bedford, M. R., 1992. The effect of dietary enzymes on digestion in poultry. *Feed Compounder*.
- Bedford, M. R., 2018. The evolution and application of enzymes in the animal feed industry: the role of data interpretation. *British poultry science*. 59, 486-493.
- Bedford, M. R., Classen, H. L., 1992. Reduction of intestinal viscosity through manipulation of dietary rye and pentosanase concentration is effected through changes in the carbohydrate composition of the intestinal aqueous phase and results in improved growth rate and food conversion efficiency of broiler chicks. *The Journal of Nutrition*. 122, 560-569.
- Bedford, M.R., Partridge, G.G., 2001. *Enzymes in farm animal nutrition*. Centre for Agricultural Bioscience International.
- Black, J. L., Hughes, R. J., Nielsen, S. G., Tredrea, A. M., MacAlpine, R., Van Barneveld, R. J., 2005. The energy value of cereal grains, particularly wheat and sorghum, for poultry. *Proceedings of the Australian Poultry Science Symposium*. 17, 21-29.
- Causeur, D., Daumas, G., Dhorne, T., Engel, B., Fonti furnols, M., Højsgaard, S., 2003. *Statistical Handbook for Assessing Pig Classification. Methods: Recommendations from the EUPIGCLASS Project Group*, pp. 132.
- Choct, M., 1999. Soluble non-starch polysaccharides affect net utilisation of energy by chickens. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia*. 12, 31-36.
- Choct, M., 2015. Fibre-Chemistry and functions in poultry nutrition. In *LII Simposio Científico de Avicultura, Málaga*. 28, 113-119.
- Choct, M., Annison, G., 1990. Anti-nutritive activity of wheat pentosans in broiler diets. *British Poultry Science*. 31, 811-821.
- Choct, M., Annison, G., 1992. Anti-nutritive effect of wheat pentosans in broiler chickens: Roles 16 of viscosity and gut microflora. *British Poultry Science*. 33, 821-834.
- Cowieson, A., Ravindran, V., 2008. Effect of exogenous enzymes in maize-based diets varying in nutrient density for young broilers: growth performance and digestibility of energy, minerals and amino acids. *British Poultry Science*. 49, 37-44.
- Cozannet, P., Kidd, M.T., Montanhini Neto, R., Geraert, P.-A., 2017. Next-generation non-starch polysaccharide-degrading, multi-carbohydrase complex rich in xylanase and arabinofuranosidase to enhance broiler feed digestibility. *Poultry Science*. 96, 2743-2750.
- De Keyser, K., Kuterna, L., Kaczmarek, S., Rutkowski, A., Vanderbeke, E., 2016. High dosing NSP enzymes for total protein and digestible amino acid reformulation in a wheat/corn/soybean meal diet in broilers. *The Journal of Applied Poultry Research*. 25, 239-246.

- Fengler, A.I., Marquardt, R.R., 1988. Water-soluble pentosans from rye: II. Effects on rate of dialysis and on the retention of nutrients by the chick. *cereal Chemistry*. 65, 298-302.
- He, J., Yin, J., Wang, L., Yu, B., Chen, D., 2010. Functional characterisation of a recombinant xylanase from *Pichia pastoris* and effect of the enzyme on nutrient digestibility in weaned pigs. *British journal of nutrition*. 103, 1507-1513.
- He, J., Yu, B., Zhang, K., Ding, X., Chen, D., 2009. Expression of endo-1, 4-beta-xylanase from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and functional characterization of the produced enzyme. *BMC biotechnology*. 9, 56.
- Hew, L., Ravindran, V., Mollah, Y., Bryden, W., 1998. Influence of exogenous xylanase supplementation on apparent metabolisable energy and amino acid digestibility in wheat for broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*. 75, 83-92.
- Horvatovic, M., Glamocic, D., Zikic, D., Hadnadjev, T., 2015. Performance and some intestinal 41 functions of broilers fed diets with different inclusion levels of sunflower meal and supplemented or not with enzymes. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*. 17, 25-30.
- Im, H. L., Ravindran, V., Ravindran, G., Pittolo, P. H., Bryden, W. L., 1999. The apparent metabolisable energy and amino acid digestibility of wheat, triticale and wheat middlings for broiler chickens as affected by exogenous xylanase supplementation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79, 1727-1732.
- Jeroch, H., Dänicke, S., Brufau, J., 1995. The influence of enzyme preparations on the nutritional value of cereals for poultry. A review. *Animal and Feed Sciences*. 4, 263-285.
- Kiarie, E., Walsh, M., Romero, L., Arent, S., Ravindran, V., 2017. Nutrient and fiber utilization responses of supplemental xylanase in broiler chickens fed wheat based diets are independent of the adaptation period to test diets². *Poultry Science* .96, 3239-3245.
- Moran, E. T. 1982. Comparative nutrition of fowl & swine: the gastrointestinal systems. Guelph, Ont.: ET Moran: Office for Educational Practice, University of Guelph.
- Nortey, T., Patience, J., Sands, J., Zijlstra, R., 2007. Xylanase supplementation improves energy digestibility of wheat by-products in grower pigs. *Livestock Science*. 109, 96-99.
- O'Neill, H.M., Smith, J., Bedford, M., 2014. Multicarbohydrase enzymes for non-ruminants. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 27, 290.
- Pedersen, M.B., Dalsgaard, S., Knudsen, K.B., Yu, S., Lærke, H.N., 2014. Compositional profile and variation of distillers dried grains with solubles from various origins with focus on non-starch polysaccharides. *Animal Feed Science and Technology*. 197, 130-141.
- Pettersson D., Aman P., 1988. Effects of enzyme supplementation of diets based on wheat, rye or triticale on their productive value for broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*. 20, 313-324.
- Pettersson, D., Graham, H., Åman, P., 1990. Enzyme supplementation of broiler chicken diets based on cereals with endosperm cell walls rich in arabinoxylans or mixed-linked β -glucans. *Animal Science* .51, 201-207.
- Pirgozliev, V., Rose, S., Pellny, T., Amerah, A., Wickramasinghe, M., Ulker, M., Rakszegi, M., Bedo, Z., Shewry, P., Lovegrove, A., 2015. Energy utilization and growth

- performance of chickens fed novel wheat inbred lines selected for different pentosan levels with and without xylanase supplementation. *Poultry Science*. 94, 232-239.
- Rosenfelder, P., Eklund, M., Mosenthin, R., 2013. Nutritive value of wheat and wheat by-products in pig nutrition: A review. *Animal Feed Science and Technology*. 185, 107-125.
- Rutherford, S., Chung, T., Moughan, P., 2007. The effect of a commercial enzyme preparation on apparent metabolizable energy, the true ileal amino acid digestibility, and endogenous ileal lysine losses in broiler chickens. *Poultry Science*. 86, 665-672.
- Saki, A. A., Matin, H. H., Tabatabai, M. M., Zamani, P., Harsini, R. N., 2010. Microflora population, intestinal condition and performance of broilers in response to various rates of pectin and cellulose in the diet. *European Poultry Science*. 74, 183-188.
- Sauvant, D., Perez, J.M and G. Tran. 2004. Tables of composition and nutritional value of feed materials: pigs, poultry, cattle, sheep, goats, rabbits, horses and fish.
- Sauvant, D., Schmidely, P., Daudin, J.J., St-Pierre, N.R., 2008. Meta-analyses of experimental data in animal nutrition. *Animal*. 2, 1203-1214.
- Simon, O., 1998. The mode of action of NSP hydrolysing enzymes in the gastrointestinal tract. *Animal and Feed Sciences*. 7, 115-123.
- Slominski, B., Boros, D., Campbell, L., Guenter, W., Jones, O., 2004. Wheat by-products in poultry nutrition. Part I. Chemical and nutritive composition of wheat screenings, bakery by-products and wheat mill run. *Canadian Journal of Animal Science*. 84, 421-428.
- St-Pierre, N., 2001. Invited review: integrating quantitative findings from multiple studies using mixed model methodology1. *Journal of Dairy Science*. 84, 741–755.
- White, W. B., H. R. Bird, M. L. Sunde, N. Prentice, W. C. Burger, and J. A. Marlett, 1981. The viscosity interaction of barley beta-glucan with *Tricoderma viride* cellulase in the chick intestine. *Poultry Science*. 60, 1043-1048.
- Yáñez, J.L., Beltranena, E., Cervantes, M., Zijlstra, R.T., 2011. Effect of phytase and xylanase supplementation or particle size on nutrient digestibility of diets containing distillers dried grains with solubles cofermented from wheat and corn in ileal-cannulated grower pigs. *Journal of Animal Science*. 89, 113-123.
- Yin, Y. L., McEvoy, J. D. G., Schulze, H., Hennig, U., Souffrant, W. B., McCracken, K. J., 2000. Apparent digestibility (ileal and overall) of nutrients and endogenous nitrogen losses in growing pigs fed wheat (var. Soissons) or its by-products without or with xylanase supplementation. *Livestock Production Science*. 62, 119-132.
- Zhang, L., Xu, J., Lei, L., Jiang, Y., Gao, F., Zhou, G., 2014. Effects of xylanase supplementation on growth performance, nutrient digestibility and non-starch polysaccharide degradation in different sections of the gastrointestinal tract of broilers fed wheat-based diets. *Asian-Australasian journal of animal sciences*. 27, 855.

Chapitre 5 Discussion générale et conclusion

« Un problème sans solution est un problème mal posé »
Albert Einstein

5.1. Originalité de la thèse

Les sciences animales sont en constante évolution tant au niveau des animaux, que de la production, de la qualité des produits et même dans la manière de voir, de comprendre et de manipuler les animaux. En fait, ces dernières années, la nutrition animale a évolué passant d'un objectif de production visant la simple couverture des besoins des animaux pour arriver à exprimer le potentiel maximum recherché à une approche multicritère qui consiste à comprendre pour prédire les réponses multiples aux pratiques alimentaires (Sauvant, 2005). Ce projet de recherche se situe dans cette nouvelle optique qui consiste à évaluer et prédire l'effet de l'incorporation alimentaire de la phytase, une enzyme très populaire dans l'industrie porcine et avicole. Ses actions positives sur l'utilisation du P végétal chez les monogastriques ont bien été démontrées (Düngelhoef et al., 1994; Ravindran et al., 2000). En bref, la plupart des auteurs sont d'accord sur le fait que la phytase libère le P lié aux phytates, améliorant ainsi la digestibilité du P, la considérant même comme une source de P (Cabahug, et al., 1999). De ce fait, l'utilisation de la phytase est généralisée dans l'élevage de monogastriques. Toutefois, l'incorporation de cette enzyme a montré qu'elle pouvait avoir la capacité d'augmenter la disponibilité d'autres nutriments comme les minéraux à savoir le calcium, mais aussi les AA (Selle et al., 2000). Étant donné que la protéine est le nutriment le plus cher après l'énergie dans les aliments destinés aux porcs et aux poulets, elle pourrait contribuer à la réduction du coût des aliments et donc à la rentabilité des élevages (Bedford et Partridge, 2001). Les études qui se sont intéressées à la relation entre la phytase et la digestibilité des AA sont nombreuses. Chaque étude rapporte des résultats différents des autres : certaines ont souligné des améliorations de la digestibilité des AA, alors que d'autres n'ont trouvé aucun effet suite à l'incorporation de cette enzyme (Nitrayová et al., 2006). Cette controverse scientifique laisse à penser des façons différentes pour prouver ou non l'existence d'un effet de l'enzyme sur la digestibilité des AA. De plus, le mécanisme par lequel la phytase exercerait son effet n'est pas bien connu. Pour tirer des conclusions pertinentes et les considérées comme une connaissance utilisable et une généralité, il n'est pas possible de se baser sur une seule expérimentation vu la taille limitée de celle-ci d'une part, et d'autre part, sa dépendance au milieu expérimental (Sauvant et al., 2005). L'hypothèse de base de ce travail de thèse était la résolution de ce débat concernant la phytase

apportant ainsi une meilleure compréhension des phénomènes sous-jacents de son effet sur la digestibilité des AA par une approche méta-analytique.

Comme pour la phytase, les effets de la xylanase sur la digestibilité des AA et sur le contenu en énergie métabolisable des aliments chez le poulet sont variables et pourront donc être mieux définis par l'approche méta-analytique.

5.2. Choix du modèle statistique

Dans le cadre de ce projet trois bases de données ont été construites en utilisant le logiciel Excel 2013, ces bases étudiaient :

- L'effet de l'ajout de la phytase sur la digestibilité des AA chez le porc : études publiées entre 1994 et 2015.
- L'effet de l'ajout de la phytase sur la digestibilité des AA chez le poulet : études publiées entre 1997 et 2016.
- L'effet de l'ajout de la xylanase sur la digestibilité des AA et du contenu en EMA chez le poulet : études publiées entre 1997 et 2018.

À la fin de cette phase, les bases de données comprenaient des informations générales (le nom de l'auteur, la date de publication, le nom du journal, l'objectif de l'étude), des données qualitatives (sexe des animaux, procédure chirurgicale, marqueur inerte utilisé, nom commercial et scientifique de la phytase /xylanase) et des données quantitatives (phytase végétale et microbienne, xylanase, protéine brute (PB), AA, Ca, P, P phytique, ADF, NDF, Énergie brute (EB)).

Une analyse des données par méta-analyse comme proposée par Sauvante et al., (2005) a été réalisée. Une visualisation graphique était essentielle pour avoir une idée globale sur la distribution des données (uniformité, variations intra et interétudes) et sur la relation entre les variables dépendantes (digestibilité des AA, flux digestibles des AA et EMA) et les variables indépendantes, dont les concentrations en phytase et en xylanase exogène. À l'aide d'une telle représentation, les données (ou études) aberrantes sont facilement décelées pour être écartées des bases de données. L'analyse graphique permet de mieux définir le modèle

statistique lors de l'analyse des données. En fait, cela permet de repérer les paramètres les plus susceptibles d'influencer la digestibilité des AA et de l'EMA pour les inclure dans les modèles et aussi pour voir la nature des relations entre les variables (linéaire/ quadratique) qui seront incluses dans le modèle statistique. Les corrélations entre les variables ont été testées en interétudes (coefficient de Pearson), pour avoir une idée générale sur la dispersion des données et en intraétudes par des modèles GLM où l'effet publication a été inclus. Les relations entre les variables indépendantes et les variables dépendantes ont été testées par des modèles GLM incluant l'effet publication afin de prendre en considération le fait que certains résultats proviennent de la même publication. Le principal but est donc l'identification de variables explicatives (prédicteurs) pour établir la loi de réponse. Suite à l'étude des relations entre les variables mises en évidence, les prédicteurs choisis peuvent être modulés.

Cette partie de la méta-analyse repose sur le choix entre l'effet fixe et l'effet aléatoire des modalités d'étude. Dans cette méta-analyse, l'effet étude a été considéré comme étant aléatoire comme ce qui a été suggéré par Sauviant et al., (2008) et par St-Pierre (2001). En fait, l'étude devrait être considérée comme étant un effet aléatoire « *si chaque expérimentation peut être considérée comme un échantillon pris au hasard d'une population unique plus large* » (Sauviant et al., 2005). Dans ce cas, chaque étude est un résultat aléatoire d'une grande population d'études et les différences entre les études résultent de la variabilité d'échantillonnages aléatoires (Sauviant et al., 2005).

Les modèles empiriques sont toujours considérés comme étant « auto validés » dans les champs des données et des facteurs considérés (Loncke, 2009). Cependant, une validation interne a été réalisée afin de s'assurer de la pertinence des modèles prédictifs établis. La validation externe n'était pas possible, car l'ensemble des données publiées a été utilisé pour générer les modèles. Ainsi la méthode de validation croisée (ou cross validation) a été appliquée pour évaluer les modèles statistiques et s'assurer de leur pertinence. Le principe de cette méthode consiste à segmenter l'échantillon de base en plusieurs échantillons (p). Le modèle sera établi sur l'un des k échantillons de base, et les (p-1) autres échantillons seront utilisés pour la validation du l'échantillon testé (Messad, 2016).

5.3. Apport de la thèse à la compréhension des mécanismes d'action de la phytase chez le porc et le poulet

Le phytate forme des complexes binaires avec les AA à des pH acides, soit dans le proventricule et le gésier chez le poulet (Selle et Ravindran, 2007) et dans l'estomac chez le porc (Selle et Ravindran, 2008). Les complexes tertiaires formés entre le phytate, les cations divalents (Ca, Mg, et Zn) et les AA se déroulent à des pH basiques, soit dans le duodénum, le jéjunum et l'iléon chez le porc et le poulet (Selle et Ravindran, 2007 ; Selle et Ravindran, 2008) (Figure 5-1).

La phytase améliore la digestibilité des AA soit par :

- Une action directe sur la digestibilité des AA.

- Une diminution des pertes endogènes des AA : l'hydrolyse du phytate par la phytase entraîne la diminution de la sécrétion de la mucine riche en AA. En fait, la formation de *novo* de complexes binaires et tertiaires entre la protéine et le phytate entraîne l'augmentation de la sécrétion de la pepsine et de HCl en tant qu'un mécanisme compensatoire pour l'hydrolyse de la protéine, ce qui engendre l'augmentation de la sécrétion de la mucine riche en AA (Selle et Ravindran, 2008).

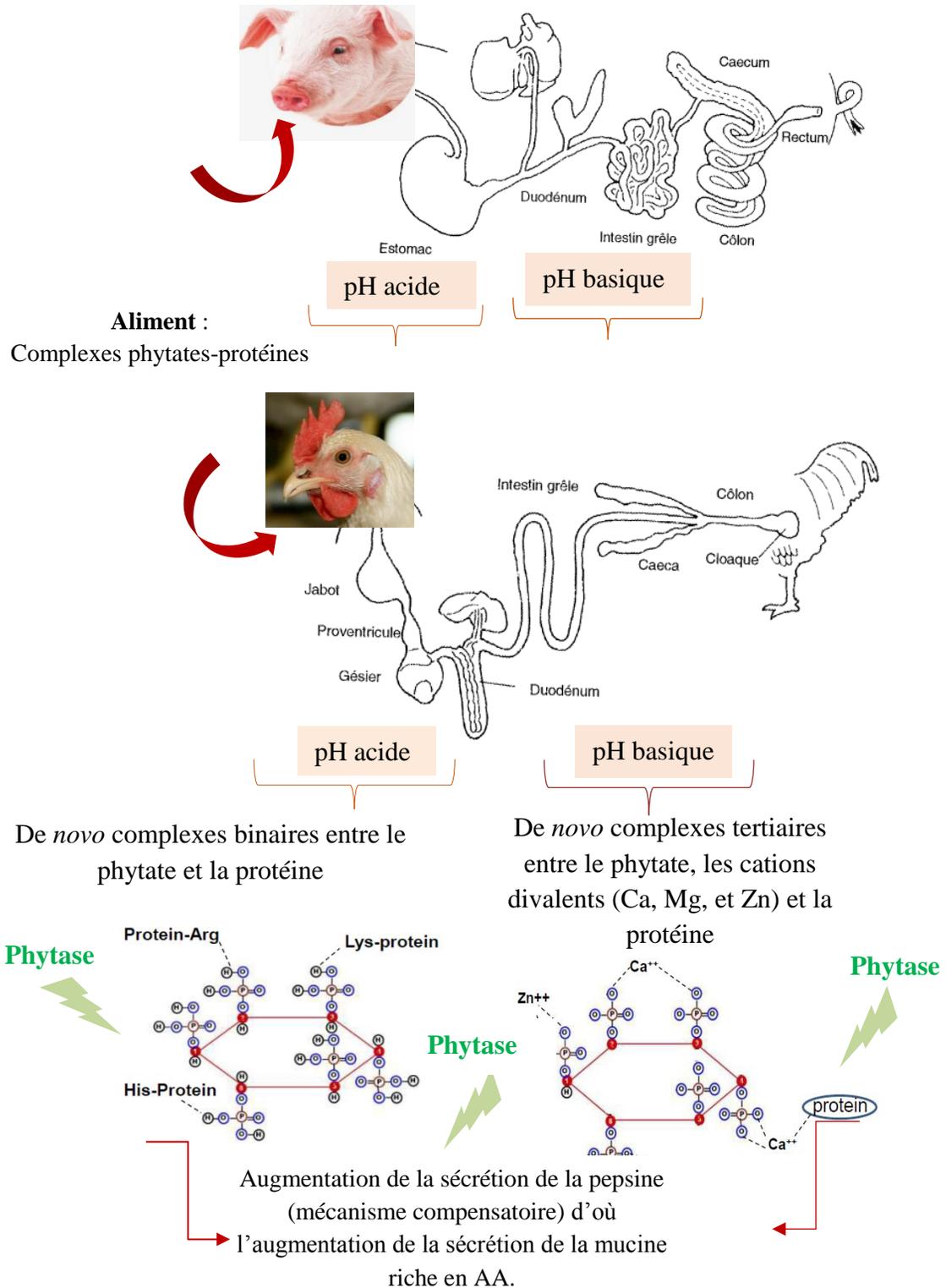


Figure 5-1 Interactions possibles entre le phytate et la protéine dans le tube digestif du porc et du poulet (adapté de Crevieu-Gabriel, 1999 ; Plumstead, 2015).

5.4. Apport de la thèse à la prédiction de la digestibilité des acides aminés chez le porc et le poulet sous l'effet de l'ajout de la phytase

5.4.1. Prédiction de la digestibilité des acides aminés chez le porc

La première hypothèse de cette thèse est qu'il est possible de prédire l'augmentation de digestibilité des AA par l'ajout de phytase microbienne dans les aliments pour porcs (Chapitre 2).

Chez le porc, les résultats ont montré l'efficacité de la phytase sur les coefficients de DIA et sur les flux digestibles. Les éléments qui ont été retenus dans la prédiction des coefficients de DIA ainsi que des flux digestibles des AA sont : la phytase microbienne incorporée dans les régimes alimentaires (FTU/ kg aliment), la quantité d'AA d'origine alimentaire (g/ kg aliment) et la concentration de la fibre alimentaire NDF (g/kg aliment). Le contenu en P phytique est lié à l'action de la phytase pour les aspects P, mais aucune interaction n'a été décelée entre la phytase et le P phytique pour ce qui est des AA, ce qui laisse croire que la phytase microbienne pourrait exercer son effet sur la digestibilité des AA indépendamment de la quantité de P phytiques présents dans les aliments (Liao et al., 2005) ou que dans l'intervalle de P phytiques de la base de données, l'action de la phytase sur les AA soit la même. Le Ca est bien connu comme étant un pont cationique impliqué dans la formation de complexes tertiaires avec le P phytique et les AA (Selle et al., 2009). Par contre dans la présente étude, il semble être sans effet sur l'action de la phytase sur les AA. Bien que l'effet de la fibre alimentaire NDF soit confirmé sur la digestibilité des AA (Dégen et al., 2011), l'interaction entre la fibre et la phytase était absente. En fait, la figure 5-2 qui suit présente l'effet de la phytase sur la DIA de la lysine à deux doses de NDF : 100 et 150g/kg d'aliment, il est bien clair que la fibre NDF affecte négativement la DIA de l'AA.

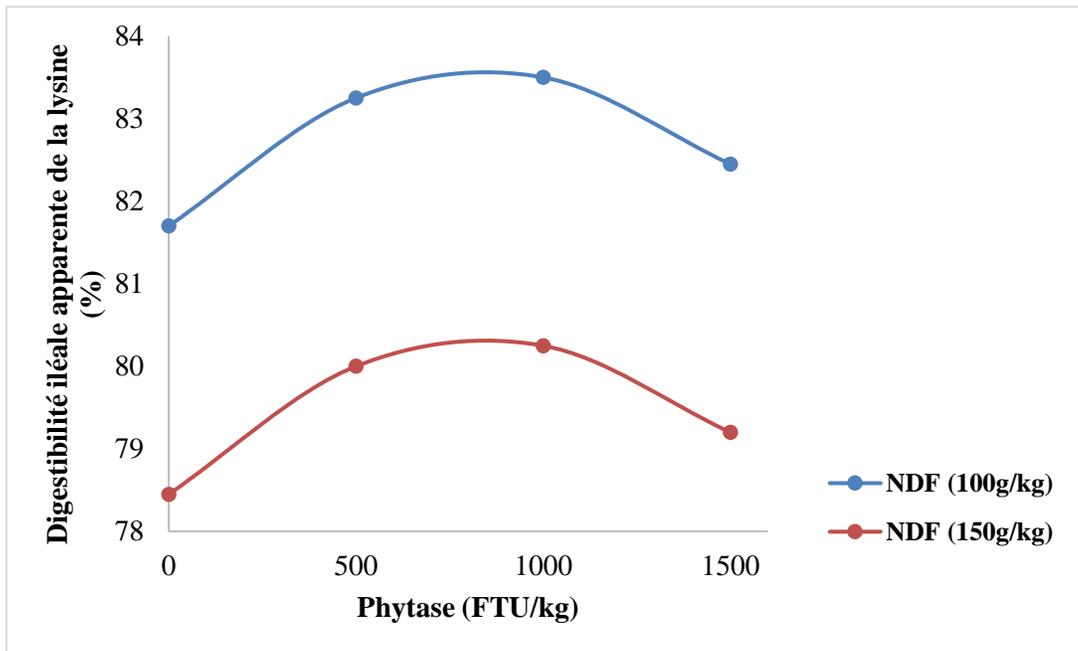


Figure 5-2 Effet de la phytase sur la DIA de la lysine à 100 et 150 g de NDF / Kg d'aliment.

Cependant la cause de l'absence des interactions dans la présente étude est possiblement due à l'une des limites des méta-analyses compte tenu du manque de variabilité intraétude des quantités de P phytique, de Ca et de fibre (Figure 5-3). Par conséquent, il ne faut pas rejeter les hypothèses de l'effet du P phytique, des complexes tertiaires ainsi que de la fibre sur l'action de la phytase et la digestibilité des AA.

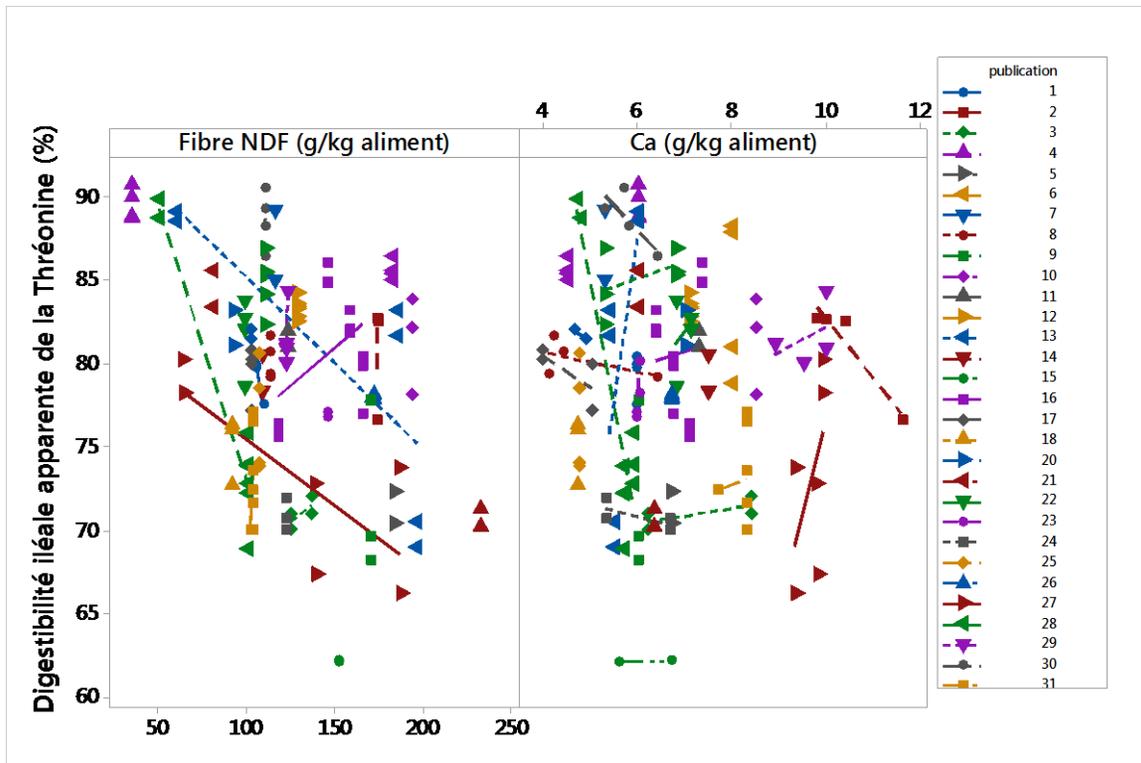


Figure 5-3 Distribution de la fibre NDF et du Ca alimentaire intra-publication dans la base de données du porc.

5.4.2. Prédiction de la digestibilité des acides aminés chez le poulet

La deuxième hypothèse était qu'il est possible de prédire la digestibilité des AA sous l'effet de l'ajout de la phytase microbienne dans la ration alimentaire des poulets (Chapitre 3).

L'effet positif de la phytase sur les coefficients de DIA et sur les flux digestibles des AA a été confirmé chez le poulet. Les prédicteurs qui ont été retenus dans la prédiction des coefficients de digestibilité iléale ainsi que des flux digestibles des AA sont : la phytase microbienne incorporée dans les régimes alimentaires (FTU/ kg aliment), la quantité d'AA d'origine alimentaire (g/ kg aliment) et la concentration du P phytique (g/ kg aliment). Cette étude confirme l'effet négatif du P phytique sur la digestibilité des AA (Selle et al., 2006), mais la phytase agit aussi indépendamment de la quantité du P phytique comme pour le porc (Ravindran et al., 1999). Dans la figure 5-4 qui suit, l'effet de la phytase sur la digestibilité

de la thréonine est presque identique, soit 6,3% et 6,4% à deux doses de P Phytique, 2 et 4 g/kg d'aliment respectivement.

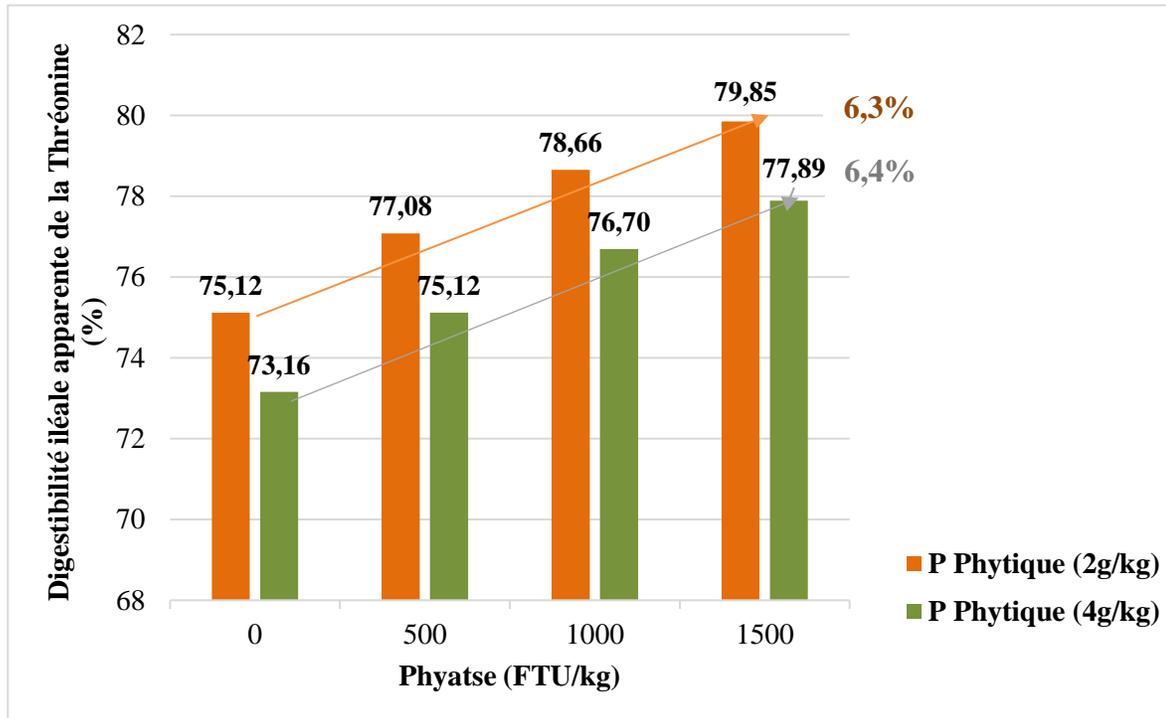


Figure 5-4 Effet de la phytase sur la DIA de la thréonine à 2 et à 4 g de P Phytique / Kg d'aliment.

5.4.3. Comparaison de l'effet de la phytase entre le porc et le poulet

L'un des objectifs de cette thèse était de comparer l'effet de la phytase sur la digestibilité des AA chez le porc et le poulet, et ce, notamment pour en apprendre davantage sur le mécanisme d'action de la phytase. Il est cependant important de noter que les méthodes de collecte des digesta ne sont pas les mêmes pour le porc et la volaille. Chez le porc, la collecte des digesta se fait à l'aide de canules iléales (Nyachoti et al., 1997) tandis que pour le poulet, la collecte est réalisée après euthanasie des animaux (Lemme et al., 2004). Cette différence dans la méthode de collecte pourrait avoir des effets sur les résultats obtenus chez les deux espèces.

Le point le plus important qui diffère entre les deux espèces est l'effet de la fibre NDF qui apparaît bien chez le porc alors qu'il est absent chez le poulet. Chez le porc, les coefficients de DIA étaient corrélés négativement et linéairement avec la fibre NDF pour tous les AA essentiels étudiés. Par contre, aucun effet de la fibre NDF n'a été décelé dans le cas du poulet. Parmi les explications possibles se trouve les quantités de fibres NDF étudiées dans la base de données de chaque espèce : les régimes alimentaires présents dans la base de données du porc renfermaient jusqu'à 232 g de fibre NDF /kg aliment vs 136 g/kg de fibre NDF dans la base de données du poulet. Pour le porc comme le poulet, aucune interaction entre la fibre NDF et la phytase n'a été trouvée dans cette étude.

Quant au P phytique, il affectait négativement la DIA des AA chez le poulet, mais pas chez le porc. Ainsi, il est probable que le P phytique est un élément antinutritionnel plus important chez le poulet que chez le porc (Cowieson et al., 2017). Cependant, les données présentes pour le poulet sont d'une variabilité plus marquée en termes de concentration de P phytique (maximum 7,80 g/kg aliment vs maximum 4,90g/kg aliment pour le porc). Cette plus grande variabilité pourrait être la cause directe de la présence de l'effet du P phytique sur la DIA des AA chez le poulet. Il est cependant à noter qu'une telle dose élevée de P phytique chez le poulet n'est pas représentative des rations en pratique.

L'hypothèse d'une action de la phytase sur les pertes endogènes intestinales a été bien confirmée chez le porc et le poulet où l'action de la phytase était plus marquée pour la thréonine (Figure 5-5) qui est un AA abondant dans les pertes endogènes (Lien et al., 1997; Selle et al., 2012) associé notamment à la production de la mucine (Cowieson et al., 2004). De plus, chez le poulet, l'effet de la phytase était important pour la cystéine, la serine et l'acide aspartique qui sont des constituants importants de la mucoprotéine (Adedokun et al., 2007). D'une façon générale, l'effet de la phytase sur les AA digestibles est comparable chez le porc et le poulet où il est linéaire dans l'intervalle d'inclusion de 0 à 1000 unités de phytase (Figure 5-6). Cependant, l'ampleur de l'effet de la phytase est différente pour chaque AA considéré entre le porc et le poulet. L'effet de la phytase sur la DIA des AA chez le porc est plus faible que chez le poulet pour la plupart des AA essentiels : Thr, Tyr, Ile, Leu, Phe, Arg et His (Cowieson et al., 2017). La figure 5-5, illustre les pourcentages d'amélioration de 500 FTU de phytase/kg aliment sur la DIA des AA chez le porc et le poulet.

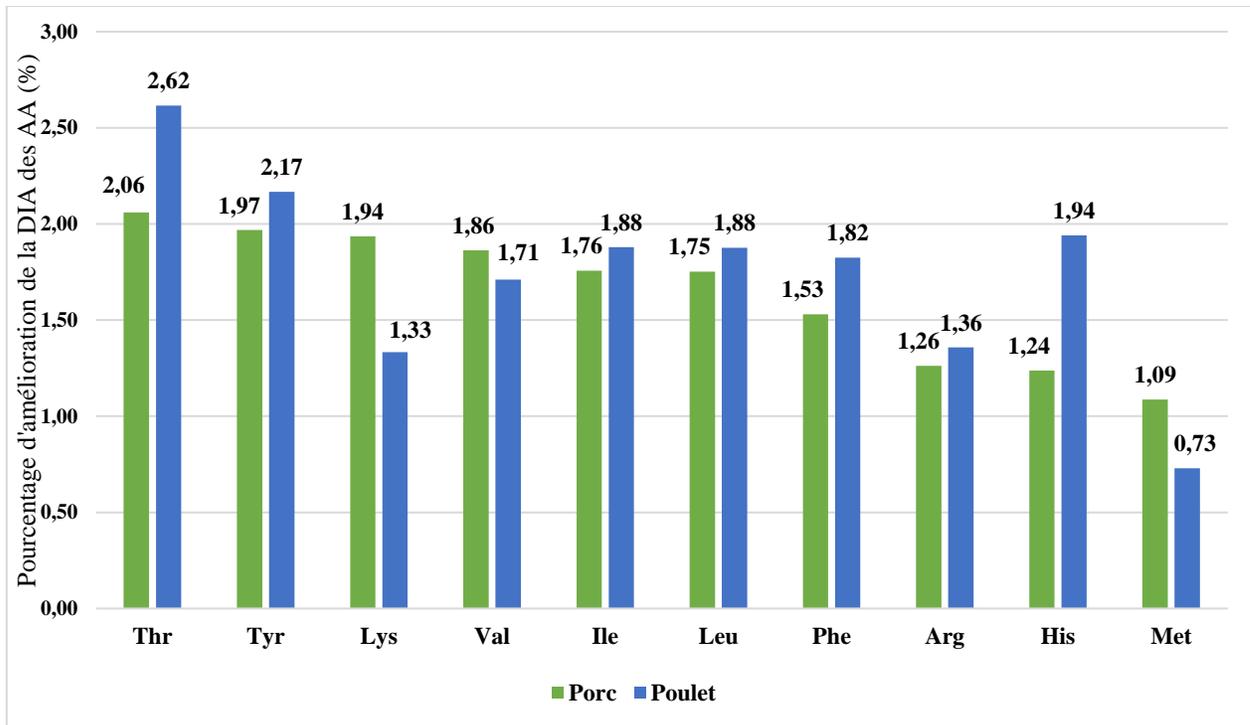


Figure 5-5 Effet de l'incorporation de 500 FTU de phytase/kg d'aliment sur la digestibilité iléale apparente des AA chez le porc et le poulet.

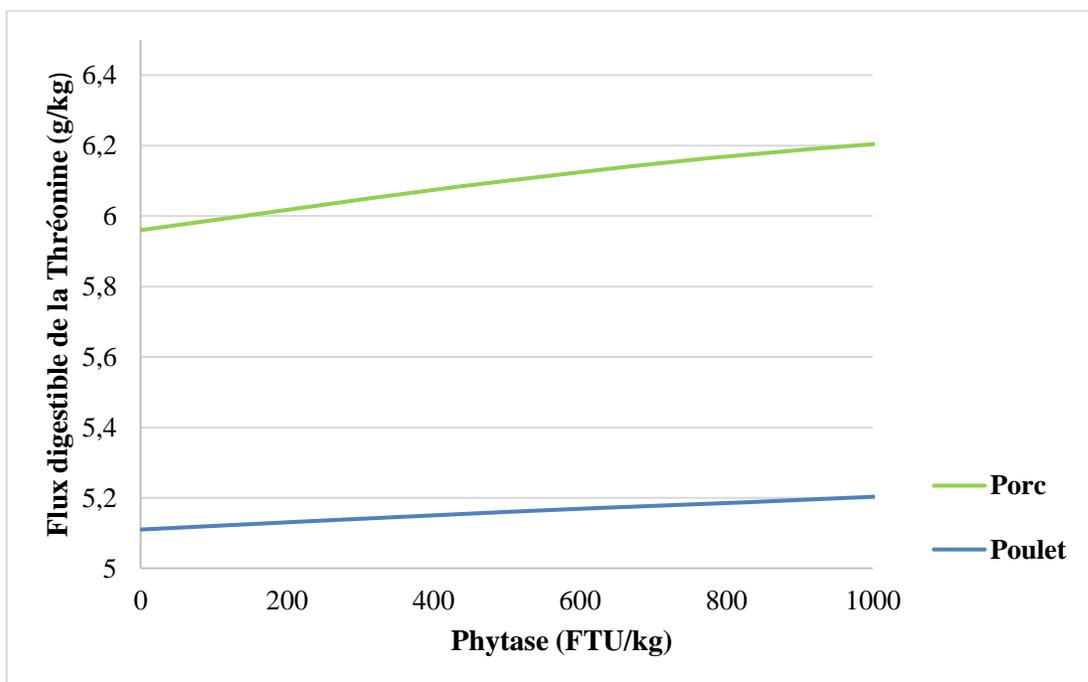


Figure 5-6 Effet de la phytase sur le flux digestible de la thréonine chez le porc et le poulet.

Pour mieux estimer l'effet de la phytase en formulation, le tableau 5-1 illustre l'effet de l'incorporation de 500FTU de phytase en gramme de lysine, thréonine et méthionine digestibles chez le porc et le poulet.

Tableau 5-1 Effet de l'incorporation de 500 FTU de phytase en gramme d'acides aminés digestibles.

	Lysine (g/kg)	Thréonine (g/kg)	Méthionine (g/kg)
Porc	0,19	0,06	0,01
Poulet	0,14	0,17	0,05

5.5. Apport de la thèse à la prédiction de la digestibilité des acides aminés et de l'énergie métabolisable apparente chez le poulet sous l'effet de l'ajout de la xylanase

La troisième hypothèse de cette thèse est qu'il est possible de prédire la digestibilité des AA et du contenu en EMA sous l'ajout de la xylanase dans la ration alimentaire des poulets (Chapitre 4). L'aspect de la xylanase a été étudié seulement chez le poulet. En fait, le nombre de publications dans la littérature traitant l'effet de la xylanase chez le poulet est élevé comparé au porc. Aussi, la xylanase semble être plus efficace chez le poulet ; en plus du temps de transit des digesta qui est environ six fois plus élevé chez le porc, la viscosité des digesta semble être plus élevée chez le poulet que chez le porc (Bedford et Schulze, 1998).

L'effet de la xylanase a été évalué chez le poulet. L'étude a montré que la xylanase améliore la digestibilité des AA ainsi que le contenu en EMA chez le poulet (Liu et al., 2016), ce qui suggère que l'amélioration de la digestibilité de la fibre vient réduire son effet négatif sur la disponibilité des autres nutriments. La xylanase pourrait augmenter la digestibilité des AA par une diminution de la viscosité intestinale (Bedford et al., 1992) ou par la suppression de « l'effet cage » engendré par la fibre et constituant un obstacle qui empêche les enzymes d'accéder à leurs substrats (Simon et al., 1998).

L'âge des animaux (Pirgozliev et al., 2010) et le type de céréale devraient avoir un effet sur l'action de la xylanase vis-à-vis à la digestibilité des AA ainsi que sur l'EMA. Dans cette étude, ces deux effets n'ont pu être montrés faute de variabilité du type de régime ainsi que de l'âge des animaux intraétude. Il aurait été intéressant de tester l'effet de la xylanase sur la digestibilité de la fibre chez le poulet, néanmoins ceci n'a pas été possible dans le cadre de la base de donnée disponible en raison de l'hétérogénéité des mesures réalisées sur la fibre où plusieurs mesures ont été distinguées à savoir : la digestibilité totale de la fibre brute, de la fibre NDF et de la fibre ADF ainsi que la DIA de la fibre NDF et la DIA de la fibre ADF.

5.6. Conclusion et perspective

L'objectif de ce travail de thèse était de prédire l'effet de la phytase sur la DIA des AA chez le porc et le poulet ainsi que l'effet de la xylanase sur la DIA des AA et sur le contenu en EMA chez le poulet. L'étude a mis en évidence un certain nombre de prédicteur de la DIA des AA chez le porc et le poulet tels que l'enzyme considérée (phytase/xylanase), la teneur en AA alimentaire, la fibre et le P phytique alimentaire. Pour le contenu en EMA chez le poulet, les prédicteurs étaient la xylanase, l'énergie brute et la fibre. Il serait intéressant de maintenir à jour les bases de données permettant d'apporter des nouveautés qui élargissent le champ de validité des modèles de prédiction.

La phytase est une enzyme bien connue et utilisée très largement dans l'industrie porcine et avicole pour une meilleure utilisation du P. Pour les AA, les résultats ne sont pas homogènes et toujours dans le sens favorable. Cette étude a permis de confirmer l'effet positif de la phytase sur la digestibilité des AA et de quantifier son effet chez le porc et le poulet. L'effet de la xylanase a aussi été confirmé sur la digestibilité des AA ainsi que sur le contenu en EMA chez le poulet. Pour la xylanase, il serait intéressant d'évaluer si d'autres facteurs, comme le type de céréale du régime et l'âge des poulets, pourraient améliorer la précision du modèle. La principale limite de cette méta-analyse était le manque de la variabilité intraétude des éléments étudiés comme le P phytique, le Ca et la fibre empêchant l'étude de l'interaction entre ces éléments et l'action des enzymes sur la digestibilité des AA. Il est possible de

vérifier l'effet de ces éléments par la réalisation d'essais tout en variant leurs concentrations dans le régime alimentaire.

Pour mettre en valeur les résultats trouvés dans cette étude, il sera intéressant de constituer un logiciel de prédiction de la digestibilité des AA des aliments utilisés en production porcine et avicole sous l'effet de l'ajout de la phytase et de la xylanase. Ce travail pourrait être suivi par une prédiction de l'effet de la xylanase sur la DIA et du contenu de l'énergie métabolisable chez le porc. En fait une base de données renfermant une trentaine de publications est déjà prête pour être mise à jour et étudiée.

Une autre étude pourrait aussi être menée afin de tester l'effet combiné de la phytase et de la xylanase sur la digestibilité des AA par méta-analyse chez le porc et le poulet pour prédire et quantifier l'ajout simultané de ces deux enzymes sachant qu'ils sembleraient agir ensemble : « effet synergique » (Cowieson et Bedford, 2009). Le mode d'action de la xylanase reste encore plus ou moins bien connu et nécessite d'autres travaux pour une meilleure connaissance de son substrat. En fait, avec la dégradation de la paroi cellulaire, cette enzyme pourrait engendrer un effet marqué sur la disponibilité de plusieurs nutriments. Même si les facteurs antinutritionnels abondants dans les aliments destinés aux porcs et aux poulets tels que le P phytique et les PNA affectent la digestibilité des nutriments, ces facteurs pourraient avoir également un impact positif sur la santé digestive des animaux. C'est le cas de la mucine dont la sécrétion est incitée par la présence de P phytiques et qui s'avère importante pour la protection de la barrière intestinale. Conséquemment, la question qui se pose aujourd'hui est que devrait-on bannir complètement ces facteurs antinutritionnels de l'alimentation ou les laisser à des doses minimales dans le but de stimuler le système de défense de l'animal ?

5.7. Références

- Adedokun, S. A., Parsons, C. M., Lilburn, M. S., Adeola, O., Applegate, T. J., 2007. Endogenous amino acid flow in broiler chicks is affected by the age of birds and method of estimation. *Poultry Science*. 86, 2590-2597.
- Bedford, M. A., Schulze, H., 1998. Exogenous enzymes for pigs and poultry. *Nutrition research reviews*. 11, 91-114.
- Bedford, M. R., Classen, H. L., 1992. Reduction of intestinal viscosity through manipulation of dietary rye and pentosanase concentration is effected through changes in the carbohydrate composition of the intestinal aqueous phase and results in improved growth rate and food conversion efficiency of broiler chicks. *The Journal of Nutrition*. 122, 560-569.
- Bedford, M.R., Partridge, G.G., 2001. *Enzymes in farm animal nutrition*. Centre for Agricultural Bioscience International.
- Cabahug, S., Ravindran, V., Selle, P.H., Bryden, W.L., 1999. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus contents. I. Effects on bird performance and toe ash. *British Poultry Science*. 40, 660-666.
- Cowieson, A. J., Ruckebusch, J. P., Sorbara, J. O. B., Wilson, J. W., Guggenbuhl, P., Tanadini, L., Roos, F. F., 2017. A systematic view on the effect of microbial phytase on ileal amino acid digestibility in pigs. *Animal Feed Science and Technology*. 231, 138-149.
- Cowieson, A., Bedford, M., 2009. The effect of phytase and carbohydrase on ileal amino acid digestibility in monogastric diets: complimentary mode of action? *World's Poultry Science Journal*. 65, 609-624.
- Cowieson, A.J., Acamovic, T., Bedford, M.R., 2004. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. *British Poultry Science*. 45, 101-108.
- Creveu-Gabriel, I., 1999. Digestion des protéines végétales chez les monogastriques. Exemple des protéines de pois. *INRA Productions Animales*. 12, 147-161.
- Dégen, L., Halas, V., Tossenberger, J., Babinszky, L., 2011. Dietary impact of NDF from different sources on the apparent ileal digestibility of amino acids. *Acta Agraria Kaposváriensis*. 15, 1-11.
- Düngelhoef, M., Rodehutschord, M., Spiekers, H., Pfeffer, E., 1994. Effects of supplemental microbial phytase on availability of phosphorus contained in maize, wheat and triticale to pigs. *Journal of Animal Science and Technology*. 49, 1-10.
- Lemme, A., Ravindran, V., Bryden, W.L., 2004. Ileal digestibility of amino acids in feed ingredients for broilers. *World's Poultry Science Journal*. 60, 423-438.
- Liao, S., Kies, A., Sauer, W., Zhang, Y., Cervantes, M., He, J., 2005. Effect of phytase supplementation to a low- and a high-phytate diet for growing pigs on the digestibilities of crude protein, amino acids, and energy. *Journal of Animal Science*. 83, 2130-2136.
- Lien, K., Sauer, W., Fenton, M., 1997. Mucin output in ileal digesta of pigs fed a protein-free diet. *Z Ernährungswiss*. 36, 182-190.
- Liu, W. C., Kim, I. H., 2016. Effects of dietary xylanase supplementation on performance and functional digestive parameters in broilers fed wheat-based diets. *Poultry Science*. 96, 566-573.

- Loncke, C., 2009. Modélisation des relations entre l'alimentation et les flux splanchniques de nutriments énergétiques chez le ruminant. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Thèse de Doctorat, Agro Paris Tech. France.
- Messad, F., 2016. Prédiction de la digestibilité des acides aminés des ingrédients utilisés en alimentation porcine : approche par méta-analyse. Thèse de Doctorat, Université Laval, Canada.
- Nitrayová, S., Patras, P., Sommer, A., Heger, J., 2006. Effect of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of phosphorus-adequate diets in growing pigs. *Archives of Animal Nutrition*. 60, 131-140.
- Nyachoti, C., Lange, C.d., McBride, B., Schulze, H., 1997. Significance of endogenous gut nitrogen losses in the nutrition of growing pigs: a review. *Canadian Journal of Animal Science*. 77, 149-163.
- Pirgozliev, V., Bedford, M. R., Acamovic, T. 2010. Effect of dietary xylanase on energy, amino acid and mineral metabolism, and egg production and quality in laying hens. *British Poultry Science*. 51, 639-647.
- Plumstead, P. W., 2015. Winning with phytase. Department of Animal and Wildlife Sciences, University of Pretoria, SA.
- Ravindran, V., Cabahug, S., Ravindran, G., Selle, P.H., Bryden, W.L., 2000. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorous levels. II. Effects on apparent metabolisable energy, nutrient digestibility and nutrient retention. *British Poultry Science*. 41, 193-200.
- Ravindran, V., Cabahug, S., Ravindran, G., Bryden, W., 1999. Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broilers. *Poultry Science*. 78, 699-706.
- Sauvant, D., 2005. La modélisation de la réponse des porcs aux pratiques alimentaires et d'élevage. Journées de la Recherche Porcine, Paris.
- Sauvant, D., Schmidely, P., Daudin, J., 2005. Les méta-analyses des données expérimentales : applications en nutrition animale. *INRA Productions Animales*. 18, 63-73.
- Sauvant, D., Schmidely, P., Daudin, J.J., St-Pierre, N.R., 2008. Meta-analyses of experimental data in animal nutrition. *Animal*. 2, 1203-1214.
- Selle, P. H., Ravindran, V., Bryden, W. L., Scott, T., 2006. Influence of dietary phytate and exogenous phytase on amino acid digestibility in poultry: a review. *The Journal of Poultry Science*. 43, 89-103.
- Selle, P.H., A.J. Cowieson, and V. Ravindran. 2009. Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. *Livestock Science*. 124:126–141.
- Selle, P.H., and V. Ravindran. 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology*. 135, 1–41.
- Selle, P.H., Ravindran, V., 2008. Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. *Livestock Science*. 113, 99-122.
- Selle, P.H., Cowieson, A.J., Cowieson, N.P., Ravindran, V., 2012. Protein–phytate interactions in pig and poultry nutrition: a reappraisal. *Nutrition Research Reviews*. 25, 1-17
- Selle, P.H., Ravindran, V., 2008. Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. *Livest. Sci*. 113. 99–122.
- Selle, P.H., Ravindran, V., Caldwell, A., Bryden, W.L., 2000. Phytate and phytase: consequences for protein utilisation. *Nutrition Research Reviews*. 13, 255-278.

- Simon, O., 1998. The mode of action of NSP hydrolysing enzymes in the gastrointestinal tract. *Animal Feed Science and Technology*. 7, 115-123.
- St-Pierre, N., 2001. Invited review: integrating quantitative findings from multiple studies using mixed model methodology¹. *Journal of Dairy Science*. 84, 741–755.