UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : SSBCV

BOA, INRAE, Université de Tours, UMR 0083, 37380 Nouzilly
Équipe Génétique Nutrition Systèmes

THÈSE en cotutelle

présentée par :

Fabien HERVO

soutenue le : **24 mai 2023**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Tours**
Discipline/ Spécialité : Science de la vie

Optimisation de l'utilisation digestive du calcium et du phosphore chez la poule pondeuse

Vers un nouveau système d'évaluation des besoins par une approche de modélisation

THÈSE dirigée par :

Mme. NARCY Agnès	Ingénieure de Recherche, BOA, INRAE
Mme. LÉTOURNEAU-MONTMINY Marie-Pierre	Professeure Agrégée, Université Laval

RAPPORTEURS :

M. LESCOAT Philippe	Professeur, AgroParisTech
M. DOURMAD Jean-Yves	Ingénieur de Recherche, PEGASE, INRAE

JURY :

Mme. MONTAGNE Lucile	Professeure, PEGASE, INRAE, Institut Agro
M. GUAY Frédéric	Professeur, Université Laval
M. LESCOAT Philippe	Professeur, AgroParisTech
M. DOURMAD Jean-Yves	Ingénieur de Recherche, PEGASE, INRAE
Mme. NARCY Agnès	Ingénieure de Recherche, BOA, INRAE
Mme. LÉTOURNEAU-MONTMINY Marie-Pierre	Professeure Agrégée, Université Laval

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail, Philippe Lescoat et Jean-Yves Dourmad en tant que rapporteurs, Lucile Montagne, Frédéric Guay, Agnès Narcy et Marie-Pierre Létourneau-Montminy en tant qu'examniteurs·trices.

Quelle aventure ! Si on m'avait dit un jour que je quitterais ma Bretagne natale et traverserais l'Atlantique pour réaliser un doctorat, je n'y aurais sûrement jamais cru.

En premier lieu, je tiens à remercier mes deux directrices de thèse, sans qui rien n'aurait été possible : Marie-Pierre Létourneau-Montminy et Agnès Narcy. Dès le commencement, elles ont cru en moi, puis ont su me guider sur la route sinueuse du doctorat. Je les remercie de m'avoir transmis leur savoir et leurs compétences tout au long de l'aventure (et même plus !). Je les remercie pour tout le temps qu'elles ont passé avec moi à me prodiguer leur conseils et m'aider à faire avancer mes réflexions. Merci pour leur bienveillance. Elles ont forgé le jeune chercheur que je suis en passe de devenir.

Je tiens également à remercier l'équipe GENUTS pour son accueil. Merci de m'avoir intégré dans votre équipe, aux plaisirs des réunions, aux délices des pauses café et aux joies des prélèvements. Je tiens particulièrement à remercier Eric Gambier pour m'avoir initié au travail de paillasse. Merci pour le temps qu'il a passé à m'aider, et pardon d'avoir mis le bazar dans son labo avec tous mes échantillons.

Je tiens tout particulièrement à remercier Bertrand Méda. Il a toujours été présent pour m'aider à prendre du recul sur mes travaux et me guider dans mon initiation à la modélisation. Merci pour tout le temps que je lui ai emprunté et que je compte bien lui rendre !

Je remercie aussi tous les « non titulaires » de l'UMR BOA que j'ai croisée sur ma route : Léa Cornaille, Salomé Chaumont, Philippe Bochereau, Maëva Halgrain, Marlies van den Nieuwenhof, Clément Gérard, Barra Ezzo, et tous les autres. Merci pour les moments passés ensemble.

Ce doctorat a été l'occasion pour moi de découvrir le Québec, ses températures glaciales et ses habitants chaleureux ! Merci à tous les doctorants et post-doctorants de ULaval que j'ai rencontré : Marion Lautrou, Lucie Galliot, Raphaël Ghautier et Angel René Alfonso Avila. Merci pour leur soutient, leur bonne humeur et tous les bons moments passés ensemble. Merci à Théophane de Rauglaudre. Merci de m'avoir soutenu pour ma première com' internationale.

« *On choisit ses amis, mais rarement sa famille* » disait Renaud. Je ne changerais de famille pour rien au monde ! Merci à mes parents d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir motivé. Merci de leur patience, de leur confiance et de leur amour. Merci également à mes deux grandes sœurs à qui je dois beaucoup. Je dédie cette thèse à mes neveux et nièces, en particulier à mon filleul.

Merci aussi à ma belle-famille. Merci pour leurs paroles bienveillantes et réconfortantes. Vos énergies positives m'ont fait énormément de bien durant les passes plus difficiles de la thèse.

Un immense merci à tous mes amis, merci d'être toujours là, merci de m'apporter joie, bonheur et amour ! Merci à la Biche, leur sincérité et aussi leur folie me font toujours autant de bien. Un merci tout particulier à PTGC pour leur tendresse et leur amour. Merci aux Margoulins pour leur folie. Enfin, merci à mes amis d'enfance : on a grandi ensemble, et pourtant ils me supportent encore ! Merci à eux d'avoir toujours été là pour moi.

Enfin, pour Lucie que je ne saurais jamais remercier assez. Merci d'avoir cru en moi à chaque instant, et merci de m'avoir suivi dans cette aventure. Je n'y serai jamais arrivé sans elle ! Merci pour tout.

Résumé

Chaque jour, la poule exporte environ 2 g de calcium (Ca) pour constituer la coquille. Le décalage entre la disponibilité du Ca alimentaire et le besoin pour la coquille contraint la poule à mobiliser son os médullaire. Ce processus a pour effet de fragiliser progressivement le squelette et conduit à la libération et l'excrétion urinaire de phosphore (P). La fin de carrière de la poule, marquée par une baisse de la qualité de coquille, est donc aussi propice à l'apparition d'ostéoporose. Face à ces enjeux, un meilleur pilotage de l'alimentation minérale représente un levier d'intérêt pour maintenir la qualité du squelette et de la coquille, et limiter les rejets en P, tout au long du cycle de production. Ceci implique d'identifier des stratégies optimisant l'utilisation des minéraux, en particulier au niveau digestif, siège de processus complexes qu'il convient de mieux comprendre. L'objectif de ce doctorat était donc d'améliorer nos connaissances quant aux mécanismes contrôlant l'utilisation digestive du Ca et du P et de les intégrer dans un modèle mécaniste de recherche.

Si le carbonate de Ca particulaire et la phytase microbienne sont couramment utilisés dans l'alimentation des poules pondeuses, leurs effets, notamment combinés, sur la dynamique des flux digestifs de Ca et P sont peu connus. Un premier travail de méta-analyses des données de la littérature a permis de quantifier 1) l'effet du Ca particulaire pour améliorer l'utilisation du Ca par la poule et limiter la dégradation du squelette liée à l'âge et 2) l'effet de la phytase microbienne pour améliorer l'utilisation digestive du P, d'autant plus marqué que le régime est pauvre en P. Dans un second temps, l'interaction entre la taille des particules de Ca et la phytase microbienne a été étudiée à travers une expérimentation *in vivo*. Cette étude a montré que le Ca particulaire limite la formation de complexes entre le Ca et l'acide phytique favorisant ainsi l'action de la phytase microbienne. Ces travaux ont permis de formaliser des concepts qui ont été intégrés au sein d'un modèle mécaniste de recherche décrivant le devenir du Ca et du P dans le tube digestif de la poule pondeuse de façon dynamique à l'échelle de la journée. Ce modèle prend en compte les principales caractéristiques de l'aliment ainsi que le stade de calcification de la coquille, facteurs majeurs modulant l'utilisation digestive du Ca et du P.

Ce travail contribue à mieux comprendre le devenir du Ca particulaire au niveau digestif et ses interactions avec le P et la phytase microbienne. Il ouvre des perspectives évidentes d'amélioration de l'utilisation du Ca et du P chez la poule pondeuse *via* des stratégies nutritionnelles adaptées. Le couplage du modèle digestif développé à un outil décrivant les flux métaboliques contribuera au déploiement d'une alimentation minérale de précision répondant aux multiples enjeux auxquels est confrontée la production *i.e.*, qualité de coquille, intégrité du squelette et maîtrise des rejets de P.

Mots clés : nutrition, modélisation, poule pondeuse, calcium, phosphore

Abstract

Daily, the eggshell production requires more than 2 g of calcium (Ca), representing a challenge to the laying hen. Because of a gap between the availability of dietary Ca and the requirement for the eggshell, the hen mobilizes Ca from her medullary bone. This repeated bone mobilization leads to weak the skeleton and increases urinary excretion of phosphorus (P). The end of the laying period is thus, marked by a progressive degradation of the skeleton, but also by a decrease of the eggshell quality. In this context, optimizing mineral nutrition appears a key tool to maintain skeletal integrity, eggshell quality and to limit the P excretion throughout the production cycle. However, processes driving the digestive utilization of Ca and P are not well understood. The objective of this PhD was therefore to improve our knowledge concerning he digestive mechanisms of Ca and P utilization which was then integrated in a mechanistic and dynamic model of the fate of Ca and P into the digestive tract of the laying hen.

Coarse limestone and microbial phytase are commonly used in the diet of laying hens. However, the way they impact the digestive flows of Ca and P as well as their interaction are not well understood in hens. Thus, we first realized two meta-analyses to quantify 1) the effect of coarse Ca to improve Ca utilization by the hen and to limit age-related skeletal degradation and 2) the effect of microbial phytase to improve digestive P utilization in a low P diet. Secondly, we studied how coarse limestone could impact phytase efficacy through an *in vivo* approach. Coarse limestone presented a lower propension than fine limestone to complex phytic acid, thus improving phytase efficacy. This work provided key concepts and quantifications to develop a mechanistic research model describing the fate of Ca and P in the digestive tract of the laying hen in a dynamic way and on a daily scale. This model integrates the main diet effects and the stage of eggshell calcification, known to be the main factors impacting the digestive use of Ca and P.

This work improved our knowledge on the fate of coarse limestone and its interactions with P and microbial phytase, making possible the optimization of digestive utilization of these minerals. Further, by coupling the current model to a dynamic model describing the metabolic flows of Ca and P, it will possible to answer multiple challenges of the laying hen's production in terms of eggshell quality, skeletal integrity and reduction of P excretion.

Key words: nutrition, modeling, laying hen, calcium, phosphorus

Table des matières

Remerciements ……...1

Résumé ……...3

Abstract ……..5

Table des matières ……..7

Liste des tableaux ……..……13

Liste des figures ……17

Liste des abréviations ……21

INTRODUCTION ……25

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE ……...…….29

1. La ponte : une histoire de cycles ……...31

1.1. Un cycle de ponte et des séries de pontes ……..31

1.2. Cycle folliculaire et cycle photopériodique …….....31

1.3. Formation de l'œuf et de ses constituants ……33

1.3.1. Cinétique de formation de l'œuf ……...33

1.3.2. Formation du jaune et du blanc ……33

1.3.3. Formation de la coquille : une situation d'homéorhèse ……35

1.3.4. Un export massif de calcium pour les besoins de la coquille ……39

1.3. Particularité de la poule pondeuse : l'os médullaire ……..41

2. Besoins nutritionnels en calcium et en phosphore de la poule pondeuse ……43

2.1. Le besoin en calcium ……43

2.1.1. L'appétit calcique spécifique ……45

2.2. Le besoin en phosphore ……47

2.2.1. Les différents systèmes de formulation en phosphore …….....49

3. Utilisation digestive du calcium et du phosphore ……51

3.1. Compartiments intervenant dans l'utilisation digestive du calcium et du phosphore ……...51

3.1.1. Le jabot …….51

3.1.2. L'estomac …….53

3.1.3. L'intestin …….....55

3.2. Mécanismes de solubilisation et d'hydrolyse du calcium et du phosphore …….57

3.2.1. Solubilisation des minéraux ……..57

3.2.2. Formation de complexes entre calcium et phosphore ……57

3.2.3. L'importance des phytases chez la poule pondeuse ..……59

3.2.4. L'utilisation de calcium particulaire pour resynchroniser l'apport et le besoin ……...63

3.3. Absorption des minéraux dans l'intestin ……...69

3.3.1. Voies d'absorption ……69

3.3.2. Leviers de régulation de l'absorption intestinale …….....77

4. Effet du vieillissement chez la poule ……85

4.1. Une production altérée avec le vieillissement de l'animal ……85

4.2. Une dégradation progressive du squelette ……85

4.3. Des altérations du métabolisme phosphocalcique chez la poule pondeuse……89

OBJECTIFS DE THÈSE ……..93

RÉSULTATS DE THÈSE ……99

CHAPITRE 1 − Caractérisation des principaux leviers alimentaires permettant d'optimiser l'utilisation digestive du calcium et du phosphore ……..101

Partie 1 : Effect of limestone particle size on performance, eggshell quality, bone strength, and *in vitro*/*in vivo* solubility in laying hens: a meta-analysis approach ……103

Partie 2 : Meta-analysis of dietary non-phytate phosphorus level, microbial phytase incorporation and age on phosphorus utilization in laying hens ……..123

CHAPITRE 2 − Étude de l'interaction entre la phytase microbienne et la taille des particules de carbonate de Ca sur la digestibilité pré-cæcale du calcium et du phosphore, sur les paramètres de production, de qualité de la coquille et de minéralisation osseuse ……..141

CHAPITRE 3 − Quantification des paramètres de l'utilisation digestive du calcium et du phosphore chez la poule pondeuse ……..161

CHAPITRE 4 − Développement d'un modèle mécaniste décrivant le devenir du calcium et du phosphore le long du tractus gastro-intestinal de la poule pondeuse …….183

Introduction ……...…185

1. Matériel et méthodes …….....187

1.1. Système considéré, entrées et sorties du modèle ……187

1.1.1. Description du système ……...187

1.1.2. Les entrées du modèle ……187

1.1.3. Les sorties du modèle ……..193

1.2. Caractérisation des différents segments gastro-intestinaux ……193

1.2.1. Caractérisation des segments pré-intestinaux ……193

1.2.2. Caractérisation des segments intestinaux ……197

1.3. Modélisation des processus chimiques intervenant au cours de la phase gastrique ……199

1.3.1. Hydrolyse du phosphore phytique par la phytase au cours de la phase pré-intestinale ……199

1.3.2. Devenir du carbonate de calcium au cours de la phase pré-intestinale ……203

1.3.3. Devenir des phosphates au cours de la phase pré-intestinale …….....205

1.3.4. Devenir des autres formes minérales au cours de la phase pré-intestinale ……207

1.4. Modélisation du devenir du calcium et du phosphore au cours de la phase intestinale ……209

1.4.1. Hydrolyse du phosphore phytique par la phytase intestinale ……..209

1.4.2. Insolubilisation du calcium et du phosphore dans l'intestin ……209

1.4.3. Absorption du calcium ……211

1.4.4. Absorption du phosphore ……211

1.5. Validation du modèle ……..211

2. Résultats et discussion ……217

2.1. Analyse de la sensibilité ……217

2.1.1. Calcium et phosphore solubilisés en sortie de gésier …….....217

2.1.2. Hydrolyse du phosphore phytique le long du tractus gastro-intestinal de la poule pondeuse ……219

2.1.3. Taux d'absorption du calcium et du phosphore dans les segments intestinaux …….....223

2.2. Comportement du modèle ……..225

2.2.1. Ingestion ……225
2.2.2. Transit des minéraux à travers le tractus gastro-intestinal ……..225
2.2.3. Hydrolyse du phosphore phytique …….....227
2.2.4. Absorption du calcium et du phosphore ……..227
2.3. Évaluation externe du modèle ……229
2.3.1. Taux d'hydrolyse du phosphore phytique au niveau iléal ……..229
2.3.2. Digestibilité pré-cæcale du phosphore ……....229
2.3.3. Digestibilité pré-cæcale du calcium ……....231
2.4. Originalités du modèle ……231
3. Conclusion ……232
ANNEXE 1 – Paramètres utilisés pour le modèle ……233
ANNEXE 2 – Équations utilisées pour le modèle ……237
DISCUSSION GÉNÉRALE ……...251
1. Complémentarité des méthodes utilisées pour répondre aux questions de recherche ……253
1.1. Le calcium particulaire pour piloter l'utilisation du calcium ……...253
1.2. Le calcium particulaire pour optimiser l'utilisation du phosphore ……..254
1.2.1. Utilisation de la phytase microbienne ……254
1.2.2. Potentialisation des effets de la phytase microbienne ……255
2. Vers un nouveau système d'estimation des besoins ……256
2.1. La nécessité de mieux caractériser l'aliment ……..256
2.1.1. Diversité des carbonates de calcium ……...256
2.1.2. Le coefficient de digestibilité des minéraux comme indicateur pertinent ? 257
2.2. L'estimation des besoins pour répondre aux différents enjeux de la production ….257
2.2.1. Les besoins doivent être considérés au regard de l'équilibre phosphocalcique ……257
2.2.2. L'estimation des besoins : une approche multicritère ……258
2.3. L'utilisation des minéraux, une dynamique complexe ……259
2.3.1. La fonction de reproduction comme force motrice ……259

2.3.2. Vers une alimentation de précision chez la poule pondeuse ……261
CONCLUSION ……..265
Références Bibliographiques ……..269

Liste des tableaux

Tableau 1 : Synthèse des paramètres des différents segments du tractus gastro-intestinal de la poule pondeuse. 54
Tableau 2 : Activité phytasique des principales matières premières végétales utilisées en nutrition animale. 60
Tableau 3 : Évolution du poids de l'œuf et de ses constituants avec l'âge de la poule..... 84
Tableau 4 : Taux cendres des humérus, fémur et tibia de poules..... 88
Tableau 5 : Descriptives statistics. 117
Tableau 6: Response of *in vitro* and *in vivo* solubility (%) of particulate limestone to limestone particle size (mm). 118
Tableau 7: Response of egg production (%) and egg weight (g) to limestone particle size (mm) and age (week) in laying hens. 118
Tableau 8 : Response of specific gravity, eggshell thickness (mm), and eggshell breaking strength (kg) to calcium particle size (mm) and age (weeks) in laying hens. 119
Tableau 9 : Response of tibia breaking strength (kg) to calcium particle size (mm) and age (weeks) in laying hens. 120
Tableau 10: Summary statistics of the data used in the meta-analysis. 134
Tableau 11 : Response of apparent precaecal P digestibility (%) to microbial phytase (FTU/kg) and dietary NPP level (%) in laying hens..... 134
Tableau 12 : Response of egg production (%) and feed conversion ratio (FCR) to microbial phytase (FTU/kg), dietary non-phytic P level (NPP; %) and age (weeks) in laying hens. 135
Tableau 13 : Response of eggshell proportion (%) to microbial phytase (FTU/kg), dietary NPP level (%) and age (weeks) in laying hens. 135
Tableau 14 : Response of eggshell breaking strength (kg) to microbial phytase (FTU/kg), dietary NPP level (%) and age (weeks) in laying hens. 135
Tableau 15 : Response of tibia ash content (%) to microbial phytase (FTU/kg), dietary NPP level (%), and age of the hen (weeks). 136
Tableau 16 : Ingredients, calculated and analyzed nutrient levels, and phytase activities of experimental diets. 155
Tableau 17 : Proportion of particle size distribution for fine limestone, coarse limestone, and mixed limestone (75 % coarse and 25 % fine). 156
Tableau 18 : Effect of phytase and limestone particle size on average daily feed intake, feed conversion ratio, egg production, egg weight, and egg mass. 157

Tableau 19 : Effect of phytase and limestone particle size on eggshell proportion, eggshell weight, eggshell thickness, and eggshell breaking strength. 158
Tableau 20 : Effect of phytase and limestone particle size on tibia breaking strength, tibia elasticity, tibia ash, and tibia ash weight. 159
Tableau 21 : Effect of phytase and limestone particle size on P and Ca intake, apparent pre-caecal digestibility of P and Ca, and digestible P and Ca of feed. 160
Tableau 22 : Ingredients and nutrient composition of the experimental diets. 176
Tableau 23 : pH of digesta in each segment of gastro-intestinal tract in laying hen fed experimental diets containing different level of microbial phytase and coarse limestone particles. 177
Tableau 24 : Mean retention time (MRT, min) of the solid fraction of digesta along the gastro-intestinal tract in laying hen fed experimental diets containing different level of microbial phytase and coarse limestone particles. 177
Tableau 25 : Intake of Ca and P (g/kg diet on a DM-basis) and recovery of P and Ca (g/kg of DMI) in digesta along the gastro-intestinal tract of laying hens fed experimental diets without or with 300 FTU/kg of phytase (0 or 300) and without or with coarse limestone particles (FL or MIX). 178
Tableau 26 : Apparent digestibility coefficient (AD) of P and Ca of experimental diets containing different level of microbial phytase and different level of incorporation of coarse limestone particles along the small intestine of laying hens. 179
Tableau 27 : Parameter estimates characterizing absorption kinetics of P and Ca in the small intestine of laying hens fed experimental diets containing different level of microbial phytase and different level of incorporation of coarse limestone particles. 180
Tableau 28: Valeurs de pH et de temps moyen de rétention (TMR) du calcium (fin et particulaire) et du phosphore caractérisant les différents segments gastro-intestinaux chez la poule pondeuse. 192
Tableau 29: Résultats de l'analyse de sensibilité du modèle réalisée en phase pré-intestinale. 216
Tableau 30 : Résultats de l'analyse de sensibilité du taux d'hydrolyse du PP au niveau iléal réalisée dans les phases pré-intestinale et intestinale. 218
Tableau 31 : Résultats de l'analyse de sensibilité de la digestibilité pré-cæcale apparente du Ca et du P réalisée dans les phases pré-intestinale et intestinale. 220

Tableau 32 : Comparaison des valeurs de recouvrement du P et du Ca dans le jabot et le gésier observées lors l'expérimentation in vivo réalisée au cours de ce doctorat et prédites par le modèle. 224
Tableau 33: Réponse du taux d'absorption du Ca prédit aux variations de Ca et PNP alimentaires, d'incorporation de phytase microbienne et de carbonate de Ca particulaire. ... 226
Tableau 34: Réponse du taux d'absorption du P prédit aux variations de Ca et PNP alimentaires, d'incorporation de phytase microbienne et de carbonate de Ca particulaire. 226
Tableau 35 : Synthèse des principaux résultats de l'évaluation externe du modèle 230
Tableau 36 : Balance du P estimée pour des poules pondeuses utilisées dans l'expérimentation *in vivo* présentée aux Chapitres 2 et 3. 260

Liste des figures

Figure 1 : Courbe de ponte sélectionneur. 30
Figure 2 : Superposition du cycle de sécrétion de la LH et du cycle d'ovulation. 30
Figure 3 : Dynamique de formation des constituants de l'œuf en fonction de leur situation le long du tractus génital de la poule pondeuse. 32
Figure 4 : Description des différents constituants de l'œuf, et précisions sur les différentes couches constituant la coquille. 34
Figure 5 : Cinétique de la minéralisation de la coquille d'œuf. 36
Figure 6 : Flux quantifiés de Ca chez la poule pondeuse lors d'une journée de calcification de la coquille. 38
Figure 7 : Évolution de la proportion d'os médullaire chez la poule. 40
Figure 8 : L'os médullaire chez la poule pondeuse. 40
Figure 9 : Mobilisation osseuse du Ca et P en fonction du cycle de calcification de la coquille. 42
Figure 10 : Mise en évidence de l'appétit calcique spécifique chez la poule pondeuse. 44
Figure 11 : Appétit calcique spécifique chez une poule éclairée en continu. 44
Figure 12 : Anatomie du tractus gastro-intestinal de la poule pondeuse 50
Figure 13 : Évolution du contenu en Ca du jabot et du gésier au cours de la nuit. 50
Figure 14 : Relation inverse entre le contenu en matière sèche du jabot et le pH du gésier. ... 52
Figure 15 : Solubilisation du carbonate de Ca ($CaCO_3$) en fonction du pH. 56
Figure 16 : Taux de Ca ionisé dans les différents segments intestinaux chez la poule pondeuse. 56
Figure 17 : Acide phytique complexé avec différents cations. 58
Figure 18 : Acide phytique complexé avec des protéines. 58
Figure 19 : Activité relative (%) des phytase en fonction du pH issues de données in vitro... 60
Figure 20 : Efficacité de la phytase en fonction de la taille des particules de Ca in vitro. 66
Figure 21 : Diagramme de phase des différentes formes de phosphate en fonction du pH. 68
Figure 22 : Formation des différents complexes Ca−acide phytique. 70
Figure 23 : Différents acteurs intervenant dans l'absorption active du Ca au travers de l'épithélium intestinal. 70
Figure 24 : La concentration en calbindine−28KD du duodénum est directement corrélée avec le taux d'absorption du Ca. 72

Figure 25 : Acteurs intervenants dans l'absorption active du P au travers de l'épithélium intestinal. 72
Figure 26 : Mise en évidence de l'implication de la voie paracellulaire dans l'absorption du Ca chez la poule pondeuse. 74
Figure 27 : Schéma des jonctions serrées. 76
Figure 28 : Effet de la production d'œuf sur la digestibilité pré-cæcale apparente du Ca chez la poule pondeuse. 78
Figure 29 : Évolution de l'expression de gènes impliqués dans l'absorption du Ca chez la poule pondeuse en fonction du stade de formation de la coquille. 78
Figure 30 : Effet du niveau de Ca alimentaire sur la digestibilité pré-cæcale apparente chez la poule pondeuse. 80
Figure 31 : Cendres osseuses en fonction du PNP, du Ca et de la phytase microbienne chez le poulet de chair. 80
Figure 32 : Évolution du taux de ponte et du poids des œufs entre 1981 et 2007. 84
Figure 33 : Ostéoporose chez la poule pondeuse. 86
Figure 34 : Évolution de l'os médullaire avec l'âge. 86
Figure 35 : Variation de la concentration en 17−β−œstradiol du sérum avec l'âge chez la poule pondeuse. 88
Figure 36 : Absorption de Ca en fonction de l'âge chez 3 souches de poule pondeuse. 90
Figure 37: Prisma diagram describing the data sourcing and the main inclusion criteria used to build the different databases used in the meta-analysis. 120
Figure 38 : Evolution of egg production (%) and egg weight (g) with age in laying hens. ... 121
Figure 39 : Impact of age on tibia breaking strength (kg) in laying hens. 121
Figure 40 : Response of pre-caecal P digestibility to dietary NPP level (%) in laying hens fed different level of microbial phytase (FTU/kg). 136
Figure 41 : Response of egg production to dietary NPP level (%) in laying hens fed different level of microbial phytase (FTU/kg). 137
Figure 42 : Response of feed conversion ratio (FCR) to dietary NPP level (%) in laying hens fed different level of microbial phytase. 137
Figure 43 : Response of eggshell breaking strength (kg) to dietary NPP level (%) in laying hens fed different level of microbial phytase. 138
Figure 44 : Plot of residuals (observed values – predicted values) against predicted values of pre-caecal P digestibility (%). 138

Figure 45 : Plot of residuals (observed values – predicted values) against predicted values of egg production (%) and FCR. 139
Figure 46:Plot of residuals (observed values – predicted values) against predicted values of eggshell proportion (%), eggshell breaking strength and tibia ash. 139
Figure 47 : Relative digestibility kinetics curves of calcium (Ca) and phosphorus (P) in the small intestine of laying hens. 181
Figure 48 : Représentation schématique du modèle compartimental de l'utilisation digestive de Ca et de P chez la poule pondeuse. 186
Figure 49 : Cinétique d'ingestion simulée au cours de la photopériode (g/min). 188
Figure 50 : Cinétique d'ingestion cumulée de Ca apporté sous forme de carbonate particulaire au cours de la photopériode (g/min). 190
Figure 51: Simulation de la variation du pH du gésier au cours de la journée chez la poule pondeuse. 194
Figure 52 : Simulation du temps moyen de rétention du Ca dans le gésier (min) en fonction de la taille des particules de carbonate de Ca (mm). 196
Figure 53: Solubilisation du phosphore phytique (PP) de l'aliment en fonction du pH. Données tirées de Cheryan et al. (1983) 198
Figure 54: Insolubilisation du phosphore phytique (PP) en fonction du pH et du ratio molaire Ca/acide phytique. 198
Figure 55: Efficacité relative des phytases microbienne et végétale en fonction du pH 200
Figure 56: Solubilisation in vitro du carbonate de Ca en fonction du pH. 202
Figure 57: Solubilisation relative du P porté par les phosphates en fonction du pH. 204
Figure 58: Solubilisation des cristaux d'hydroxyapatite en fonction du pH. 206
Figure 59: Courbe d'ingestion alimentaire cumulée observée (ligne pleine) et prédite par le modèle (ligne pointillée). 222
Figure 60 : Cinétique d'ingestion alimentaire de la poule pondeuse à l'échelle de la photopériode observée (courbe pleine) et simulée par le modèle (courbe pointillée). 224
Figure 61 : Hydrolyse du PP par la phytase microbienne. 226
Figure 62 : Résultats de l'évaluation de la capacité de prédiction du modèle. 228
Figure 63 : Méthodologie utilisée pour répondre aux objectifs de la thèse 252
Figure 64 : Flux de Ca soluble (g/min) sortant du gésier vers le duodénum simulé par le modèle digestif. 260
Figure 65 : Flux de Ca absorbé au niveau intestinal (g/min) au regard du besoin en Ca pour la coquille. 262

Liste des abréviations

$1,25-OH_2-D_3$	métabolite actif de la vitamine D_3
ARNm	acide ribonucléique messager
ATP	adenosine tri-phosphate
ATP2b2	ATPase plasma membrane Ca^{2+} transporting
Ca	calcium
Ca^{2+}	calcium soluble
$CaCO_3$	carbonate de calcium
CLDN	claudine
CO_2	dioxyde de carbone
DPC	digestibilité pré-cæcale
DPCA	digestibilité pré-cæcale apparente
ED	erreur liée au bruit de fond
ER	erreur de régression
ETC	erreur centrale
ETR	écart-type résiduel
FCR	feed conversion ratio
Fe^{2+}	fer
FP	fine particule
FSH	hormone folliculo-stimulante
GnRH	gonadotropin releasing hormone
H^+	cation hydrogène
H_2O	eau
$H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-}	isoformes solubles du phosphate

HCl	acide chlorhydrique
IP	inositol phosphate
K^+	potassium
K_M	quantité de substrat pour atteindre 50 % de la V_{max}
LH	hormone lutéinisante
LmPS	limestone particle size
LP	large particule
MS	matière sèche
MSI	matière sèche ingérée
MSPE	erreur quadratique moyenne de prédiction
Na^+	sodium
NRC	National Research Council
ONU	Organisation des Nations Unies
P	phosphore
PDC	phosphate di-calcique
P*dig*	phosphore digestible
P*dispo*	phosphore disponible
P*i*	phosphore inorganique
PMC	phosphate mono-calcique
PMCA	plasma membrane Ca pump
PNP	phosphore non-phytique
PO	post-ovulation
PO_4	phosphate
PP	phosphore phytique

P*ret*	phosphore retenu
P*t*	phosphore total
PTC	phosphate tri-calcique
PTH	parathormone
PV	poids vif
RANK	receptor activator of NF-κB
RANKL	receptor activator of NF-κB ligand
RMSE	round mean squared error
SLC20	solute carrier family 20
SLC34	solute carrier family 34
TGI	tractus gastro-intestinal
Ti	dioxyde de titane
TMP	tarso-métatarse proximal
TMR	temps moyen de rétention
TRPV6	transient receptor potential vanilloid
V_{max}	vitesse maximale
Zn^{2+}	zinc

INRODUCTION

L'œuf représente la source de protéines animales la moins chère et nécessitant le moins d'intrants (Magdelaine, 2011). Dans un contexte de croissance de la population mondiale (10 milliards de personnes en 2050 ; ONU, 2022), l'œuf apparait donc comme une ressource alimentaire clé en termes de sécurité alimentaire. En 2021, la production mondiale d'œufs de consommation s'élevait à 1 500 milliards, dont 30 % étaient produits par la Chine. La France représente le premier producteur d'œufs à l'échelle européenne, avec 15 % de la production (CNPO, 2022). La filière canadienne est en plein essor avec une augmentation de 20 % de sa production depuis 2015 (Statistique Canada, 2023). Afin d'augmenter la production, les sélectionneurs de poules pondeuses travaillent à l'allongement du cycle de production de 80 à 100 semaines d'âge. Cette stratégie est un enjeu de durabilité pour la filière et représente un challenge homéostasique pour l'animal.

La production d'un œuf requiert la mobilisation d'une quantité massive de calcium (Ca) à déposer au niveau de la coquille (Gautron et al., 2021). Afin de répondre à cette demande importante et quotidienne, la poule puise une partie du Ca dans son os médullaire (Nys et Le Roy, 2018). Cette mobilisation osseuse répétée, en lien avec un haut niveau de production induit une dégradation progressive de l'os cortical avoisinant (Whitehead, 2004). Ce phénomène, associé à une détérioration du métabolisme calcique (Gloux et al., 2020), est à l'origine d'une baisse de la qualité du squelette avec l'âge (Toscano et al., 2020). Cela engendre notamment une hausse de l'incidence de l'ostéoporose chez la poule en fin de carrière. Cette période est également marquée par une détérioration de la qualité de la coquille (Cheng et Ning, 2023), *i.e.*, une coquille plus fine et plus fragile, à l'origine de pertes économiques importantes conduisant à la réforme des troupeaux.

De plus, afin d'optimiser les coûts de production, les outils de production se sont regroupés dans certaines zones géographiques. Ce processus est à l'origine de la formation de grands bassins de production. Ainsi, en France, 41 % des effectifs de poules pondeuses sont situés en Bretagne (France Agrimer, 2019), tandis que le Québec concentre 20 % de la production canadienne (Agriculture Canada, 2021). L'augmentation de la densité d'élevage dans ces bassins de production est à l'origine de problèmes environnementaux en lien avec les rejets de phosphore (P) et d'azote. Bien que nécessaires pour les cultures, les rejets des productions animales peuvent s'avérer délétères si leur concentration dépasse la capacité de fixation des sols, engendrant notamment des problèmes d'eutrophisation. Afin de limiter les rejets dans l'environnement, des normes ont été établies en France (CORPEN, 2006) et au Québec (REA, 2021). Le phosphore contenu dans les végétaux étant majoritairement sous

forme phytique, il est peu disponible pour la poule pondeuse. Bien que le besoin en P pour la production de la coquille soit faible, un apport suffisant est nécessaire pour maintenir la consommation, les performances de production et la qualité de la minéralisation osseuse. Ce besoin peut être couvert par un apport minéral, *i.e.*, phosphates, dont le coût demeure élevé et soumis à une grande volatilité. Dans ce contexte, il apparait nécessaire de développer des stratégies d'optimisation de l'utilisation du phosphore. L'utilisation de la phytase microbienne y contribue largement. Néanmoins, les conditions d'utilisation de cette enzyme méritent d'être précisées chez la poule, notamment en relation avec l'apport de Ca.

La détérioration du métabolisme phosphocalcique avec l'âge est une question d'autant plus importante aujourd'hui que la production tend vers un allongement de la carrière des poules pondeuses. À l'heure actuelle, les poules produisent en moyenne 350 œufs sur 408 jours (ITAVI, 2017). Bien que la période de ponte ait augmenté de 9 % au cours des 10 dernières années, l'objectif est d'atteindre une carrière de 560 jours (*i.e.*, 100 semaines d'âge à la réforme) au cours de laquelle la poule pondrait 500 œufs. Cette nouvelle pratique représente un intérêt économique majeur pour la filière, mais constitue un défi physiologique d'envergure pour l'animal. En effet, l'allongement de la période de ponte requiert une connaissance fine des besoins en Ca de la poule pondeuse en fonction de son âge et une meilleure compréhension de l'utilisation digestive du Ca au cours de la journée.

Dans ce métabolisme tout à fait particulier, la nutrition occupe une place majeure. Adapter les apports de Ca et de P à la dynamique de leur utilisation par l'animal permettrait de réduire la mobilisation osseuse, et par conséquent prévenir les troubles osseux liés à l'âge ainsi que de limiter les rejets de P dans l'environnement. Dans ce cadre, l'utilisation digestive de ces éléments, contrôlée par différents processus de solubilisation, insolubilisation, transit et absorption, représente une première étape clé de l'utilisation globale par l'animal.

L'objectif de ce doctorat était donc d'améliorer les connaissances et la compréhension des mécanismes contrôlant l'utilisation digestive de Ca et P chez la poule pondeuse, en vue d'optimiser la qualité du squelette et de la coquille au cours du cycle de production tout en limitant les rejets environnementaux de P. L'intégration des connaissances générées dans un modèle mécaniste permettra de proposer des solutions nutritionnelles pour optimiser la fin de carrière de l'animal. La première partie de ce document constitue une revue de littérature décrivant les processus de production de l'œuf et les principaux mécanismes intervenant dans l'utilisation digestive du Ca et du P. Les objectifs de recherche sont ensuite décrits dans une

partie spécifique introduisant les quatre chapitres relatifs aux résultats de la thèse. Le premier chapitre rapporte les résultats de deux méta-analyses destinées à quantifier les effets du carbonate de Ca particulaire et de la phytase microbienne sur l'utilisation digestive des minéraux. Les deuxième et troisième chapitres décrivent les résultats obtenus à l'issue d'une expérimentation *in vivo* dont l'objectif était d'étudier l'interaction potentielle entre le Ca particulaire et la phytase microbienne. Le quatrième chapitre présente les premières étapes de conception et de validation d'un modèle mécaniste décrivant l'utilisation digestive du Ca et du P chez la poule pondeuse à l'échelle de la journée. Ce manuscrit se termine par une discussion générale qui reprend les apports de la thèse à la question de recherche suivie d'une conclusion.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

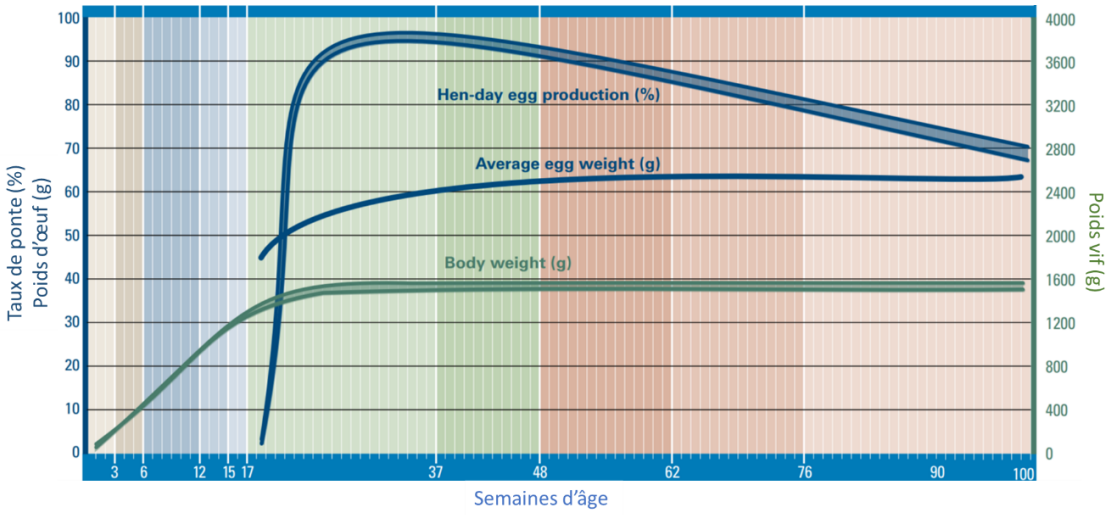


Figure 1 : Courbe de ponte sélectionneur.
Le taux de ponte (courbe bleu clair ; « *Hen-day egg production* ») augmente rapidement entre 18 et 24 semaines d'âge pour atteindre le pic de ponte. Le pic de ponte correspond à la période où la poule présente le meilleur taux de ponte, la durée de ce pic est appelée persistance de ponte. Par la suite le taux de ponte baisse avec l'âge de l'animal. Le poids des œufs augmente rapidement jusqu'à la mise en place du pic de ponte (courbe bleue ; « *Average egg weight* »), puis continu d'augmenter légèrement avec l'âge de la poule. Le poids vif de la poule (courbe verte ; « *Body weight* ») augmente lui aussi rapidement jusqu'au pic de ponte puis se stabilise avec l'âge de la poule.
Tirée de Hy-Line (2020).

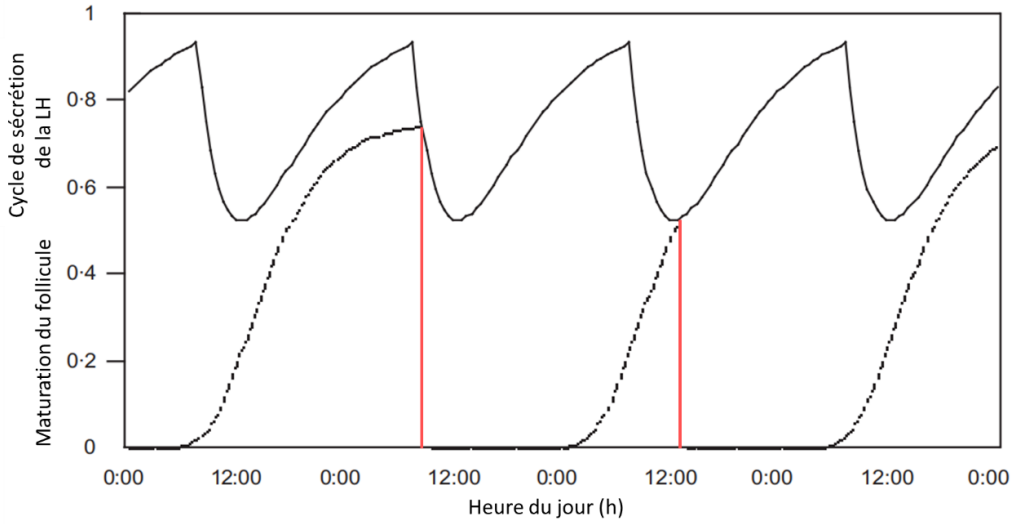


Figure 2 : Superposition du cycle de sécrétion de la LH et du cycle d'ovulation.
Le cycle de sécrétion de la LH est contrôlé en partie par le cycle nycthéméral et dure 24 heures. Le cycle de maturation folliculaire dure plus de 24 heures. C'est le décalage existant entre ces deux cycles qui conduit au jour de pause.
Tirée de Johnston et Gous (2003).

1 La ponte : une histoire de cycles

En moyenne, sur sa carrière de production (qui dure environ 50 semaines), une poule pond entre 300 et 350 œufs. Le processus de ponte et de formation de l'œuf est finement régulé et parfaitement orchestré par l'animal. Ce processus complexe est néanmoins contraint par différents cycles qui déterminent le profil de ponte de la poule.

1.1 Un cycle de ponte et des séries de pontes

La période de production de la poule pondeuse s'étend de 18 à 72 semaines d'âge (Figure 1) et correspond à un cycle de ponte (Sauveur, 1988). Ce cycle se compose de multiples séries de pontes correspondant à une période pendant laquelle la poule pond en continu un œuf par jour et est limitée par un ou plusieurs jours sans ponte (*i.e.*, un jour de pause) (Sauveur, 1996). Chaque jour de la série de ponte, la poule réalise un cycle ovulatoire durant 24 à 26 heures (Etches, 1996), commençant par une ovulation et se terminant par une oviposition (ponte). L'ovulation succède la ponte de l'œuf produit la veille de 15 à 45 minutes (Nys et Guyot, 2011). Chez les poules pondeuses actuelles, sélectionnées pour leurs performances de ponte, la série de ponte peut durer plus de 100 jours (Bécot et al., 2021).

1.2 Cycle folliculaire et cycle photopériodique

La dynamique d'ovulation−oviposition est marquée par la superposition de deux cycles (Nys et Guyot, 2011). Le premier cycle, interne à l'animal, dure plus de 24 heures (Johnston et Gous, 2003) et correspond au cycle de maturation folliculaire, sous contrôle des gonadotrophines, LH et FSH. Le deuxième cycle correspond au cycle de sécrétions des gonadotrophines (notamment la LH) par l'hypophyse antérieure. Environ 10 heures avant l'ovulation, un 1er pic de LH est généré par l'hypophyse antérieure (Sauveur, 1988). La LH vient se fixer à ses récepteurs situés au niveau du follicule mûr qui, en réponse, libère de la progestérone (Nys et Guyot, 2011). Cette dernière agit au niveau de l'hypophyse antérieure pour déclencher le pic pré-ovulatoire de LH environ 5 à 6 heures avant l'ovulation (Etches et al., 1983). Ce cycle de 24 heures dépend du rythme circadien et est induit par l'extinction de la lumière (Sauveur, 1996). Ce deuxième cycle est étroitement lié à la photopériode imposée à l'animal. Le décalage temporel entre ces deux cycles est à l'origine du décalage de l'heure de ponte au sein d'une série de ponte (Figure 2). Ainsi, il existe un jour où le seuil de maturité du follicule n'est pas suffisant pour recevoir le 1er pic de LH : il ne se produit pas d'ovulation. Ce jour correspond à la veille d'un jour de pause. Bien sûr, plus la durée du cycle de maturation folliculaire se rapproche de 24 heures, plus la série de ponte sera longue.

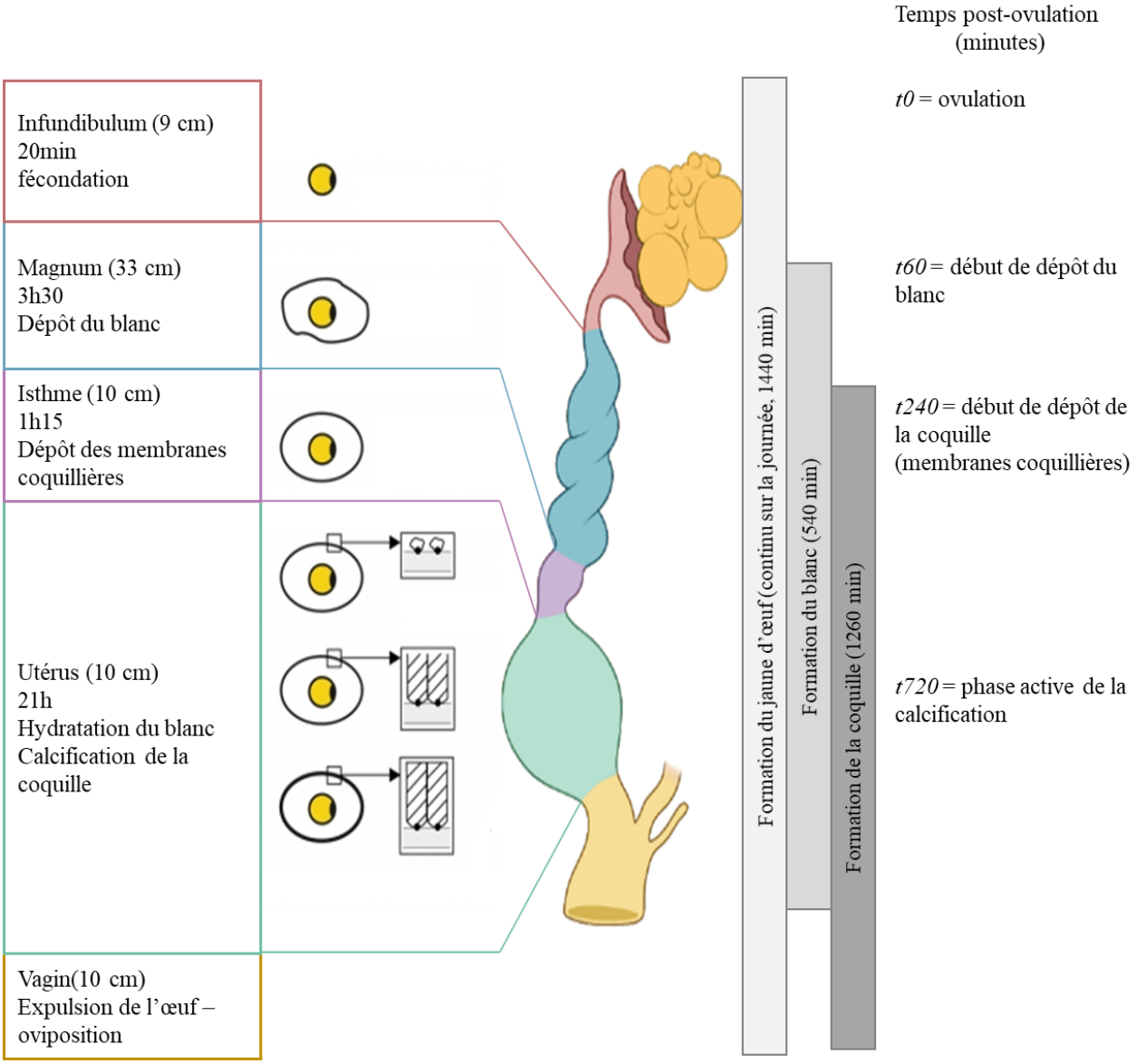


Figure 3 : Dynamique de formation des constituants de l'œuf en fonction de leur situation le long du tractus génital de la poule pondeuse.

1.3 Formation de l'œuf et de ses constituants

1.3.1 Cinétique de formation de l'œuf

Les oiseaux sont ovipares, l'œuf correspond à une structure close assurant la protection du futur embryon et contenant tous les nutriments nécessaires à son développement. S'il n'est pas fécondé, cette structure de 61 g environ correspond à une cellule unique. Suite à l'ovulation, le follicule va voyager au travers de l'oviducte pour s'entourer du blanc puis de la coquille pendant 24 à 26 heures (Figure 3 ; Nys et Guyot, 2011). L'oviducte est un canal de 70 cm de long qui se compose de 5 segments jouant un rôle différent dans la production de l'œuf : l'infundibulum, le magnum, l'isthme (blanc et rouge), l'utérus et le vagin (Sah et Mishra, 2018). Qu'il y ait eu fécondation ou non, la ponte aura lieu, celle-ci dure entre 30 et 45 minutes en moyenne (Icken et al., 2012).

1.3.2 Formation du jaune et du blanc

Le jaune, ou vitellus, représente 30 % de la masse de l'œuf (soit environ 18 g) et renferme la totalité des lipides de l'œuf (Ahmadi et Rahimi, 2011). Il renferme également une importante quantité de protéines et de P (0,57 % ; Kebreab et al., 2009) dont plus de 60 % est contenu dans les phospholipides (Nys et Guyot, 2011). La plupart des constituants du jaune sont synthétisés par le foie. Ainsi, le foie d'une poule synthétise 2,5 g de protéines/jour à destination du jaune, soit trois fois plus que le niveau basal existant chez la poulette (Sauveur, 1988).

La vitellogenèse comprend trois phases (Sauveur, 1988). La phase initiale d'accroissement lent débute durant le développement embryonnaire et dure jusqu'à la maturité sexuelle. Durant la phase de développement embryonnaire, un certain nombre d'ovocytes entrent en première division de méiose, où ils seront bloqués en 1ère métaphase. Ils constituent le pool d'ovocytes, fixé à la naissance, qui sera à l'origine des différentes ovulations au cours de la vie de la poule (environ 12 000 ; Nys et Guyot, 2011). La deuxième phase, ou phase intermédiaire débute à partir de la maturité sexuelle et correspond à l'étape de sélection d'un ovocyte. L'ovocyte sélectionné reprend sa division méiotique suite au pic pré-ovulatoire de LH et se retrouve de nouveau bloqué, en prophase de 2ème division cette fois (il sera débloqué s'il est fécondé par un gamète mâle). Cet ovocyte sera expulsé dans l'oviducte où il s'entourera du blanc et de la coquille. Enfin, la phase de grand accroissement correspond à une phase de forte croissance du jaune de 0,2 à 15 g ayant lieu durant les 8–10 jours précédant l'ovulation. Cet accroissement est majoritairement dû à un dépôt de lipides, lipoprotéines, protéines et minéraux. Durant cette phase, l'ovocyte migre en périphérie du jaune, laissant derrière lui une

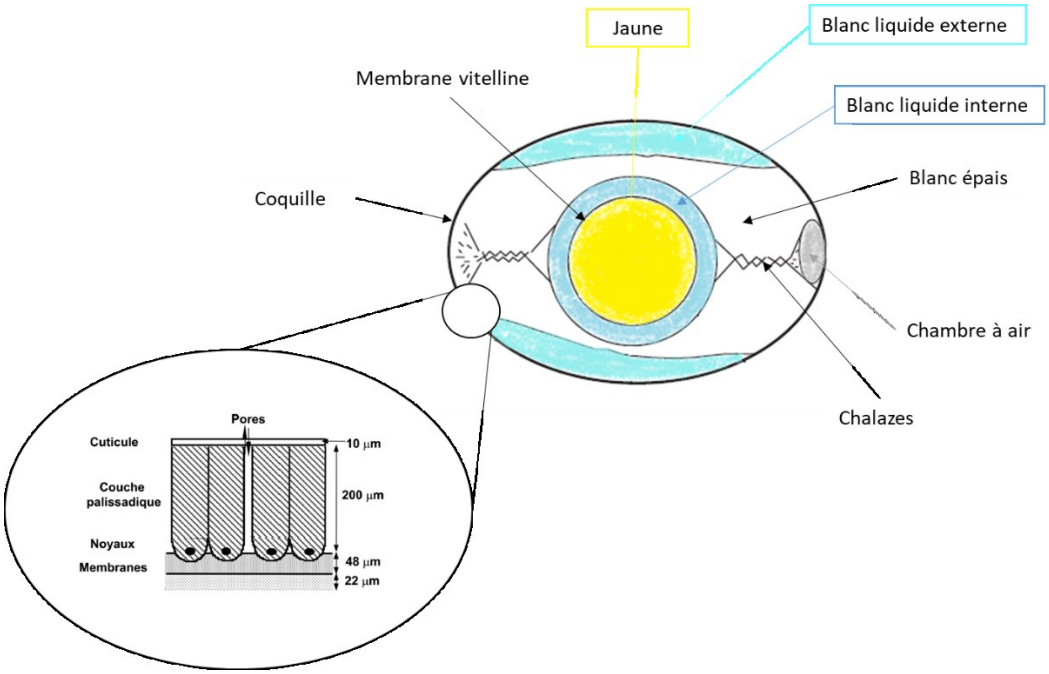


Figure 4 : Description des différents constituants de l'œuf et précisions sur les différentes couches constituant la coquille.
Adaptée de Nys et Guyot (2011).

marque de son passage : le latèbre. Au-dessus du jaune est déposée la membrane vitelline, une structure acellulaire composée de deux couches distinctes séparées par une fine membrane (Dombre et al., 2017). Cette membrane vitelline limite les échanges entre le jaune et l'albumen, facilite la fertilisation et assure une protection antibactérienne de l'embryon (Mann, 2008).

Le blanc d'œuf, ou albumen, représente environ 60 % de la masse de l'œuf (soit 37 g ; Travel et al., 2010) et correspond à une solution aqueuse de protéines, de minéraux et de sucres (Dong et Zhang, 2020). La formation du blanc se déroule au niveau du magnum et dure environ 3 h 30 min. Durant cette période, 4 g de protéines sont déposés sur le jaune. Ces protéines représentent 90 % de la matière sèche (MS) du blanc et 86 % d'entre elles sont des ovalbumines synthétisées et sécrétées par les cellules du magnum (Edwards et al., 1976). La synthèse des protéines du blanc est considérée continue entre deux passages de jaunes. Ces dernières sont en suspension dans 15 g d'eau. Le blanc contient également du glucose en suspension, entre 0,4 et 0,9 %, soit deux fois plus que dans le plasma (Nys et Guyot, 2011). Le blanc joue un rôle important dans la nutrition de l'embryon (Hincke et al., 2011) et dans les défenses immunitaires de l'embryon, certaines protéines portent des fonctions antimicrobiennes (Bedrani et al., 2013).

La formation du blanc se poursuit dans l'utérus lors d'une étape d'hydratation : le plumping (Donoghue et Hairston, 2000). Cette étape s'opère après la formation des membranes coquillières pendant 6 à 7 heures, et se produit en parallèle de la formation de la coquille. Cette hydratation permet de distinguer les différentes parties du blanc : le blanc épais (57 %) et le blanc liquide interne (17 %) et externe (26 %) (Figure 4). Cette hydratation est également responsable des phénomènes de rotations du jaune laissant apparaitre les chalazes, structures situées de part et d'autre du jaune et permettant de maintenir ce dernier en suspension à l'intérieur de la coquille. Le plumping entraine un gain de volume important pour l'œuf, il assure la mise en contact de la membrane coquillière externe avec la muqueuse utérine, ce qui favorise la calcification de la coquille (Gautron et al., 2021).

1.3.3 Formation de la coquille : une situation d'homéorhèse

1.3.3.1 Les étapes de formation de la coquille

La coquille représente 10 % de la masse de l'œuf et se compose à 95 % de matière minérale (Nys et al., 2010). Cette partie minérale est majoritairement constituée de cristaux de calcite, composés de carbonate (58 %) et de Ca (37 %) (Gautron et al., 2021 ; Nys et al., 2010). La coquille assure une protection physique de l'embryon, une protection face aux agressions de

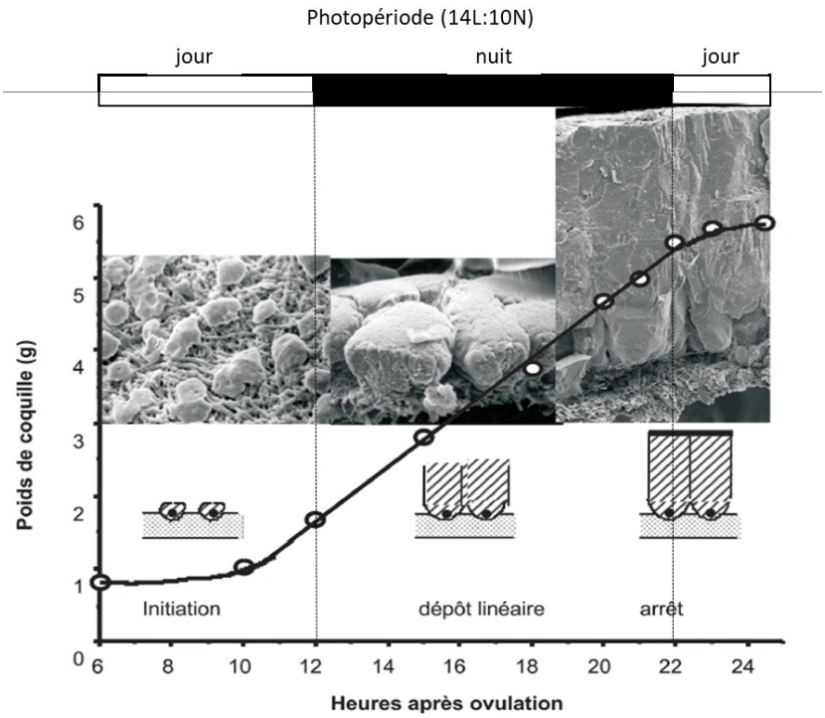


Figure 5 : Cinétique de la minéralisation de la coquille d'œuf.
La minéralisation comprend trois phases successives : la phase d'initiation durant 5 heures, la phase active de dépôt de calcite durant 12 heures et la phase d'arrêt durant 1 heure environ. Adaptée de Nys et al. (2010).

microorganismes et intervient également dans les échanges gazeux grâce à la présence de pores (Nys et Le Roy, 2018). Enfin, elle constitue une réserve de Ca mobilisable pour la minéralisation osseuse de l'embryon (Halgrain et al., 2022).

La formation de la coquille représente la plus longue étape dans le cycle de formation de l'œuf, soit environ 18 heures. La première étape de sa formation consiste en la mise en place des deux membranes coquillières (Hincke et al., 2012). Ces membranes sont constituées de fibres protéiques et de glycoprotéines. Alors que la membrane interne limite la diffusion du blanc, la membrane externe sert de point d'ancrage pour la formation des cristaux de calcite (Gautron et al., 2021). Par la suite, la coquille va subir un processus de minéralisation, ou calcification, correspondant à un dépôt important de cristaux de calcite au niveau des sites de nucléation (Hincke et al., 2012). La minéralisation de la coquille constitue l'un des phénomènes de minéralisation les plus rapides du monde vivant (Nys et al., 2010).

La calcification de la coquille peut être divisée en trois étapes successives (Figure 5) : la phase d'initiation, la phase de dépôt linéaire et la phase d'arrêt (Nys et al., 1999). La phase d'initiation se déroule dans la partie distale de l'isthme (isthme rouge) et correspond au dépôt de petits cristaux de calcite sur des sites de nucléation : les noyaux mamillaires (Moreau et al., 2022). Cette étape débute aux alentours de 4 h 30 post-ovulation (PO) et dure environ 5 heures (Hincke et al., 2012). Elle aboutit à la formation de la première couche calcifiée de la coquille : la couche mamillaire. La phase active de la calcification se déroule dans l'utérus (au niveau de la glande coquillière) pendant environ 12 heures. Durant cette phase, 0,33 g de carbonate de Ca seront déposés chaque heure sur la coquille (Hincke et al., 2011). Cette phase aboutit à la formation de la couche palissadique compacte de 200 µm d'épaisseur (Nys et al., 2010) représentant les 2/3 de la partie minéralisée de la coquille (Gautron et al., 2021). S'en suit la phase d'arrêt qui dure environ 1 h 30 min (Hincke et al., 2011) et se traduit par le dépôt de la cuticule de 10 µm d'épaisseur, une structure composée à plus de 90 % par des protéines et des glycoprotéines (Samiullah et Roberts, 2014). Bien que le détail de la phase d'arrêt ne soit pas encore tout à fait compris, il est possible que les protéines soient à l'origine de l'inhibition de la précipitation du carbonate de Ca (Gautron et al., 1997). De plus, la cuticule est marquée par la présence de P, or il a été montré que la présence de P inhibe la précipitation du carbonate de Ca (Cusack et al., 2002).

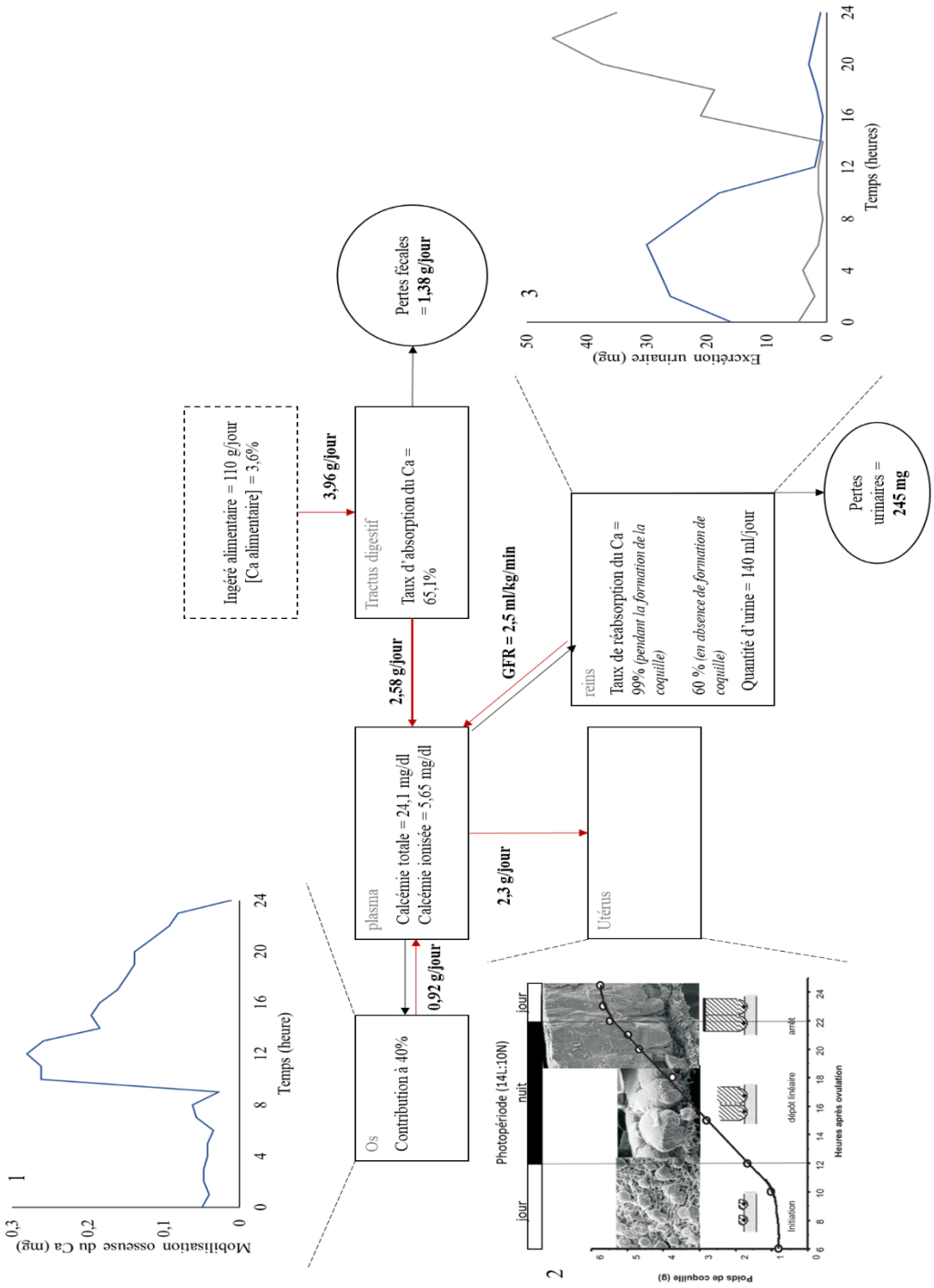


Figure 6 : Flux quantifiés de Ca chez la poule pondeuse lors d'une journée de calcification de la coquille.

Données tirées de Parsons et Combs (1981) pour le Ca plasmatique ; Bar (2009) pour les flux osseux ; Wideman (1987) pour les données des reins ; Manangi et al. (2018) pour les flux urinaires ; Hurwitz et al. (1973) pour les données intestinales ; données d'ingestion basées sur les recommandations du NRC (1994).

Le graphique 1 représente les flux de mobilisation osseuse du Ca au cours de la journée (avec t0 = ponte), données tirées de Etches (1987). Le graphique 2 représente le flux de dépôt de Ca sur la coquille au cours de la journée (t0 = ovulation) tiré de Nys et al. (2010). Le graphique 3 représente les flux d'excrétion urinaire du Ca (bleu) et du P (gris), données tirées de Wideman (1987).

1.3.4 Un export massif de calcium pour les besoins de la coquille

La calcification de la coquille se déroule dans un milieu acellulaire hyper-saturé en substrat favorisant la précipitation instantanée du carbonate de Ca (Gautron et al., 2021). En effet, les concentrations en minéraux sont 60 à 100 fois supérieures à celles nécessaires pour la formation de la calcite. Les concentrations en carbonate et en Ca dans le fluide utérin sont de 100 et 5−10 mmol/l, respectivement (Nys et Gautron, 2007), soit 5 fois plus que dans le plasma pour le Ca. Le Ca nécessaire est majoritairement apporté par l'alimentation à raison de 60 à 75 % (Fleming, 2008 ; Nys, 2017). Du fait des différentes phases de dépôt de calcite sur la coquille, la minéralisation n'est pas constante sur la journée et c'est durant la phase active que la plus grande partie de Ca et de bicarbonates sont requis. Cette phase, s'étalant sur 12 heures, débute environ 10 h PO, ce qui coïncide avec la période de nuit pour les poules. De ce fait, il existe une désynchronisation entre l'apport de Ca alimentaire (disponible durant la phase lumineuse) et le besoin massif en Ca pour la minéralisation de la coquille se déroulant principalement durant la phase sombre (Nys et Le Roy, 2018). En prenant en compte le temps de transit du Ca au travers du tractus digestif, Hurwitz et Bar (1966) considèrent que la lumière intestinale ne contient plus de Ca 4 à 5 heures après l'extinction de la lumière, et que la phase intensive de la calcification se déroule entre 1 et 13 heures après l'extinction de la lumière. Ainsi, pour assurer la calcification de la coquille, la poule puise dans ses réserves osseuses, et plus particulièrement dans son os médullaire (Dacke et al., 1993). Cette mobilisation est médiée par les ostéoclastes, stimulés par la 1,25−OH_2−D_3, et entraine la libération conjointe de Ca et P.

La calcification requiert également des bicarbonates, ceux-ci sont formés dans les cellules glandulaires de la glande coquillière à partir de H_2O et CO_2 sous l'action de l'anhydrase carbonique. Cette enzyme, en produisant HCO_3^-, libère un H^+. Le HCO_3^-, qui sera ensuite converti en CO_3^{2-} libère un deuxième H^+. Ces processus engendrent alors une acidose métabolique (Mongin et Lacassagne, 1966). Celle-ci est compensée par une hyperventilation et une hausse de l'excrétion urinaire des H^+ (Mongin, 1978).

Au cours des 18 heures de formation de la coquille, 10 % des réserves corporelles de Ca de la poule sont exportées vers l'utérus (Figure 6 ; Bar, 2009), soit environ 2,2 g de Ca (et 3,5 g de bicarbonate). Au bout d'une année de production, la poule aura transféré une masse de Ca équivalente à son poids (Etches, 1987). Cette quantité importante de Ca est entièrement apportée par le pool plasmatique qui sera renouvelé 12 fois par heure au cours de la calcification, soit 60 fois à l'échelle de la journée (Nys et Le Roy, 2018). Ce transfert massif de

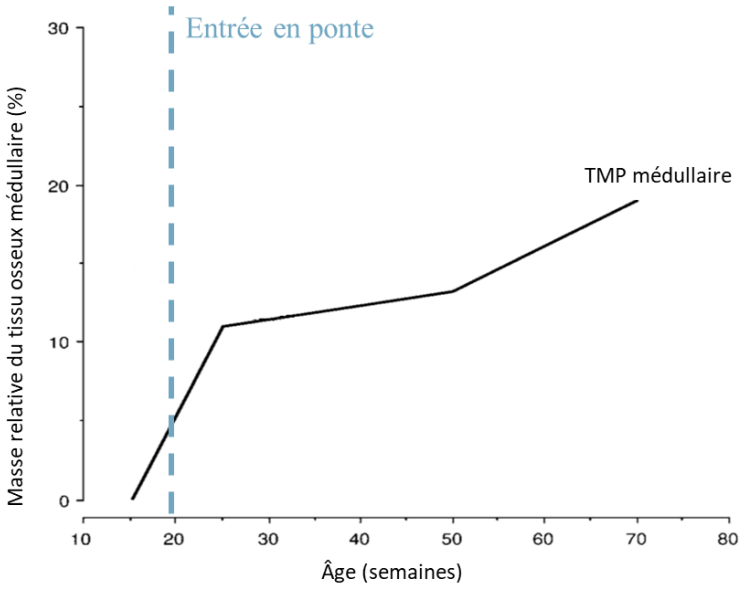


Figure 7 : Évolution de la proportion d'os médullaire chez la poule.
Mise en place de l'os médullaire chez la poulette, peu avant l'entrée en ponte (courbe pointillée), puis au cours de la carrière de ponte. Ici exemple du tarso-métatarse proximal (TMP).
Adaptée de Whitehead et Fleming (2000).

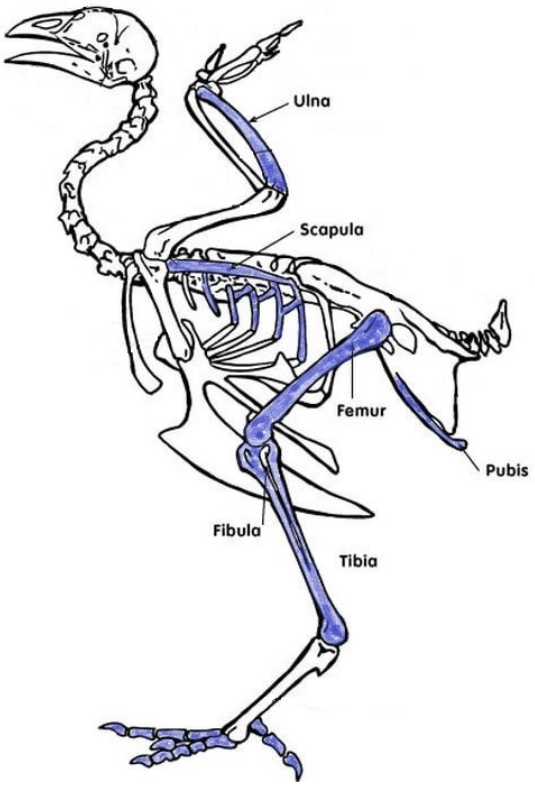


Figure 8 : L'os médullaire chez la poule pondeuse.
En bleu sont représentés les os dont la cavité médullaire se remplie d'os médullaire aux alentours de la maturité sexuelle.

Ca représente un véritable défi à l'homéostasie calcique et nécessite des systèmes de transport du Ca adaptés. La poule pondeuse a mis en place plusieurs adaptations physiologiques face à ce métabolisme tout à fait particulier et présente aujourd'hui les systèmes de transport du Ca les plus efficaces parmi les vertébrés (Bar, 2009).

1.4 Particularité de la poule pondeuse : l'os médullaire

Environ 2 semaines avant l'entrée en ponte, les taux d'œstrogènes et d'androgènes circulants augmentent significativement (Whitehead, 2004). Ces stéroïdes vont engendrer un changement radical du fonctionnement des ostéoblastes. Ces cellules qui produisaient un os cortical lamellaire avant la mise en place de la ponte, vont désormais produire une structure osseuse labile tout à fait particulière : l'os médullaire. Cette structure spécifique aux oiseaux constitue une réserve transitoire de Ca permettant d'assurer la production de la coquille (Dacke et al., 1993). Le développement de cet os est rapide durant les premières semaines de ponte (Figure 7 ; Fleming et al., 1998) et il semblerait que sa production remplace complètement celle de l'os cortical (Hudson et al., 1993).

L'os médullaire concentre environ 12 % du Ca osseux (Nys et Le Roy, 2018) et peut fournir jusqu'à 40 % du Ca nécessaire à la minéralisation de la coquille (le reste étant apporté par l'alimentation) (Nys, 2017). Cet os se met en place principalement dans la cavité médullaire des os longs (tibia, humérus, fémur, *etc.*) (Figure 8) et présente une structure différente à celle de l'os cortical. Dunn et al. (2021) montrent que le taux de matière minérale de l'os cortical (65 %) est plus important que celui de l'os médullaire (35 %). Kerschnitzki et al. (2014) décrivent un niveau de cristallisation de l'os médullaire plus faible que celui de l'os cortical. Enfin, la matrice osseuse de l'os médullaire contient moins de collagène que celle de l'os cortical (Ascenzi et al., 1963). Cette structure moins bien organisée favorise une mobilisation plus rapide du Ca. Ainsi, Dacke et al. (1993) indiquent un turn-over au moins 10 à 15 fois supérieur à celui de l'os cortical. Selon certains auteurs, du fait de sa structure, ce type d'os ne disposerait pas (ou peu) de fonction mécanique (Shipov et al., 2010). Selon d'autres auteurs, l'os médullaire confèrerait une meilleure solidité au squelette (Rodriguez-Navarro et al., 2018).

La mobilisation osseuse est dépendante de la formation de la coquille (Figure 9 ; Kerschnitzki et al., 2014). Ainsi, lors de la phase active de la calcification, la surface active de résorption est multipliée par neuf (van de Velde et al., 1984). Gloux et al. (2020*a*), en étudiant

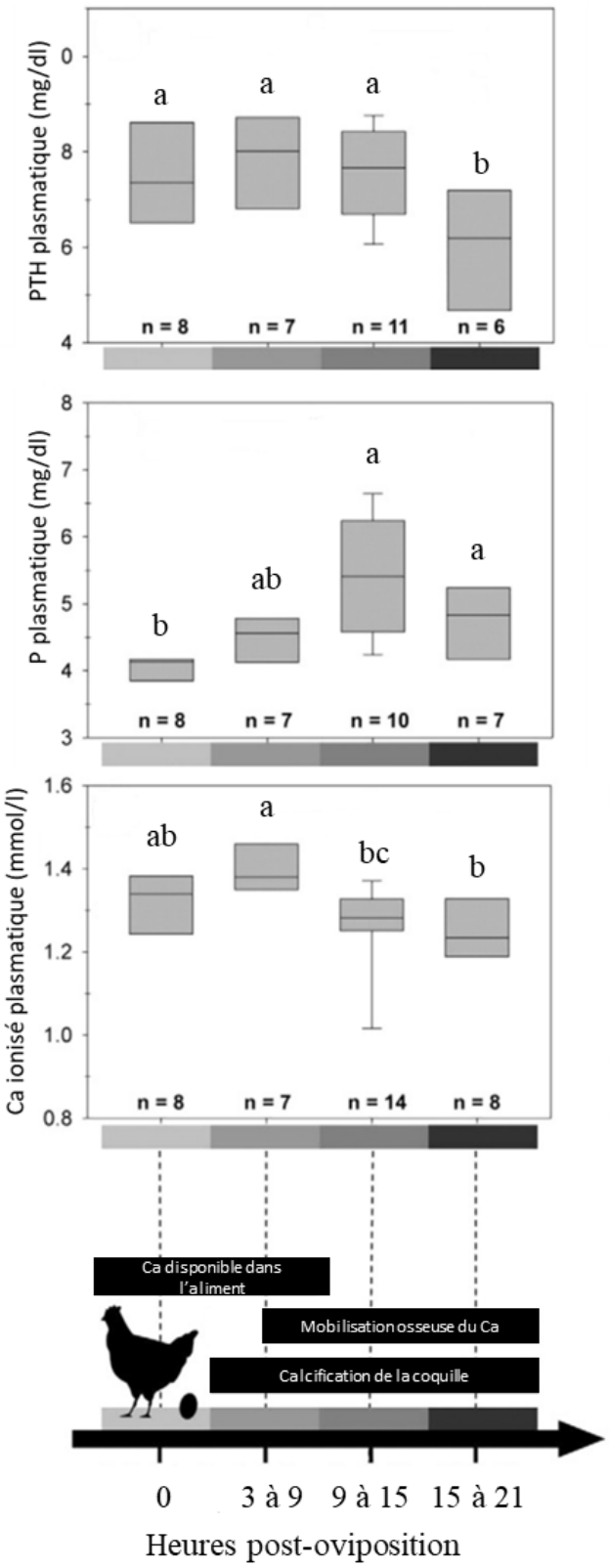


Figure 9 : Mobilisation osseuse du Ca et P en fonction du cycle de calcification de la coquille.
Les hauts niveaux de P*i* plasmatique traduisent la mobilisation osseuse.
Adaptée de Kerschnitzki et al. (2014).

l'expression de gènes chez la poule pondeuse en fonction du stade de calcification, ont montré une surexpression du gène RANK entre 18 et 19 heures PO par rapport aux stades 0−1 et 9−10 heures PO. Le gène RANK des ostéoblastes code pour la protéine RANK qui va activer les ostéoclastes par le biais de son récepteur RANK-L. En considérant que la calcification de la coquille se déroule entre 10 et 22 heures PO, ces observations indiquent que la mobilisation osseuse est induite par le besoin en Ca pour la coquille. Ces résultats coïncident avec les observations de Clunies et al. (1993) qui décrivent la dynamique du Ca dans le tissu osseux. Ces auteurs montrent une mobilisation du Ca de l'os médullaire et de l'os cortical entre 12 et 18 heures PO. Ces mêmes auteurs montrent qu'entre 1 et 6 heures PO le Ca est déposé sur l'os médullaire afin de reconstituer les réserves mobilisées la nuit précédente. Cependant, ils ne montrent pas de dépôt de Ca au niveau de l'os cortical.

Dans l'os, Ca et P sont complexés sous forme de cristaux d'hydroxyapatite : $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Alors, la mobilisation osseuse du Ca s'accompagne d'une hausse de la phosphatémie (Sauveur et Mongin, 1983). Ces mêmes auteurs montrent une relation négative entre le contenu intestinal en Ca soluble et la phosphatémie, traduisant le fait que moins l'apport de Ca intestinal est important, plus la mobilisation osseuse du Ca est forte. Du fait que le P soit peu nécessaire à la calcification de la coquille, il sera éliminé *via* les urines (Manangi et al., 2018).

2 Besoins nutritionnels en calcium et en phosphore de la poule pondeuse

2.1 Le besoin en calcium

Afin de ne pas détériorer les niveaux de production, ni même altérer la qualité de la coquille, il est nécessaire de bien définir le besoin calcique de la poule pondeuse. En début de ponte, la poule est encore en phase de croissance. Le tissu osseux termine son développement aux alentours de 19 semaines d'âge (Kwakkel, 1994), puis lors des premières semaines de ponte, la formation de l'os médullaire prend place (Dacke et al., 1993). De la même façon, le tissu adipeux se développe considérablement entre 16 et 22 semaines d'âge (Kwakkel, 1994). De fait, en début de ponte, l'apport de Ca doit couvrir les besoins pour la production ainsi que les besoins pour la croissance. Durant cette période, l'apport de Ca alimentaire doit couvrir le besoin de croissance des tissus mous et osseux, jusqu'à 22 semaines d'âge environ (0,541 g/jour/poule ; WPSA, 1985), le besoin d'entretien de l'animal (0,055 g/kg de poids vif (PV) ; Kebreab et al., 2009) et celui pour la coquille (2−2,5 g ; Rodriguez-Navarro et al., 2018),

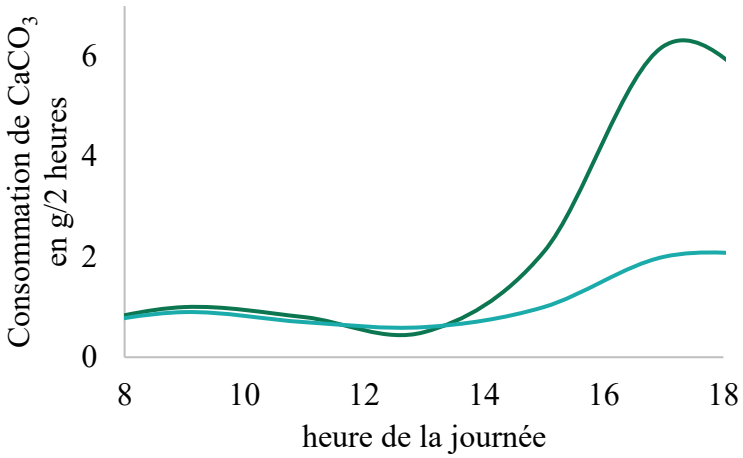


Figure 10 : Mise en évidence de l'appétit calcique spécifique chez la poule pondeuse.
La courbe bleue représente l'ingéré calcique d'une poule ne produisant pas d'œuf et la courbe verte, l'ingéré calcique d'une poule produisant un œuf. Dans cette étude l'extinction de la lumière était à 18 heures.
Données tirées de Mongin et Sauveur (1974).

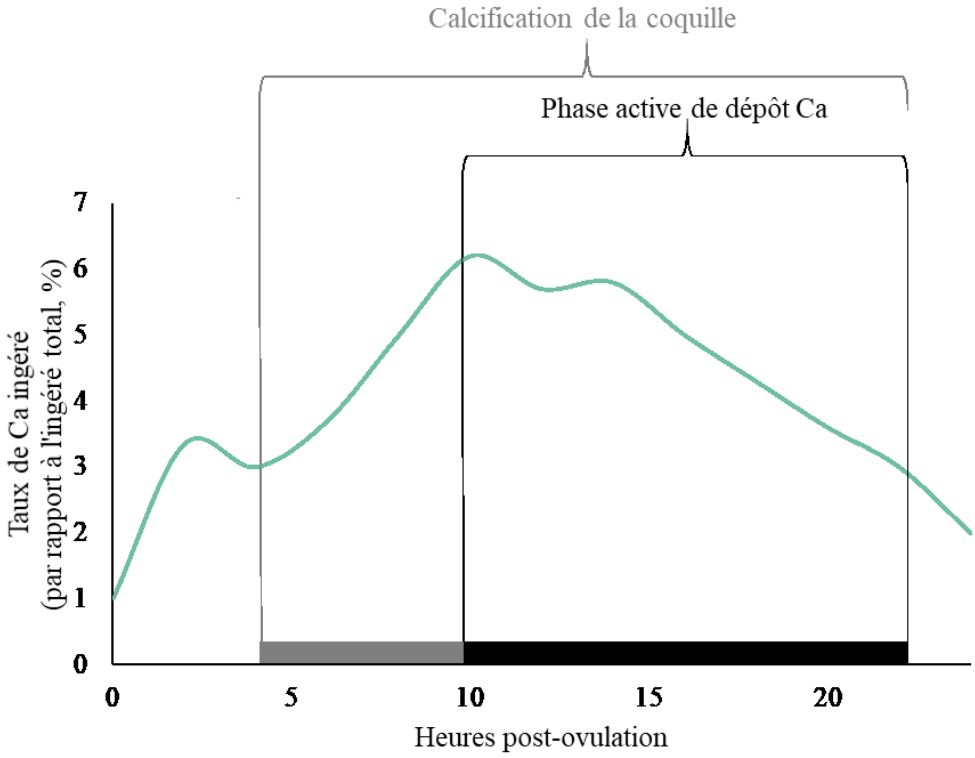


Figure 11 : Appétit calcique spécifique chez une poule éclairée en continu.
Données tirées de Nys et al. (1976).

tout en considérant la capacité propre de l'animal à absorber le Ca. La principale source de Ca alimentaire est le carbonate de Ca, une source de Ca peu coûteuse (Bedford et Rousseau, 2017). Du fait de ce faible coût et de l'importance du besoin en Ca pour la poule pondeuse, ce minéral est souvent formulé en assurant de bonnes marges de sécurité (Walk, 2016). Par exemple, les sélectionneurs recommandent un apport de 3,9 à 4,1 g/jour entre 19 et 64 semaines puis 4,4 à 4,5 g/jour après 65 semaines (Hy-Line, 2020 ; Lohmann, 2019), alors que le NRC (1994) définit le besoin en Ca à 3,25 g/jour. Néanmoins le besoin en Ca au cours du cycle de production et au cours de la journée n'est pas précisément défini.

Selon Pongmanee et al. (2020), un apport de 3,0 % de Ca est suffisant pour maintenir les niveaux de production et la qualité de la coquille entre 25 et 37 semaines d'âge (par rapport à un contrôle à 3,7 %). Néanmoins ce niveau est insuffisant pour maintenir le niveau de minéralisation osseuse des tibias. De leur côté, Rama Rao et al. (2003) montrent que 3,25 % sont suffisant pour maintenir les niveaux de production et la minéralisation osseuse entre 28 et 48 semaines d'âge. Si une carence en Ca peut s'avérer dommageable pour l'animal, l'excès de Ca n'est pas sans conséquence. Par exemple, Akbari Moghaddam Kakhki et al. (2019) ont montré qu'un apport de 4,5 % de Ca entre 72 et 81 semaines baisse la qualité de la coquille sans améliorer les paramètres de minéralisation osseuse par rapport à un apport de 3,5 %. De plus, le Ca affecte négativement la digestibilité du P (Adedokun et Adeola, 2013). Selon Bar et al. (2002), toute hausse du niveau de Ca alimentaire doit s'accompagner d'une hausse de l'incorporation de P dans la ration.

2.1.1 L'appétit calcique spécifique

Peu avant l'entrée en ponte, les poulettes accroissent leur ingéré calcique afin de répondre à leurs besoins en Ca pour le développement de l'os médullaire (Meyer et al., 1970). C'est la mise en place de l'appétit calcique spécifique. Chez la poule, cet appétit permet d'accroitre la prise de Ca alimentaire en fin de période lumineuse, afin d'anticiper la forte demande nocturne pour la calcification de la coquille (Figure 10 ; Wilkinson et al., 2011).

Contrairement aux autres espèces, la poule n'a pas besoin d'être en situation de carence pour exprimer son appétit calcique spécifique (Tordoff, 2001). Les jours où elle produit un œuf, la poule augmente sa consommation d'aliment de 10 à 20 % si le Ca est apporté par l'aliment (Sauveur et Mongin, 1974). Cette hausse d'ingéré correspond effectivement à l'expression d'un appétit calcique spécifique, car si le Ca est apporté de façon séparée de l'aliment, la poule accroît sa consommation de Ca sans pour autant augmenter sa consommation d'aliment (Tyler,

1955). Chez des poules éclairées en permanence, Nys et al. (1976) observent une hausse significative de la consommation de Ca au début de la phase de calcification de la coquille, indiquant le lien entre la formation de la coquille et la mise en place de cet appétit (Figure 11). La régulation de cet appétit n'est pas clairement établie, mais semble néanmoins répondre à différents stimuli. Tout d'abord, l'appétit Ca spécifique est en partie régulé par une composante physiologique, puisqu'une infusion de Ca ou d'hormone parathyroïdienne (PTH) chez la poule abaisse l'expression de cet appétit (Lobaugh et al., 1981). Ces auteurs ne mettent pas en avant d'effet des hormones sexuelles. De plus, Tordoff (2001) indique que cet appétit est inversement proportionnel à la calcémie. L'appétit calcique est partiellement sous contrôle du cycle ovulatoire, car le pic de consommation n'apparait pas chez les poules qui n'ovulent pas (Hughes, 1972). Enfin, la mise en place de cet appétit calcique spécifique nécessite une phase d'apprentissage. En élevage, il semblerait que le principal régulateur de la hausse de l'ingéré en seconde partie de journée chez la poule soit la photopériode (Duncan et Hughes, 1975).

2.2 Le besoin en phosphore

Le besoin en P de la poule pondeuse est faible : il peut être défini comme le besoin pour la croissance des tissus mous et osseux jusqu'à environ 22 semaines d'âge (0,286 g/poule/jour ; WPSA, 1985), le besoin pour l'entretien (0,014 g/kg de PV ; Kebreab et al., 2009) et le P déposé dans l'œuf (0,12 g/jour ; Nys, 2017). Cependant, du fait de la mobilisation osseuse pour la production de la coquille, une autre composante du besoin en P peut être ajoutée : le besoin en P pour reconstituer les réserves osseuses (maximum 0,40 g/jour ; Nys, 2017). Les sélectionneurs recommandent un apport de P total (P*t*, *cf.* partie 2.2.1) entre 0,60 et 0,55 g/jour en fonction de l'âge de l'animal (Lohmann, 2019). En Europe, le P est majoritairement apporté par les phosphates dans l'aliment. Ces minéraux, issus de l'extraction minière représentent une ressource épuisable, avec un pic d'extraction situé aux alentours de 2023 (Neset et Cordell, 2011). De plus, les phosphates constituent le 3ème nutriment le plus cher de la ration (Boling et al., 2000). Ajuster les apports de P aux besoins de l'animal est donc un enjeu économique pour la production. En Amérique, le P provenant des farines animales est très utilisé chez la pondeuse, la situation y est donc différente.

Une carence en P s'accompagne rapidement d'une chute de la production et risque d'altérer la minéralisation osseuse (Keshavarz, 2000). De plus, adapter les apports de P aux besoins de l'animal permettrait de réduire les rejets, limitant l'impact environnemental de la production. Néanmoins, à l'heure actuelle, les besoins en P ne sont pas clairement définis, et les résultats de la littérature sont variables. Cette variabilité des résultats peut être expliquée par

deux arguments : premièrement, il existe plusieurs dénominations du P, parfois interchangées à tort. Deuxièmement, pour évaluer les besoins en P, différents critères peuvent être utilisés : performances de production, qualité de coquille ou encore minéralisation osseuse. En compilant les données de la littérature, Rodehutscord et al. (2023) estiment qu'un apport de 0,22 % de P non-phytique (PNP), tout au long de la carrière (avec un niveau de Ca compris entre 3,5 et 4,0 %) est suffisant pour maintenir les niveaux de production et la minéralisation osseuse.

2.2.1 Les différents systèmes de formulation en phosphore

Les systèmes de formulation en P, *i.e.*, les valeurs de matières premières et la quantification des besoins, sont nombreux et demandent à être précisés (Angel, 2002 ; Applegate et al., 2004). Le P total (P*t*) représente l'ensemble du P de l'aliment, sous toutes ses formes. Dans les végétaux, la majorité du P est lié à une molécule d'inositol pour former l'acide phytique, une forme organique de P végétal : le P phytique (PP), peu disponible pour les monogastriques. Par opposition, le P non-phytique (PNP), obtenu en soustrayant la quantité de PP à celle de P*t*, représentant l'ensemble du P qui n'est pas lié à un inositol (P inorganique). Ces deux formes ne considèrent pas l'utilisation du P alimentaire par l'animal. Ainsi, en considérant l'utilisation du P, il possible de définir trois autres dénominations. Le P digestible (P*dig*) correspond à la différence entre le P*t* et le P retrouvé au niveau iléal. Il représente la quantité de P qui a disparu entre l'aliment et l'iléon et est considéré comme ce qui a été absorbé. Le P retenu (P*ret*) correspond à la différence entre le P*t* et le P retrouvé dans les excreta. Chez la volaille, du fait que les urines et les fèces soient excrétées et mélangées au niveau du cloaque, le P*ret* décrit la quantité de P retenue par l'animal après utilisation digestive et métabolique. Enfin, le P disponible d'un ingrédient (P*dispo*) est obtenu en comparant l'ingrédient à l'étude avec une source de référence à laquelle est attribuée une disponibilité de 100 % basé sur un critère d'évaluation de la réponse au P. La valeur du P*dispo* dépend de la source de référence considérée (souvent du P monocalcique ; Sauvant et al., 2004) et du critère de réponse sélectionné (souvent la minéralisation osseuse). Dans la littérature, les termes P*dig*, P*dispo* et PNP sont souvent confondus (Angel, 2002).

Le fait que les oiseaux possèdent un cloaque implique que les fèces et les urines soient rejetées ensemble. Cette notion implique de distinguer la digestibilité pré-cæcale (DPC) et la rétention. La DPC représente la différence de concentration d'un nutriment entre l'aliment et le contenu digestif au niveau pré-cæcal par rapport à un marqueur indigestible. La rétention, parfois appelée à tort digestibilité totale, désigne la différence de concentration d'un nutriment entre l'aliment et les fientes par rapport à un marqueur indigestible.

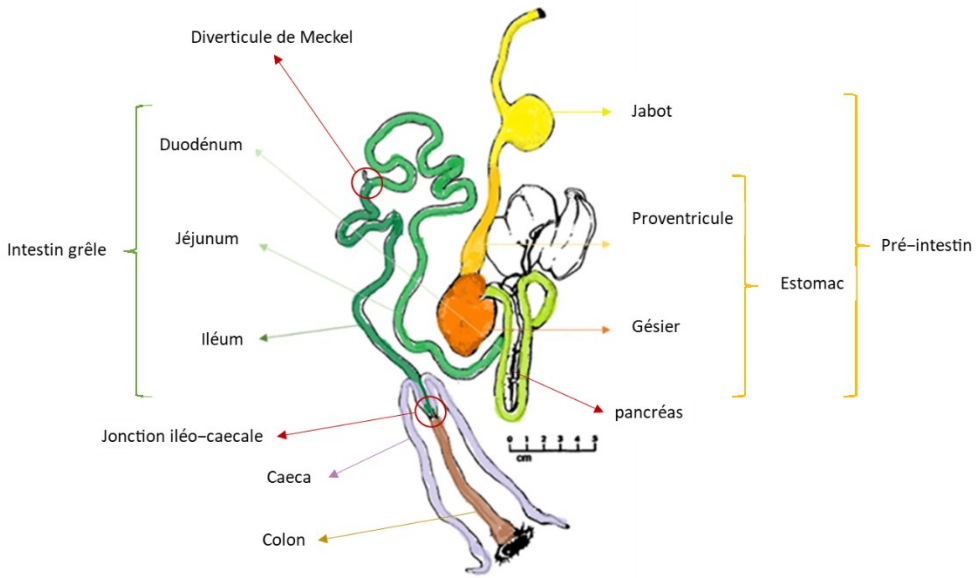


Figure 12 : Anatomie du tractus gastro-intestinal de la poule pondeuse.
En jaune orangé sont représentés les différents segments du pré−intestin avec le jabot et l'estomac (divisé en proventricule et en gésier). En vert, sont représentés les différents segments de l'intestin grêle : l'anse duodénale autour du pancréas, le jéjunum faisant suite au duodénum, jusqu'au diverticule de Meckel, et l'iléon du diverticule de Meckel jusqu'à la jonction iléo−cæcale. Suite à l'intestin grêle, se trouve le colon et les deux cæca.
Adaptée de Denbow (2015).

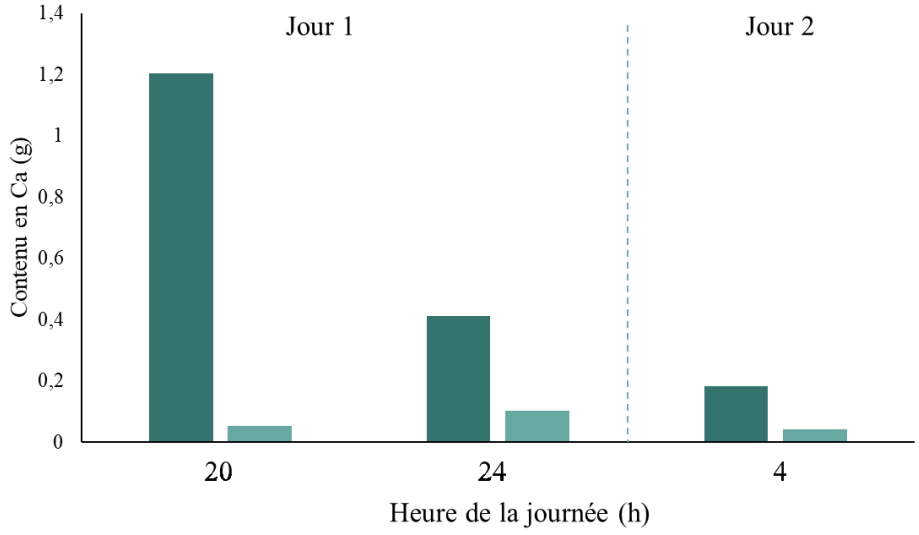


Figure 13 : Évolution du contenu en Ca du jabot et du gésier au cours de la nuit.
Les histogrammes vert foncé représentent la quantité de Ca du jabot. Les histogrammes vert clair représentent la quantité de Ca du gésier.
Données tirées de Roland et Harms (1973).

3 Utilisation digestive du calcium et du phosphore

3.1 Compartiments intervenant dans l'utilisation digestive du calcium et du phosphore

Le tractus gastro intestinal de la poule est composé du jabot, du proventricule, du gésier, de l'intestin grêle, des cæca et du colon (Figure 12). Les minéraux étant considérés comme indigestibles dans les cæca et le colon (Breves et Schröder, 1991 ; Hurwitz et Bar, 1965), ces derniers ne seront pas présentés ici.

3.1.1 Le jabot

Le jabot représente un diverticule de la paroi de l'œsophage (Hodges, 1974) et joue un rôle de stockage de l'aliment (Classen et al., 2016). Suite à l'expression de l'appétit calcique spécifique, le jabot se remplit avant l'extinction de la lumière et se vide progressivement au cours de la nuit (Figure 13 ; Roland et al., 1972). Suite à cette alimentation tardive, Scanes et al. (1987) indiquent que le jabot contient 1 g de Ca au début de la nuit et seulement 0,1 g au matin. L'utilisation du Ca en provenance du jabot se fait surtout durant les premières heures de la nuit (Guinotte, 1992). Le temps moyen de rétention (TMR) de l'aliment dans le jabot est situé aux alentours de 50 minutes (Shires et al., 1987 ; van der Klis et al., 1990), mais augmente néanmoins en fin de soirée/début de nuit. La méthode de calcul du TMR repose sur l'utilisation de marqueur indigestible (*e.g.*, dioxyde de titane trioxyde de chrome, célite, *etc.*). En faisant le ratio entre la quantité de marqueur indigestible dans le segment d'intérêt et la quantité de marqueur indigestible ingéré, il est possible de calculer le TMR du digesta (eq. 1).

$$Temps\ moyen\ de\ rétention\ (min) = temps\ \times \frac{[marqueur]_{segment}}{[marqueur]_{ingéré}} \qquad 1$$

Longtemps considéré comme un simple organe de stockage, le jabot est maintenant reconnu comme un site de fermentation bactérienne (Classen et al., 2016). Cette fermentation, réalisée par des *lactobacillus* (Hilmi et al., 2007), induit une variation du pH au cours de la journée entre 4,8 et 6,0 (Mongin, 1976). Ainsi, le soir, lorsque que le contenu du jabot est à son maximum, le pH est à son plus bas niveau. Néanmoins, les variations du pH du jabot étant faibles à l'échelle de la journée, le pH de cet organe est souvent considéré constant.

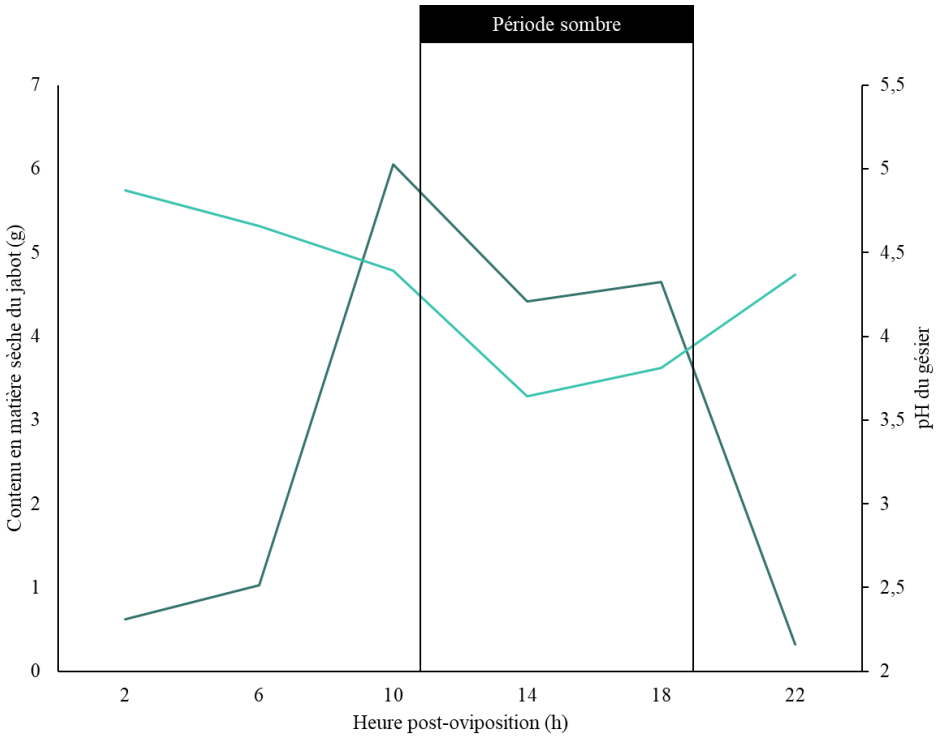


Figure 14 : Relation inverse entre le contenu en matière sèche du jabot et le pH du gésier.
La courbe vert foncé représente le contenu en matière sèche du jabot. La courbe vert clair représente le pH du gésier.
Adaptée de Mongin (1976).

3.1.2 L'estomac

L'estomac des oiseaux est divisé en deux chambres : le proventricule, assurant les fonctions glandulaires et le gésier, assurant les fonctions musculaires (Denbow, 2015). Le proventricule assure la sécrétion des sucs gastriques créant un milieu acide essentiel à la dissolution des nutriments dans le gésier. Les sécrétions acides du proventricule sont dix fois plus importantes chez le poulet que chez l'humain (Guinotte, 1992). Le débit basal de sécrétion des H^+ est de 0,70 mEq/h/kg de PV et le débit maximal atteint 3,24 mEq/h/kg de PV (Burhol et Hirchowitz, 1972). Cette première chambre n'a aucun rôle de stockage, l'aliment passe rapidement du jabot au gésier (Svihus, 2011).

Le gésier, à l'aide de sa paroi musculaire puissante, va broyer l'aliment, remplaçant ainsi la fonction de la mâchoire des mammifères. L'activité motrice du gésier permet également de mélanger le bol alimentaire avec les sucs gastriques. Le TMR de l'aliment dans le gésier est situé aux alentours de 70 minutes et se trouve très fortement influencé par la taille des particules de l'aliment (Hetland et al., 2003 ; *cf.* partie 3.2.4). Du fait des sécrétions acides du proventricule, le gésier présente un pH acide inférieur à 3,0 (Lee et al., 2021). La variation du débit de sécrétion des H^+ induit une variation du pH du gésier entre 1,5 et 3,0 au cours de la journée chez la poule (Guinotte et al., 1995). Les sécrétions gastriques augmentent en fin de journée et au cours de la nuit (Figure 14). Ceci, en raison de l'ingestion importante d'aliment peu avant l'extinction de la lumière, induit la dilatation des parois du jabot entrainant l'activation de mécanorécepteurs qui vont stimuler l'activité de la pompe H^+/K^+-ATPase au niveau du proventricule (Nys, 1990 ; Guinotte, 1992). Cette action mécanique permet de générer un environnement adéquat à la solubilisation du Ca dans le gésier. Bien que ce cycle soit plus marqué chez les poules, il est également présent chez les poulettes (Nys et Cabrera-Saadoun, 1986). Ce cycle semble plus lié au rythme d'ingestion de l'animal, induit par la photopériode, qu'au cycle de formation de la coquille. L'âge de la poule ne semble pas avoir d'effet sur le volume de sécrétions gastriques, si ce n'est une hausse de la concentration en ion H^+ lors de la maturité sexuelle (Nys et Cabrera-Saadoun, 1986).

Outre les variations de pH dues à l'activation de mécanorécepteurs, l'arrivée du bol alimentaire dans le gésier induit une hausse de pH aux alentours de 5,0 (Lee et al., 2017). Ceci est dû au pouvoir tampon de l'aliment, aux alentours de 550 mEq/kg chez la poule pondeuse (Gomez et Corniaux, 2009). Le fort pouvoir tampon de l'aliment est en partie dû au carbonate de Ca. Chez le poulet de chair, des études indiquent qu'une hausse croissante de la concentration en Ca alimentaire (de 0,4 à 1,0 %) induit une hausse du pH du gésier de 2,6 à 3,2 (Amerah et

Tableau 1 : Synthèse des paramètres des différents segments du tractus gastro-intestinal de la poule pondeuse.[1]

Segment	pH	TMR (min)[2]
Jabot	5,8	50
Gésier	3,0	70
Duodénum	6,0	7
Jéjunum	6,5	80
Iléon	7,5	90

[1]Valeurs moyennes pour le pH (Gordon et Roland, 1982 ; Moran, 1982) et le TMR (Shires et al., 1987 ; van der Klis et al., 1990).
[2]TMR, Temps Moyen de Rétention (*cf*. eq. 1).

al., 2014). Chez la poule, malgré le fait que le Ca est 20 fois plus concentré dans le gésier par rapport au poulet de chair (David et al., 2021), le pH est aux alentours de 3,0, ce qui montre une meilleure capacité de la poule à sécréter des sucs gastriques.

3.1.3 L'intestin

L'intestin représente l'unique voie d'entrée dans l'organisme pour le Ca et le P et peut être divisé en trois parties (Figure 12 ; Denbow, 2015). Le duodénum, de la sortie du gésier (pylore) à la fin de l'anse duodénale, est intimement lié au pancréas. Dans ce segment, l'aliment passe très rapidement, le TMR est environ de 7 minutes (Tableau 1 ; Shires et al., 1987 ; van der Klis et al., 1990). Le pH acide déversé par le gésier est en partie neutralisé par les sécrétions biliaires et est situé aux alentours de 6,0 (Wijayanti et al., 2019). Étant lié au pancréas, c'est dans ce segment que sont déversés les sucs pancréatiques, riches en enzymes digestives, ainsi que les sécrétions biliaires. Ces sécrétions déversées dans la lumière intestinale sont les principales sources de pertes endogènes en P et Ca. Ces pertes endogènes ne seraient pas fonction de la composition de la ration mais dépendraient du niveau de matière sèche ingérée (MSI). Une autre partie des pertes endogènes est constituée par le flux urinaire de Ca et P déversé au niveau distal du gros intestin. Ces pertes urinaires sont en lien avec le métabolisme de l'animal et dépendent cette fois de la composition de la ration : un excès de Ca ou P dans la ration se traduit par une hausse de l'excrétion urinaire. Chez la volaille, du fait que les urines et les fèces soient excrétées ensemble, il est plus difficile de distinguer les pertes endogènes intestinales des pertes endogènes urinaires, mis à part en prélevant au niveau de l'iléon terminal. Chez la poule pondeuse, les données concernant les pertes endogènes en P et Ca sont rares. Pour le P, les pertes endogènes totales sont estimées à 344 mg/kg de MSI (Verardi et al., 2019) chez des poules de 32 semaines d'âge recevant un aliment semi-purifié à base de tourteau de colza. Pour le Ca, les pertes endogènes totales ont été estimées à 790 mg/kg de MSI à partir d'un aliment à base de maïs, ne contenant ni Ca ni P chez des poules de 40 semaines d'âge (Diana et al., 2021).

Le jéjunum correspond au segment débutant à la fin de l'anse duodénale et se terminant au niveau du diverticule de Meckel. Le diverticule de Meckel est un reliquat du canal vitellin reliant le sac vitellin à la lumière jéjunale lors de l'embryogénèse (Udoumoh et al., 2019). L'aliment transite lentement dans ce segment d'environ 60 cm (Mongin, 1976), le TMR étant d'environ 80 minutes (Shires et al., 1987 ; van der Klis et al., 1990). Enfin, l'iléon s'étend du diverticule de Meckel jusqu'au colon, marqué par la jonction des cca avec le tube digestif (jonction iléo-cæcale). Ce segment d'une soixantaine de centimètres (Mongin, 1976) présente

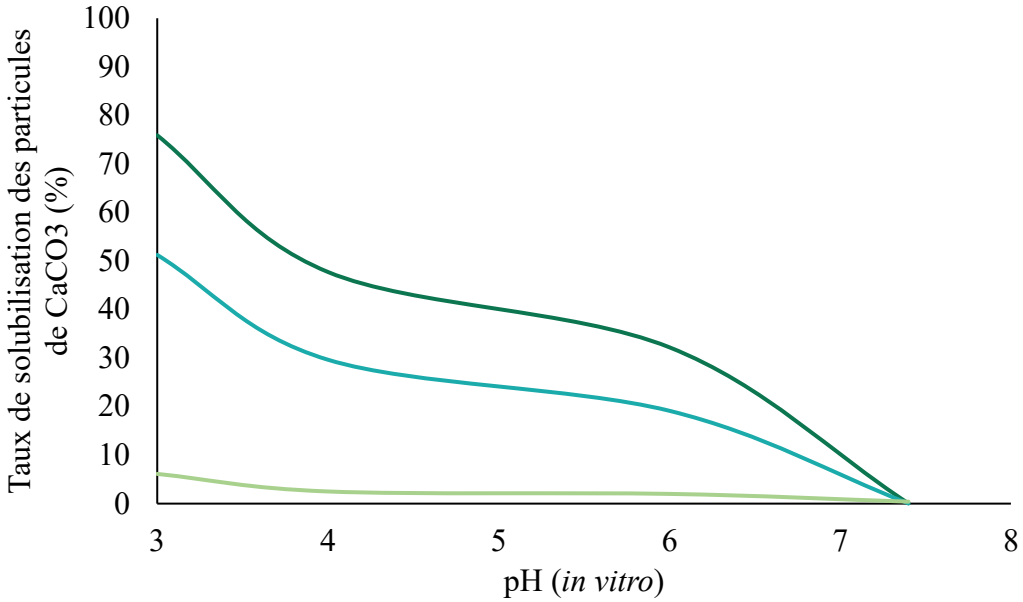


Figure 15 : Solubilisation du carbonate de Ca ($CaCO_3$) en fonction du pH.
La courbe vert foncé représente un temps d'incubation de 120 minutes. La courbe bleue représente un temps d'incubation de 60 minutes. Et la courbe vert clair représente un temps d'incubation de 20 minutes.
Données tirées de Bo-Linn et al. (1984).

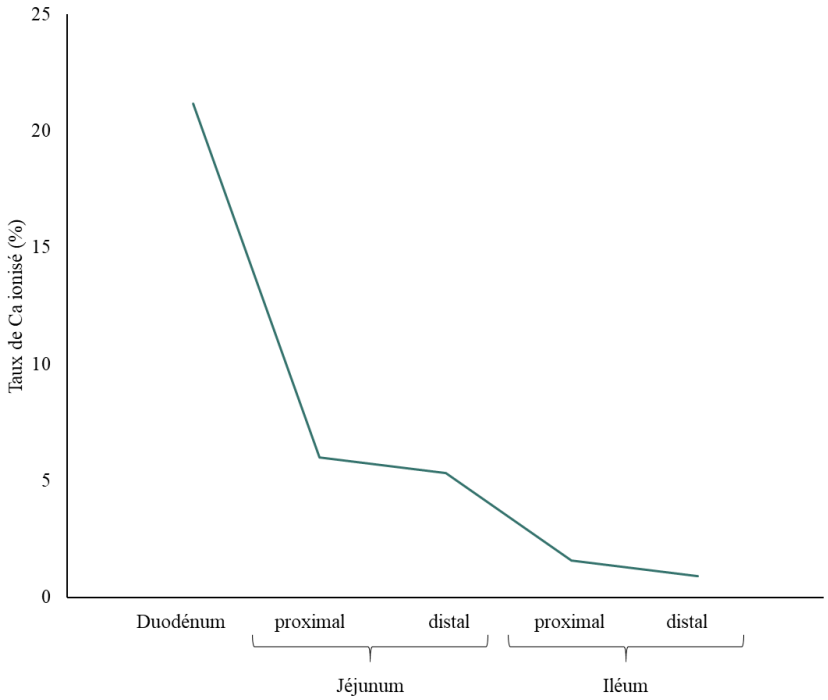


Figure 16 : Taux de Ca ionisé dans les différents segments intestinaux chez la poule pondeuse.
Adaptée de Hurwitz et Bar (1968).

un TMR d'environ 90 minutes (Shires et al., 1987 ; van der Klis et al., 1990). Le pH augmente progressivement en s'éloignant du pylore : 6,5 et 7,5 dans le jéjunum et l'iléon, respectivement (Wijayanti et al., 2019). Contrairement aux mammifères où il existe une nette différence histologique entre le jéjunum et l'iléon, cette différence n'existe pas chez la volaille. Ces termes permettent de distinguer les deux parties de part et d'autre du diverticule de Meckel (Dibner et Richards, 2004). Néanmoins, la hauteur des villosités intestinales baisse en s'éloignant du pylore (de Verdal et al., 2010), indiquant une plus faible capacité de l'intestin distal à absorber les nutriments.

3.2 Mécanismes de solubilisation et d'hydrolyse du calcium et du phosphore

3.2.1 Solubilisation des minéraux

Dans l'aliment, Ca et P sont majoritairement présents sous forme de sels insolubles (Hurwitz, 1996). Avant d'être absorbés au niveau de l'intestin grêle, ils doivent être solubilisés. Cette solubilisation dépend principalement du pH (Figure 15 ; Bo-Linn et al., 1984 ; Chow, 2001). Chez la poule, environ 90 % du Ca est solubilisé dans l'environnement acide du gésier, et plus de 60 % du P d'après des études réalisées chez le poussin (Hurwitz et Bar, 1971). Guinotte et al. (1995) montrent qu'une inhibition des sécrétions acides d'HCl par le proventricule, suite à l'injection d'oméprazole, entraine une hausse du pH gastrique de 2,4 à 6,2. L'oméprazole est un inhibiteur de la pompe H^+/K^+−ATPase, responsable des sécrétions acides dans l'estomac. Cette hausse de pH est associée à une baisse du taux de Ca solubilisé dans le duodénum de 80 %. Bien que le pH acide soit essentiel à la solubilisation des minéraux, Bo-Linn et al. (1984) précisent qu'à pH égal, la solubilisation du carbonate de Ca augmente avec la durée de contact avec le milieu acide.

En sortie de gésier, le taux de Ca soluble baisse avec l'augmentation du pH dans les différents segments intestinaux. Le milieu alcalin de l'intestin distal facilite la précipitation du Ca avec les phosphates, formant *de novo* des complexes insolubles (Selle et al., 2009). Ainsi, Hurwitz et Bar (1968) montrent que 21 % du Ca est sous forme ionisée dans le duodénum (où le pH est égal à 6,4), alors que moins de 1 % du Ca est sous forme ionisée dans l'iléon distal (où le pH est égal à 7,5) (Figure 16).

3.2.2 Formation de complexes entre calcium et phosphore

Dans les céréales, l'acide phytique, ou acide myo-inositol hexaphosphorique, représente une structure complexe assurant le stockage du P pour la graine (Lott et al., 2000). L'acide phytique est constitué d'un inositol estérifiant entre 1 et 6 P inorganiques (P*i*), formant les IP1,

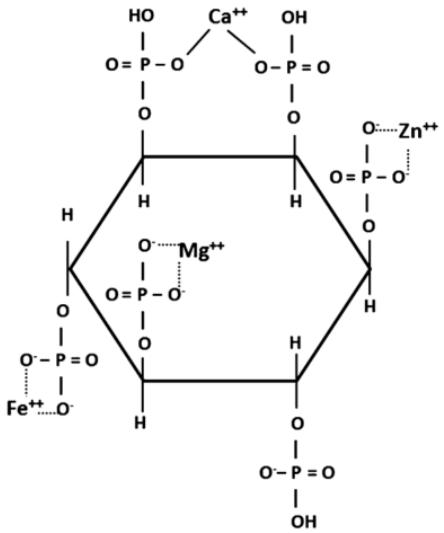


Figure 17 : Acide phytique complexé avec différents cations.
Tirée de Humer et al. (2015).

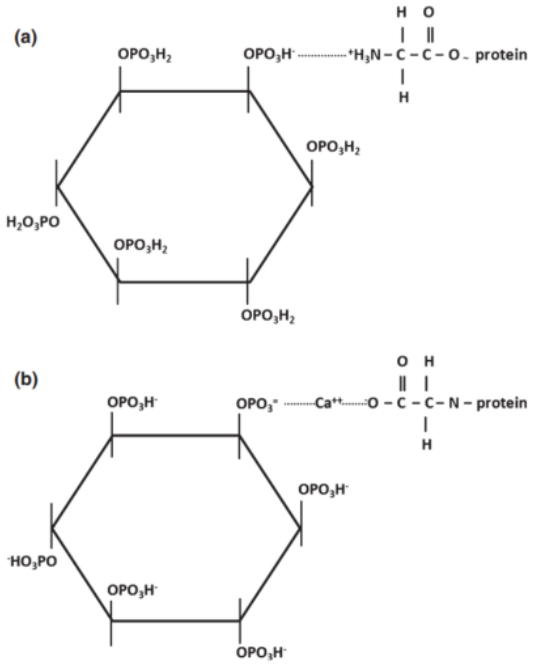


Figure 18 : Acide phytique complexé avec des protéines.
Complexes binaires acide phytique/protéine (a) et complexes tertiaires où un cation sert de pont entre l'acide phytique et la protéine (b).
Tirée de Humer et al. (2015).

IP2, IP3, IP4, IP5 ou IP6. De fait, cette structure renferme entre 12 et 28 % de P (Angel et al., 2002). La très grande majorité de l'acide phytique des matières premières est sous forme IP6 (Lott et al., 2000). Dans les végétaux, la proportion de PP par rapport au P total est de 65 % en moyenne (INRA-CIRAD-AFZ, 2017) et constitue une forme peu disponible pour l'animal. Des études semblent indiquer que l'acide phytique pourrait être absorbé au niveau intestinal (Humer et al., 2015).

L'acide phytique peut se complexer avec des cations divalents ou des protéines pour former des sels d'acide phytique appelés phytates (Figure 17 ; Angel et al., 2002), rendant indisponibles les cations (ou protéines) et le PP pour l'animal. La liaison de l'acide phytique avec des cations divalents est fortement dépendante du pH (Nolan et Duffin, 1987). Par exemple, le Ca ne se complexe que si le pH est ≥ 5,0. L'acide phytique présente une affinité différente en fonction du cation considéré : $Zn^{2+} > Cu^{2+} > Mn^{2+} > Fe^{2+} > Ca^{2+}$ (Pointillart, 1994). Néanmoins, la formation de ces complexes dépend en grande partie des ratios cations−acide phytique (Grynspan et Cheryan, 1983). Ainsi, bien que l'acide phytique présente une faible affinité pour le Ca, relativement à d'autres cations, la forte concentration de ce dernier dans les rations pondeuses (Ca−acide phytique ≈ 30) facilite la formation de complexes Ca−acide phytique. Enfin, Humer et al. (2015), précisent que la capacité de l'acide phytique à se complexer avec des cations diminue si son degré d'estérification du P diminue, *i.e.,* le nombre de P*i* liés à l'inositol diminue. Dans l'aliment, l'acide phytique est majoritairement complexé avec le magnésium (Selle et Ravindran, 2007). De plus, Kornegay et al. (1996) considèrent que l'intégralité du Ca végétal est lié à l'acide phytique.

L'acide phytique peut également se complexer avec certains acides aminés, dépendamment du pH (Figure 18 ; Humer et al., 2015). Si le pH est inférieur au point isoélectrique de la protéine (pH acide), il peut se former des complexes binaires entre l'acide phytique et un acide aminé basique. Si le pH excède le point isoélectrique de la protéine (pH alcalin), l'acide phytique peut former des complexes tertiaires avec un cation divalent et une protéine (Selle et al., 2012). Ces derniers se forment *de novo* au niveau des segments intestinaux limitant ainsi l'absorption des nutriments.

3.2.3 L'importance des phytases chez la poule pondeuse

Les phytases sont des enzymes capables d'hydrolyser l'acide phytique et de libérer le PP, améliorant la biodisponibilité du P d'origine végétale. Différentes phytases sont décrites, parmi lesquelles sont retrouvées les 3−phytases commençant l'hydrolyse en position 3 et les

Tableau 2 : Activité phytasique des principales matières premières végétales utilisées en nutrition animale.

Matière première	Activité phytasique (FTU/kg)[1]
Avoine	40
Blé	460
Maïs	20
Orge	540
Seigle	5 350
Triticale	770
Tourteau de colza	10
Tourteau de soja	20
Tourteau de tournesol	0

[1]Données tirées de Pointillart (1994).

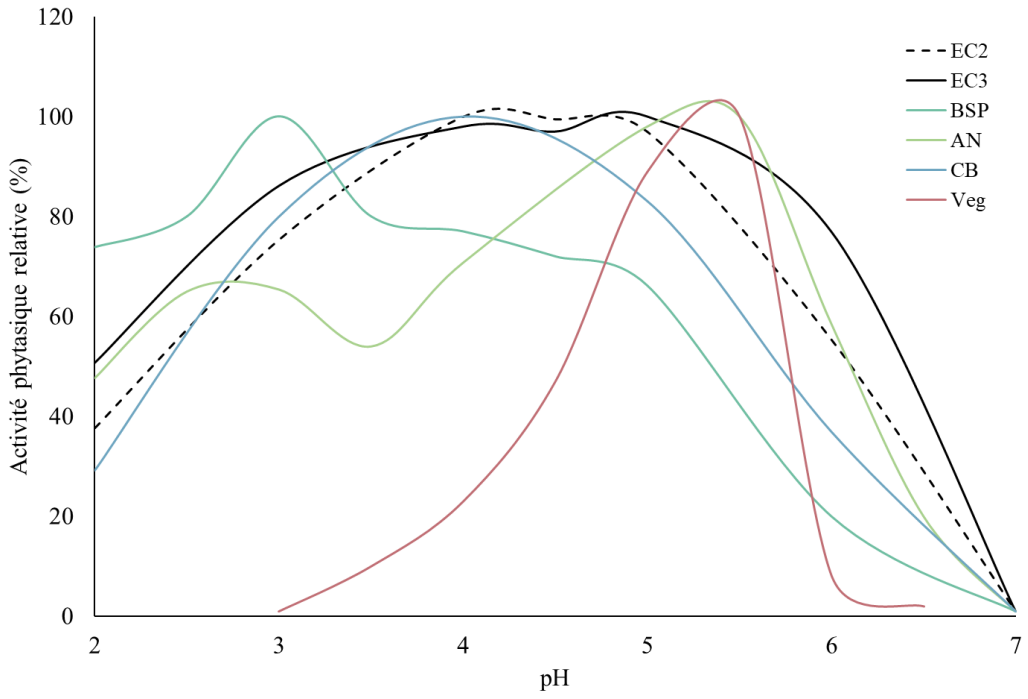


Figure 19 : Activité relative (%) des phytases en fonction du pH issues de données *in vitro*. Avec EC2, Quantum Blue (AB Vista) ; EC3, Phyzime XP (Danisco) ; BSP, AxtraPHY (Danisco) ; AN, Natuphos (BASF) ; CB, Ronozyme Hiphos (DSM) ; Veg, phytase végétal de son de blé. Avec EC représentant des phytase issues de *E. coli*, BSP une phytase issue de *Buttiauxella sp.*, AN une phytase issue de *A. niger*, et CB une phytase issue de *C. braakii*. Adaptée de Lautrou et al. (2021) et Brejnholt et al. (2011).

6−phytases commençant l'hydrolyse en position 6. Les 6–phytases hydrolysent entièrement l'acide phytique en un inositol et 6 P*i*, alors que les 3–phytases ne l'hydrolysent que partiellement (Angel et al., 2002), l'hydrolyse sera complétée par l'action de la phosphatase alcaline.

Les phytases exogènes, apportées par l'alimentation, regroupent les phytases végétales et les phytases microbiennes. Les matières premières végétales présentent une activité phytasique variable (Tableau 2 ; de 20 FTU/kg pour le maïs à 5 350 FTU/kg pour le seigle) (INRA-CIRAD-AFZ, 2017). Les phytases étant thermosensibles, le process de transformation avant l'incorporation dans l'aliment peut altérer l'activité phytasique végétale. Par exemple, lors de la production de granulés, le chauffage par vapeur (78 °C) et la chaleur produite lors du pressage (90 °C) dégradent l'activité phytasique des végétaux (Abdollahi et al., 2013). Les aliments formulés pour les poules pondeuses étant présentés sous forme de farine, l'activé de la phytase végétale est en partie préservée. Les phytases microbiennes sont issues de microorganismes et proviennent, par exemple, d'*Aspergillus niger* (3–phytase fongique), de *Peniophora lycii* et d'*Escherichia coli* (6–phytases bactériennes ; Selle et Ravindran, 2007). L'activité de la phytase se mesure en unité phytasique (FTU). Une FTU correspond à la quantité d'enzyme qui permet de libérer 1 µmol de P*i* d'une solution de 5,1 mmol/l de phytate de sodium par minute à un pH de 5,5 et une température de 37 °C (Engelen et al., 1994).

L'activité de ces enzymes est fortement dépendante du pH et chaque phytase présente des (ou un) pH optimaux (Figure 19 ; Lautrou et al., 2021). Par exemple, le pH optimal des phytases végétales se situe aux alentours de 5,5, alors que celui des phytases microbiennes se situe entre 3,5 et 5,5. Certaines phytases microbiennes présentent deux pH optimaux : un premier à pH = 2,5, et un second à pH = 5,5. Du fait de ces spécificités, au niveau du jabot (pH = 5,8) toutes les phytases sont actives, alors qu'au niveau du gésier, le pH acide favorise l'activité des phytases microbiennes (Dersjant-Li et al., 2014). Au niveau intestinal, l'activité des phytases exogènes est faible, voire inexistante (Gao et al., 2013). Cela s'explique par la hausse du pH, mais aussi par la présence d'enzymes digestives dégradant les phytases (Kumar et al., 2003).

L'incorporation de phytase microbienne dans l'aliment permet la valorisation du PP, et donc de réduire les niveaux d'incorporation des phosphates. Par exemple, Fernandez et al. (2019) ont montré chez la poule pondeuse que 0,12 % de PNP avec 600 FTU/kg est équivalent à 0,34 % de PNP sans phytase microbienne, en considérant la minéralisation osseuse comme critère de réponse. Néanmoins, bien que les équivalences phytases soient bien renseignées chez

le poulet de chair, peu de données sont disponibles chez la poule pondeuse. Réduire l'incorporation de phosphates dans la ration permet de limiter les rejets de P *via* les fèces (Lim et al., 2003). Par exemple, Martinez-Rojas et al. (2018) indiquent que l'ajout de 450 FTU/kg d'aliment à une ration comprenant 0,11 % de phosphate permet de réduire l'excrétion de P de 24 % par rapport à une ration sans phytase microbienne contenant 0,73 % de phosphate, cela sans affecter les performances de production.

Les phytases intestinales sont naturellement présentes au niveau de la muqueuse de l'intestin grêle de l'animal (Maenz et Classen, 1998). Bien que, chez les monogastriques, l'activité de ces phytases soit considérée comme faible (Jongbloed et al., 1992), il semblerait qu'elle soit relativement importante chez les volailles. Par exemple, Sommerfeld et al. (2019) ont montré que chez le poulet de chair gnotobiotique, jusqu'à 42 % de l'IP6 était dégradé. La phytase intestinale semble présenter une plus forte activité spécifique dans le duodénum que dans les autres segments intestinaux (Maenz et Classen, 1998). Le pH optimal de cette enzyme est situé aux alentours de 5,6–6,5 (Aboudabos, 2012). Ce pH est retrouvé dans le duodénum alors que le pH des parties les plus distales de l'intestin se rapproche de 7,0 (Denbow, 2015).

Maenz et Classen (1998) ne montrent pas de différence en termes d'activité spécifique de la phytase intestinale entre poules pondeuses et poulets de chair. Néanmoins, ces auteurs indiquent une activité phytasique intestinale totale plus élevée chez la poule pondeuse que chez le poulet de chair. Ces résultats semblent indiquer que la phytase intestinale serait moins active chez la pondeuse, en accord avec Rodehutscord et al. (2023). Sommerfeld et al. (2019) montrent que chez le poulet de chair, la dégradation de l'IP6 par la phytase intestinale est diminuée de 25 points de pourcentage lorsque le Ca et P alimentaire augmentent de 6,2 à 10,4 g/kg de MS et de 4,1 à 6,9 g/kg MS, respectivement. Les hauts niveaux de Ca alimentaires chez la poule pondeuse, l'utilisation différente du Ca et la durée de vie plus longue expliquent en partie la différence d'activité spécifique de la phytase intestinale (Sommerfeld et al., 2020).

3.2.4 L'utilisation de calcium particulaire pour resynchroniser l'apport et le besoin

Bien qu'il n'existe pas de définition consensuelle des larges particules de Ca (LP), le présent manuscrit définit les larges particules comme strictement supérieures à 0,8 mm de diamètre (Ferrando et al., 1987 ; Rao et Roland, 1990). En effet, selon Scott et al. (1971), les particules de plus de 1 mm sont incapables de passer le pylore. Les LP sont spécifiquement retenues dans le gésier, jusqu'à être suffisamment finement broyées pour pouvoir passer le pylore (Hetland et al., 2003). Cette observation conduit à la conclusion que le TMR des

composés de l'aliment dans le gésier diffère en fonction de leur taille. Par exemple, Svihus et al. (2002) indiquent qu'une grande partie de l'aliment a quitté le gésier après 30 minutes.

L'incorporation de grains entiers (20 %) dans l'aliment permet d'augmenter le poids relatif du gésier chez le poulet de chair (Biggs et Parsons, 2009), traduisant un meilleur développement de cet organe. Cette hypothèse est confirmée chez le poulet de chair, puisque Sadati et al. (2022) ont montré que l'incorporation de blé entier dans la ration (15 %) augmente l'épaisseur de la paroi musculaire du gésier de 20 %. De plus, Roche et Martinoli (1974), en mesurant l'activité électrique des muscles de la paroi du gésier, ont montré que l'inclusion de grains entiers augmente le rythme de contraction de 85 % par rapport à un aliment farine. Le développement musculaire du gésier et la hausse de son activité permettent un broyage fin des particules (Svihus, 2011). Outre les effet musculaires, l'incorporation d'aliment particulaire (blé ou maïs) augmente le volume du gésier (Amerah et al., 2008) assurant une plus grande capacité de stockage à cet organe. Chez le poulet de chair toujours, l'inclusion de maïs entier diminue le pH gastrique de 0,68 unité (Gabriel et al., 2003), et il semblerait que l'effet des grains entiers sur le pH gastrique s'accentue avec la durée d'alimentation (Bjerrum et al., 2005). Chez la poule pondeuse, l'inclusion de LP dans la ration stimule la sécrétion d'acide par le proventricule (Guinotte et al., 1995). Les LP, en distendant la paroi du jabot, envoient un message au proventricule par le biais de mécanorécepteurs, pour stimuler l'activité de la pompe H^+/K^+-ATPase. Ainsi, Guinotte et al. (1993) montrent que l'inclusion de particules de carbonate de Ca supérieures à 1,2 mm de diamètre augmente l'activité spécifique de cette pompe de 21 % par rapport à des particules fines (inférieures à 0,5 mm). Ensemble, ces données indiquent que l'incorporation de LP dans la ration créé un environnement favorable à la solubilisation des minéraux et participe également à améliorer la disponibilité des nutriments pour l'animal.

L'utilisation des LP permet également de réduire le décalage existant entre l'apport de Ca alimentaire durant la phase lumineuse et le besoin en Ca pour la production de la coquille durant la nuit, car les LP sont retenues plus longtemps dans le gésier (Nys et Leroy, 2018). Par exemple, Rao et al. (1992) ont montré que le TMR des fines particules (FP) dans le gésier était de 79 minutes, équivalent à celui du bol alimentaire (van der Klis et al., 1990), alors que celui des LP était de 394 minutes. Le temps de rétention plus long des LP dans un milieu acide permet une meilleure solubilisation *in vivo* (Zhang et Coon, 1997*a*). Par exemple, de Witt et al. (2006) montrent que les LP sont solubles à 63 % contre 56 % pour le FP. Néanmoins, comme le précisent Kim et al. (2019), le facteur taille à lui seul n'explique pas la solubilité du carbonate.

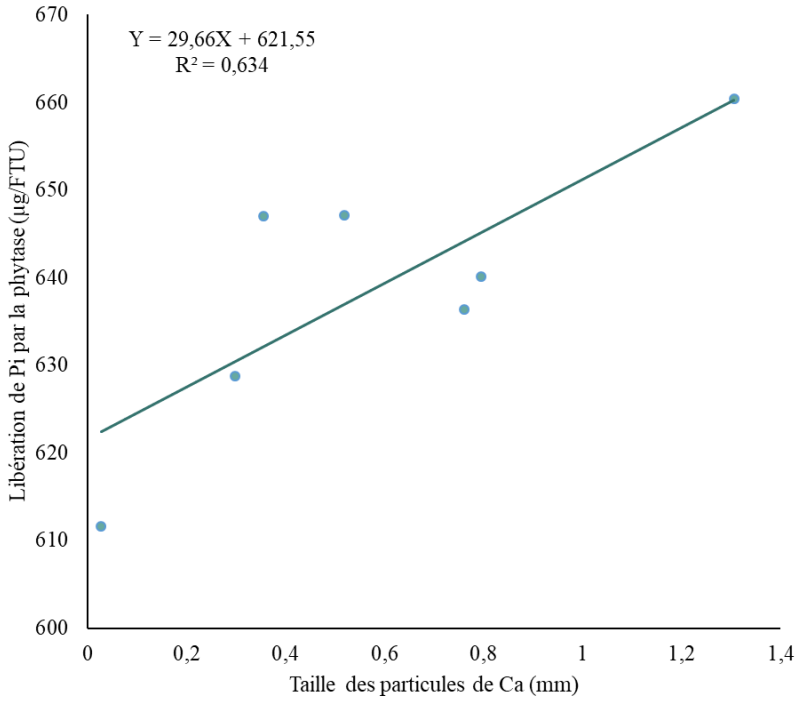


Figure 20 : Efficacité de la phytase en fonction de la taille des particules de Ca *in vitro*. Données tirées de Manangi et Coon (2007).

En effet, son origine géologique et ses caractéristiques physico-chimiques sont de grande importance. Le temps moyen de rétention plus long des LP dans le gésier assure une plus lente diffusion de Ca soluble dans l'intestin, prolongeant l'apport de Ca alimentaire au cours de la période sombre. Par exemple, Guinotte et al. (1995) retrouvent, douze heures après ingestion, deux fois plus de Ca ionisé dans le duodénum chez des poules recevant des LP. L'apport prolongé de Ca alimentaire au cours de la nuit permet de limiter la mobilisation osseuse pour produire la coquille (Fleming et al., 2006). L'incorporation de LP dans la ration permettrait de limiter les troubles osseux liés à l'âge et au fort niveau de production (Fleming, 2008). Ainsi, Gloux et al. (2020*a*) ont montré que l'incorporation de LP dans la ration limitait l'expression de gènes impliqués dans la résorption osseuse contrairement aux FP.

Les FP représentent une source de Ca directement disponible pour l'animal, contrairement au Ca particulaire. De fait, il convient d'apporter à l'animal un mélange de fines et larges particules afin de synchroniser au mieux l'apport de Ca aux besoins (Mongin et Sauveur, 1974 ; Cabrera-Saadoun et al., 1982). En début de journée, avant que la calcification de la coquille ne commence, la poule reconstitue ses réserves osseuses en Ca et P (Hurwitz, 1964 ; Kebreab et al., 2009), ce qui requiert une source de Ca rapidement disponible. En fin de journée, la poule anticipe la forte demande en Ca pour la nuit, d'où la nécessité d'une source plus lentement disponible. Par exemple, Molnar et al. (2018) ont testé différents apports de Ca entre le matin et l'après-midi à des poules en production. Ces auteurs montrent qu'un apport de 50 % de FP le matin et 50 % de LP l'après-midi est optimal pour la poule. Outre le moment d'apport des LP, de Oliveira et al. (2013) décrivent un effet quadratique du niveau d'incorporation des LP sur les paramètres de minéralisation osseuse. Selon ces auteurs l'optimum d'incorporation FP/LP serait de 37/63.

Enfin, chez le poulet de chair, plusieurs études mettent en avant l'effet positif de l'utilisation de LP sur l'efficacité de la phytase microbienne (Figure 20 ; Bradbury et al., 2016 ; Manangi et Coon, 2007). Selon ces auteurs, la rapide solubilisation des FP dans le gésier apporte une large quantité de substrat favorisant la formation de complexes entre le Ca et l'acide phytique, rendant inaccessibles les sites d'hydrolyse par la phytase. À l'inverse, les LP solubilisées plus lentement permettent de décaler la libération du Ca soluble dans le gésier et l'action de la phytase. Par exemple, Kim et al. (2018) ont montré que la digestbilité pré-cæcale apparente (DPCA) du P dans une ration apportant 1000 FTU/kg diminuait de 10 % quand la taille des particules de Ca diminuaient de 0,42 à 0,08 mm. Actuellement, cette interaction entre taille de particules et efficacité de la phytase n'a pas été montrée chez la poule pondeuse.

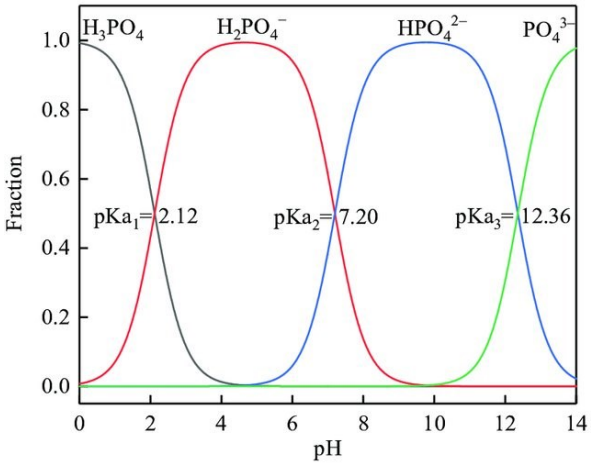


Figure 21 : Diagramme de phase des différentes formes de phosphate en fonction du pH. Selon Chen et al. (2021).

3.3 Absorption des minéraux dans l'intestin

3.3.1 Voies d'absorption

Une fois solubilisés, Ca et P peuvent être absorbés au niveau de la partie proximale de l'intestin (duodénum et jéjunum) (Hurwitz et Bar, 1971). En effet, ces segments présentent une forte capacité à absorber les minéraux (Hurwitz et Bar, 1968). Le duodénum est plus efficace dans l'absorption du Ca : 3,7 %/minute contre 0,6 %/minute pour le jéjunum chez la poule pondeuse. Néanmoins, le fait que le TMR du digesta dans le duodénum soit plus court que dans le jéjunum (chez le poulet de chair, 6,8 minutes contre 82 minutes, respectivement ; van der Klis et al., 1990) implique que le taux d'absorption net du Ca soit plus important dans le jéjunum (45,7 %) par rapport au duodénum (25,1 %) (Hurwitz et al., 1973). En mesurant les ratios Ca ionisé/P et Ca total/P, Hurwitz et Bar (1971) ont observé que le P est absorbé plus rapidement que le Ca. Liu et al. (2016), en comparant les paramètres cinétiques d'absorption (V_{max} et K_M) déterminés *in vitro*, indiquent que le duodénum présente une forte capacité d'absorption du P par rapport aux autres segments intestinaux. Et Wasserman et Taylor (1973) montrent que le duodénum est plus efficace pour absorber le P que le Ca. Le changement de ratio augmente la concentration de Ca^{2+} dans la lumière intestinale, ce qui modifie le gradient électrochimique de Ca en faveur d'une diffusion du Ca de la lumière vers le plasma (Bar, 2009).

Le transport des minéraux de la lumière intestinale vers le plasma à travers la paroi intestinale est assuré par la coopération de deux voies (Proszkowiec-Weglarz et Angel, 2013) : un transport transcellulaire, actif et saturable, et une diffusion paracellulaire, passive et insaturable. Pour le Ca, l'implication de l'une ou l'autre des voies est dépendante de la différence de concentration en Ca^{2+} entre la lumière intestinale et le plasma, une différence de concentration importante favorisant la voie paracellulaire. Bien que la quantification soit difficile à réaliser, la voie paracellulaire est supposée être la principale voie d'absorption du Ca. Par exemple, chez le rat, la diffusion peut représenter jusqu'à 50 % du Ca absorbé dans le duodénum (Bronner et al., 1986). Pour le P, l'implication de l'une ou l'autre de ces voies dépend du gradient de concentration et de la forme du P dans la lumière intestinale (Cross et al., 1990). Au niveau du duodénum, le pH acide (≈ 6,0) favorise la présence des P*i* sous forme $H_2PO_4^-$ (Figure 21) pouvant diffuser librement au travers de l'épithélium intestinal, ou bien traverser la paroi intestinale à l'aide de transporteurs. À l'inverse, le pH neutre de la partie distale de l'intestin favorise la forme HPO_4^{2-}. Incapable de diffuser librement, cette forme doit nécessairement emprunter la voie active (Forster et al., 2013). Contrairement au Ca, la perméabilité de l'intestin au P serait faible (Cross et al., 1990 ; Proszkowiec-Welgraz et Angel,

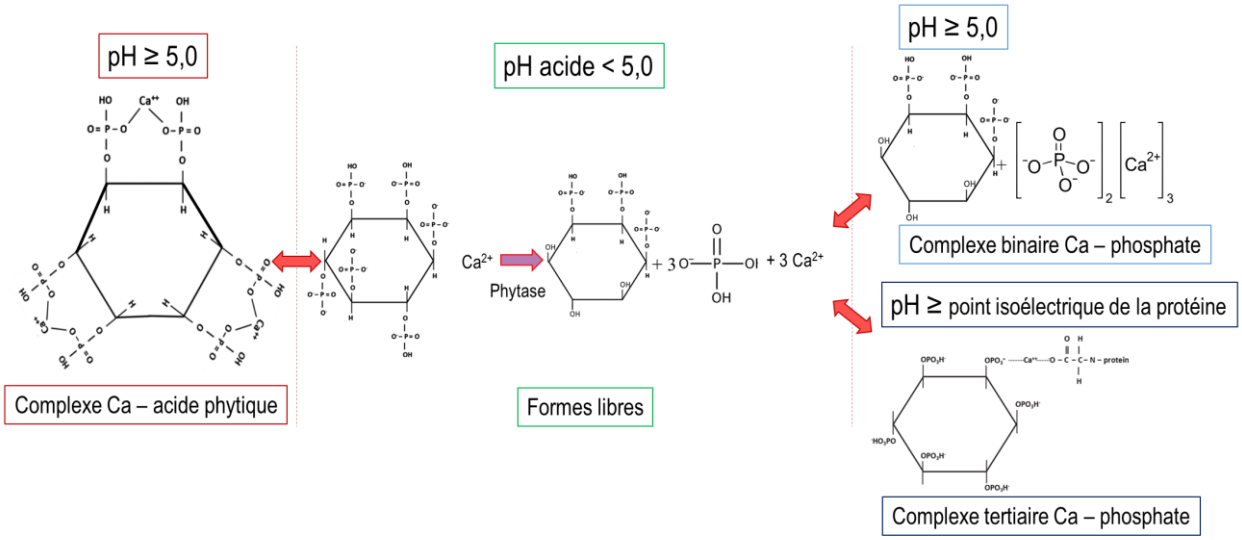


Figure 22 : Formation des différents complexes Ca−acide phytique.
La direction des flèches dépend de la concentration en substrat.
Inspirée de Selle et al. (2009).

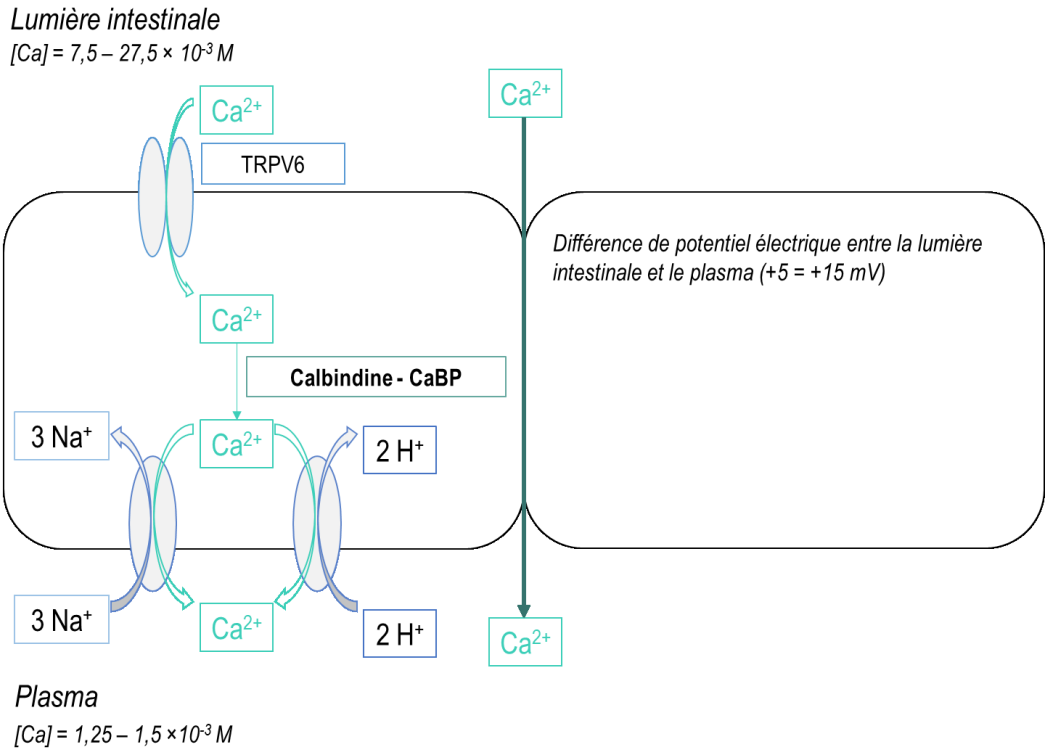


Figure 23 : Différents acteurs intervenant dans l'absorption active du Ca au travers de l'épithélium intestinal.

2013). Cependant, des études récentes réalisées chez le mammifère indiquent que l'absorption du P augmente linéairement avec la concentration luminale (Saurette et Alexander, 2019). Ces observations laissent supposer l'importance de la voie paracellulaire suite à un repas, alors que la voie transcellulaire serait favorisée en cas de faible apport de P alimentaire (Yee et al., 2021), comme en témoigne le bas K_M du transporteur NaP*i* IIb (donc sa forte affinité pour HPO_4^{2-}). Selon certains auteurs, chez le rat, la voie passive compterait pour 70 % de l'absorption du P (Marks et al., 2015).

Le Ca peut rapidement précipiter avec le P*i* à pH proche de la neutralité, formant *de novo* des complexes Ca−phosphates (Humer et al., 2015 ; Hurwitz et Bar, 1971). Aussi, comme mentionné précédemment, au pH de l'intestin, l'acide phytique est capable de former des complexes tertiaires avec des protéines en utilisant le Ca^{2+} comme pont cationique (Selle et al., 2012). La formation de l'un ou l'autre de ces complexes dépend de la concentration en substrat (Selle et al., 2009) et a pour conséquence une baisse de la disponibilité du Ca et/ou du P dans la partie distale de l'intestin (Figure 22).

3.3.1.1 La voie active

La voie transcellulaire comprend trois étapes (Gloux et al., 2019) : le passage de la lumière intestinale vers le cytosol de l'entérocyte, la traversée de l'entérocyte puis la sortie de l'entérocyte au pôle basolatéral vers le plasma. Des études réalisées chez le poulet de chair montrent que ce transport est électrogène (*i.e.*, qui transporte des éléments chargés + ou −) et indépendant du pH (Danisi et al., 1984 ; Shirazy-Beechey et al., 1988). Ce type de transport fait intervenir de nombreux acteurs moléculaires saturables et consommant de l'énergie. Par exemple, le transport du Ca est saturable aux alentours de 2–5 mmol/l (Guinotte, 1992).

L'entrée du Ca dans la cellule nécessite la présence d'un canal de la famille des TRP (Transient Receptor Potential) : TRPV6 (Figure 23). Ce canal est exprimé dans tous les segments intestinaux et plus particulièrement dans le duodénum (Jonchère et al., 2012). Chez les mammifères, le gène de TRPV6 présente un récepteur au métabolite actif de la vitamine D_3, ainsi qu'un récepteur aux œstrogènes (Bar, 2009). Dans la cellule, le Ca est pris en charge par une protéine de transport de la familles des calbindines, la calbindine−28KD (anciennement CaBP, Ca Binding Protein). Chez l'oiseau, la concentration en calbindine−28KD est plus importante dans la partie proximale de l'intestin que dans la partie distale (Bar et al., 1976). L'expression du gène et la synthèse de la protéine sont fortement régulées par le métabolite

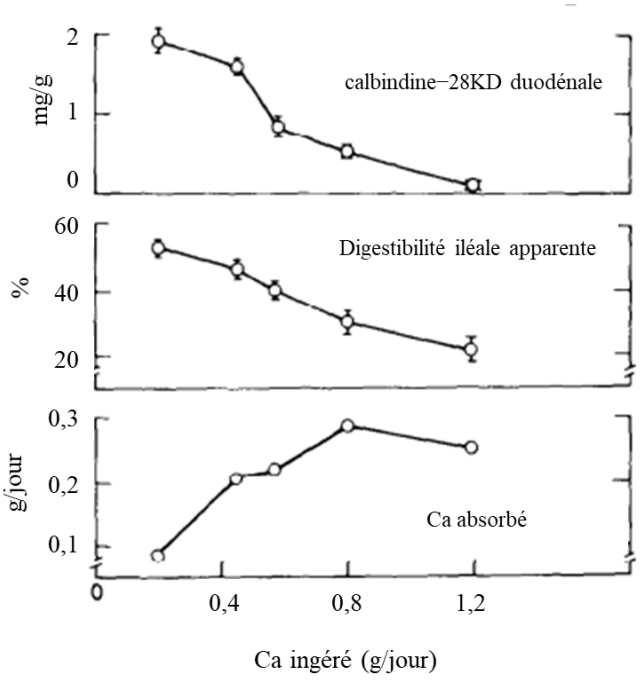


Figure 24 : La concentration en calbindine−28KD du duodénum est directement corrélée avec le taux d'absorption du Ca.
Tirée de Bar et al., 1979.

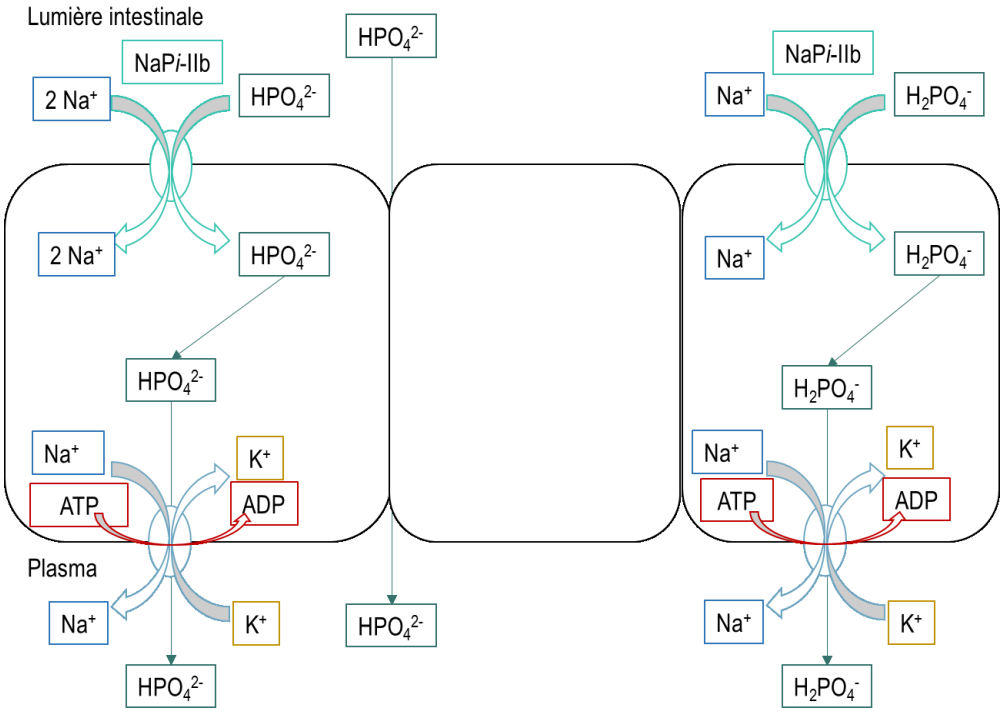
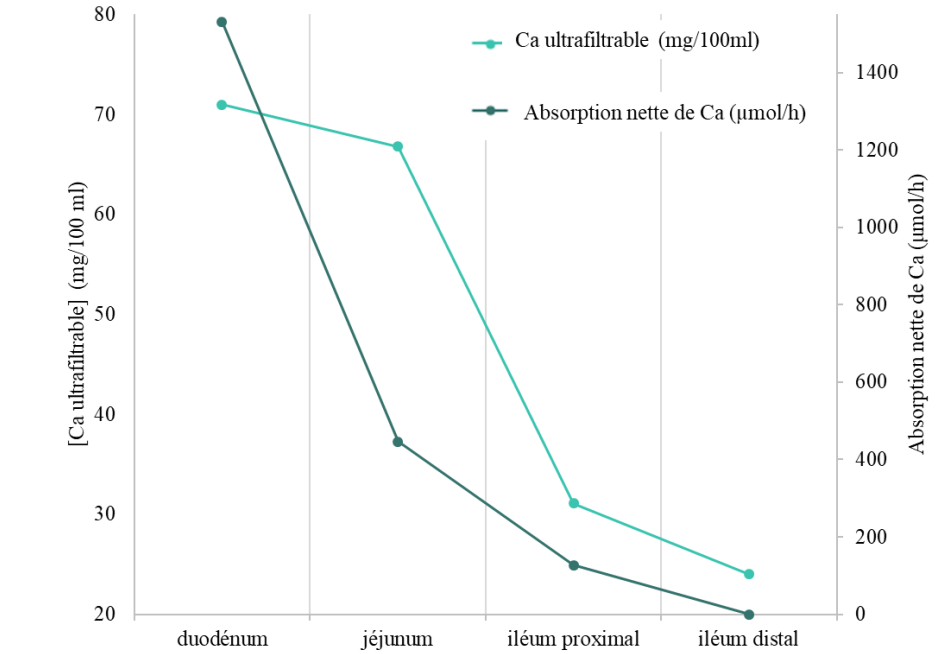


Figure 25 : Acteurs intervenants dans l'absorption active du P au travers de l'épithélium intestinal.

actif de la vitamine D_3. Enfin, la sortie du Ca de la cellule est assurée par une pompe à proton, PMCA (Plamsa Membrane Ca Pump ; Proszkowiec-Welgraz et Angel, 2013), ou encore par un échangeur Na^+/Ca^{2+}, un antiport laissant sortir le Ca^{2+} contre l'entrée du Na^+. PMCA semble régulée par le métabolite actif de la vitamine D_3 chez le poulet (van Baal et al., 1996). L'échangeur Na^+/Ca^{2+} jouerait un faible rôle dans la sortie du Ca intestinal chez le poulet (Hoenderop et al., 2005).

La calbindine−28KD est exprimée majoritairement dans les tissus intervenant dans le transport massif du Ca, tels que l'intestin, les reins ou la glande coquillière (Bar, 2009). De très nombreuses études décrivent son rôle clé dans l'absorption du Ca chez la poule. En effet, sa concentration intestinale est directement corrélée avec la capacité d'absorption de Ca de l'intestin (Figure 24 ; Bar et al., 1979 ; Bar et Hurwitz, 1984). La maturité sexuelle est marquée, entre autres, par une hausse de la concentration intestinale en calbindine−28KD (Gloux et al., 2019). À l'inverse, l'arrêt de la production (qu'il soit naturel ou induit) chez la poule induit une baisse de la concentration intestinale de cette protéine (Bar et al., 1978). Ensemble, ces observations semblent montrer la spécialisation de la poule pondeuse dans l'absorption du Ca.

L'entrée du P dans l'entérocyte est assurée par un symport Na^+−dépendant, dont il existe trois types (Proszkowiec-Welgraz et Angel, 2013), le type II étant le plus exprimé (Tenenhouse et al., 1998). Le type I (NaP*i* – I) est exprimé au niveau des tubules contournés proximaux des reins mais son implication dans l'homéostasie du P n'est pas clairement établie. Le type II est composé par les protéines NaP*i*−IIa, NaP*i*−IIb et NaP*i*−IIc codées par les gènes SLC34A (Froster et al., 2013). NaP*i*−IIa est retrouvé au niveau rénal et régule l'excrétion urinaire du P, NaP*i*−IIc présente un faible rôle dans le transport du P chez les mammifères (Proszkowiec-Welgraz et Angel, 2013) et NaP*i*−IIb est principalement exprimé dans l'intestin. Chez les mammifères, NaP*i*−IIb assure plus de 90 % du transport actif du P (Figure 25 ; Sabbagh et al., 2009). Chez le poulet, son expression est forte dans le duodénum et faible dans l'iléon (Yan et al., 2007). Chez la souris, ces protéines sont impliquées dans le transport de HPO_4^{2-} (Forster et al., 2013) et sont activées par de faibles niveaux de P alimentaire de façon indépendante de la 1,25−OH_2−D_3 (Bergwitz et Jüppner, 2010 ; Katai et al., 1999). De la même manière, chez le poussin, une baisse du P alimentaire induit une hausse de l'expression de NaP*i*−IIb dans les trois segments de l'intestin (Yan et al., 2007). Le 1,25−OH_2−D_3 n'apparait pas comme le régulateur principal de l'absorption du P, puisque chez l'humain subcarencé en P, seulement 30 % de l'absorption du P semble régulée par ce métabolite (Wilz et al., 1979). Le type III comprend deux transporteurs (P*i*−T1 et P*i*−T2) codés par les gènes de la famille des SCL20.



pH	6,9	6,9	7,8	8,0
DPEC (mV)	14,7	25,5	15,2	−13,3

Figure 26 : Mise en évidence de l'implication de la voie paracellulaire dans l'absorption du Ca chez la poule pondeuse.
Sur l'axe des ordonnées de gauche, le Ca ultra-filtrable représentant la fraction absorbable du Ca (courbe vert clair). L'axe des ordonnées de droite représente le flux d'absorption du Ca (courbe vert foncé). Avec DPEC, Différence de Potentiel Electro-Chimique.
Adaptée de Hurwitz et Bar (1968).

Ces protéines sont impliquées dans le transport de $H_2PO_4^-$ (Forster et al., 2013). Bien qu'il s'agisse de transporteurs ubiquitaires, P*i*−T1 est principalement retrouvé au niveau de la bordure en brosse de l'intestin, essentiellement au niveau du duodénum et du jéjunum (Giral et al., 2009), alors que P*i*−T2 est principalement retrouvé au niveau des tubules contournés proximaux des reins (Villa-Bellosta et al., 2009). P*i*−T1 est activé par le calcitriol et de faibles niveaux en P. Le transport du P au travers de la cellule pourrait faire intervenir un transporteur, mais des incertitudes existent quant à son existence. La sortie du P de l'entérocyte vers le plasma est assuré par une diffusion passive (Cross et al., 1990) ; certains auteurs indiquent l'existence d'un cotransport Na−P.

3.3.1.2 La voie passive

Le transport passif au travers des jonctions serrées de l'épithélium intestinal dépend de la différence de potentiel électrochimique entre la lumière intestinale et le plasma (Nys et Mongin, 1982), celui-ci dépend à la fois du gradient de concentration en minéraux et de la différence de potentiel électrique entre la lumière intestinale et le plasma (Figure 26). Chez la poule, la différence de potentiel électrique entre la lumière intestinale et le plasma est comprise entre +5 et +15 mV, le plasma étant toujours positif vis-à-vis de la lumière intestinale (Bar, 2009). Cette différence de potentiel électrique étant défavorable à l'absorption des minéraux (Hurwitz et Bar, 1968), la diffusion des minéraux au travers l'épithélium intestinal requiert une différence de gradient de concentration positive entre la lumière intestinale et le plasma. Lors de la phase de formation de la coquille, alors que la concentration intraluminale en Ca augmente de 7,5 à 27,5 mmol/l (Nys et Mongin, 1982) et la calcémie baisse fortement. Cela favorise fortement la diffusion du Ca au travers de l'épithélium. Plusieurs auteurs ne décrivent pas de variation d'expression de la calbindine−28KD lors du cycle de formation de la coquille (Bar, 2009 ; Gloux et al., 2020*a*). De plus, Nys et Mongin (1982) indiquent que le flux de Ca, au travers du jéjunum, augmente lorsque la concentration en Ca dans le lumière intestinale augmente. Ensemble, ces observations semblent indiquer une forte implication de la voie paracellulaire dans l'absorption du Ca lors de la calcification de la coquille. Une étude réalisée chez le rat indique que la voie paracellulaire compterait pour 60 à 70 % du Ca absorbé au niveau du duodénum et du jéjunum (Karbach, 1992).

La différence de potentiel électrique positive entre la lumière intestinale et l'intérieur de l'entérocyte limite la diffusion passive des ions chargés négativement. Seule la forme $H_2PO_4^-$, majoritaire dans le duodénum, est capable de diffuser au travers de l'épithélium. Selon Cross et al. (1990), $H_2PO_4^-$ doit être quatre fois plus concentré dans la lumière que dans le plasma

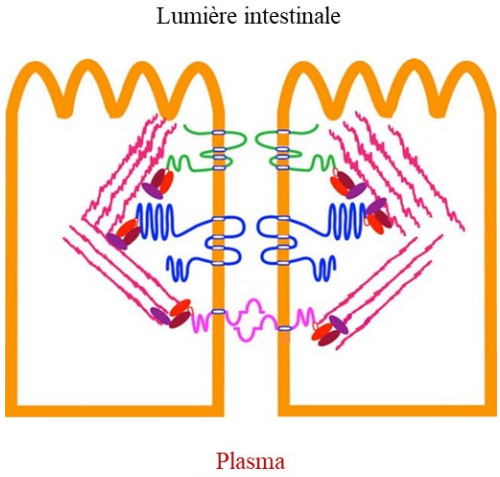


Figure 27 : Schéma des jonctions serrées.
En vert les claudines, en bleu les occludines, en rose les Junctional Adhesion Molecules (JAM) ; ces trois types de protéines sont des protéines transmembranaires directement impliquées dans la diffusion des minéraux. En violet (dans le cytoplasme) les composants du cytosquelette auxquels sont rattachés les protéines transmembranaires.
Adaptée de Li et al. (2011).

pour diffuser librement. Cette situation, se produisant suite à un repas, favoriserait la diffusion du P au travers de l'épithélium (Proszkowiec-Welgraz et Angel, 2013). Il apparait que le duodénum soit le site privilégié de la diffusion du P. En s'éloignant du pylore, l'augmentation du pH favorise la forme HPO_4^{2-} ne diffusant pas (80 % dans le jéjunum et l'iléon).

Ce type de transfert fait intervenir des protéines transmembranaires et prend place au sein des espaces intercellulaires de l'épithélium intestinal (Figure 27 ; Gloux et al., 2019). Différentes protéines sont impliquées dans la diffusion des minéraux, dont les occludines et claudines (CLDN) ; protéines transmembranaires sélectives pour les ions. Chez la poule, deux claudines majeures ont été identifiées au niveau intestinal pour le transfert du Ca (Gloux et al., 2020*a*) : CLDN2 et CLDN12. Pour $H_2PO_4^-$, la CLDN, responsable du transfert n'a pas encore été identifiée (Saurette et Alexander, 2019). Le fait que la voie paracellulaire puisse être régulée par le 1,25−OH_2−D_3 est sujet à débat. Néanmoins, certaines études réalisées sur des cailles pondeuses indiquent qu'en période de calcification de la coquille, des animaux nourris avec du 1−α−OH−D_3, un analogue actif de la 1,25−OH_2−D_3, absorbent plus de Ca que des animaux qui ne calcifient pas de coquille. Cette hausse de l'absorption du Ca n'est pas associée à une hausse de concentration en calbindine−28KD intestinale (Cohen et al., 1978). Des études récentes indiquent que les protéines constitutives des jonctions serrées responsables de la diffusion peuvent être régulées par des hormones ou des récepteurs nucléaires (van Itallie et Anderson, 2006). Ces résultats laissent présumer que la diffusion passive est régulable (Bar, 2009).

3.3.2 Leviers de régulation de l'absorption intestinale

3.3.2.1 La maturité sexuelle

Alors que la poulette immature absorbe en moyenne 23 % du Ca ingéré (Hurwitz et Bar, 1969 ; Bar et al., 1976), la poule en production en absorbe en moyenne 65 % (Hurwitz et al., 1973 ; Etches, 1987). Hurwitz et al. (1973) indiquent que la minéralisation de la coquille induit une augmentation de l'absorption du Ca dans tous les segments intestinaux, avec une réponse maximale au niveau du jéjunum proximal. Ce mécanisme se développe tôt lors de l'entrée en ponte, et, est marqué par une hausse de la perméabilité de l'épithélium intestinal au Ca (Nys et Mongin, 1980). Comme l'ont montré Gloux et al. (2019) en mesurant l'expression de gènes dans les différents segments de l'intestin, cette augmentation de la capacité de l'intestin à absorber le Ca implique une coopération des voies active et passive. Ces auteurs montrent une surexpression de la CLDN12 (impliqué dans la diffusion du Ca) dans le jéjunum. En outre, lors de la calcification de la coquille, une hausse de l'absorption de Ca est remarquée au niveau du duodénum uniquement (Hurwitz et al., 1973). La maturité sexuelle est marquée par une hausse

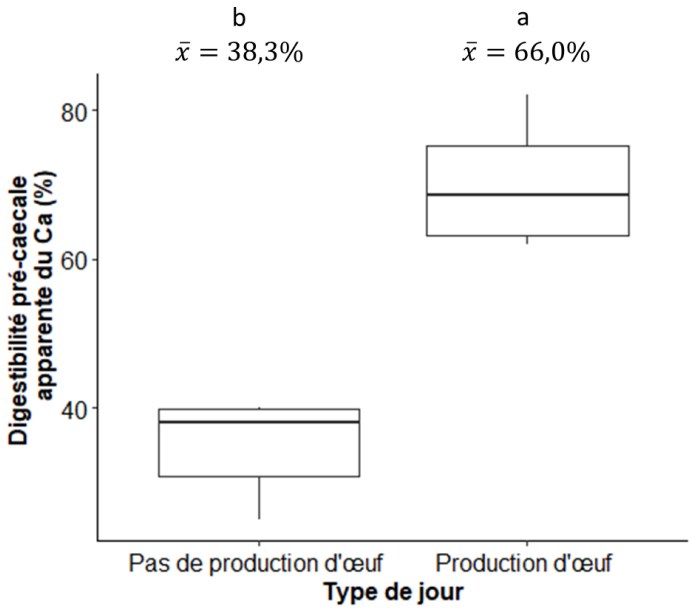


Figure 28 : Effet de la production d'œuf sur la digestibilité pré-cæcale apparente du Ca chez la poule pondeuse.
Données issues de Cohen et al. (1978), Hurwitz et Bar (1965), Hurwitz et al. (1973) et Nys et al. (1986).
$^{a-b}$: Les valeurs moyennes portant deux lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$), selon un test HSD de Tukey de séparation de moyenne.

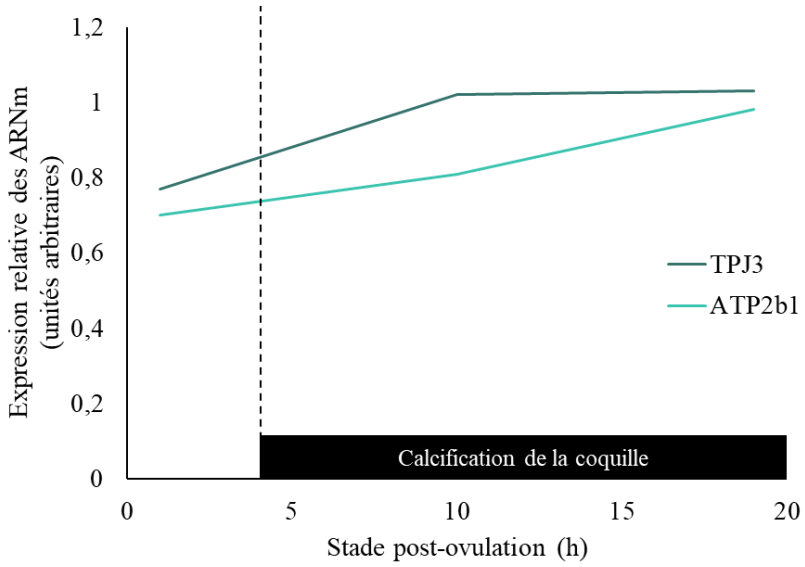


Figure 29 : Évolution de l'expression de gènes impliqués dans l'absorption du Ca chez la poule pondeuse en fonction du stade de formation de la coquille.
Le gène TPJ3 est impliqué dans l'absorption passive du Ca et le gène ATP2b2 est impliqué dans le transport actif du Ca.
Données tirées de Gloux et al. (2020*a*).

de la concentration en calbindine−28KD au niveau du duodénum (Nys et al., 1992), ainsi que par une hausse de l'activité de la 1−α−hydroxylase au niveau des reins, conduisant à une hausse du taux circulant de 1,25−OH_2−D_3 (Bar et al., 1978). Ce dernier est maximal au niveau du duodénum (Hurwitz et al., 1972), segment majoritairement impliqué dans le transport actif du Ca (Proszkowiec-Welgraz et Angel, 2013). Ensemble, ces observations montrent que l'entrée en ponte chez la poule est marquée par une hausse de la capacité de l'intestin à absorber le Ca, ceci en vue de répondre aux besoins de production de la coquille.

3.3.2.2 Le statut physiologique

La Figure 28 indique la différence de DPCA du Ca entre un jour sans production d'œuf et un jour avec production d'œuf chez la poule. Cette figure intègre 12 observations tirées de 4 publications parues entre 1969 et 1986. Ainsi, les jours de production d'œuf, la DPCA est augmentée de 28 points ($P < 0,05$). Nys et Mongin (1980) indiquent que la hausse d'absorption de Ca, lors de la formation de la coquille, peut s'expliquer par deux phénomènes : premièrement *via* une augmentation de la quantité de Ca au niveau intestinal, dû à la mise en place d'un appétit calcique spécifique et deuxièmement par une hausse des sécrétions de sucs gastriques par le proventricule ainsi qu'une hausse de la sécrétion d'eau dans le gésier (Mongin, 1976). Ceci a pour objectif de créer un milieu acide aqueux optimal pour assurer la solubilisation du Ca. De plus, Gloux et al. (2020*a*) ont mis en évidence une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans le transport (actif et passif) du Ca au travers de l'épithélium intestinal au cours du cycle de formation de la coquille (Figure 29). Ensemble, ces phénomènes indiquent que l'augmentation de l'absorption lors de la calcification de la coquille est liée à un apport plus important de Ca absorbable au niveau intestinal (par une augmentation de l'ingestion et de la solubilisation dans le gésier) et à une augmentation de la capacité de l'intestin à absorber ce Ca. Ces observations mettent en avant la capacité de la poule à adapter sa capacité d'absorption heure par heure (Hurwitz et Bar, 1969), et le rôle fondamental de l'intestin dans le métabolisme calcique.

3.3.2.3 Niveaux alimentaires de calcium et de phosphore

Le niveau de Ca alimentaire affecte la solubilisation du Ca dans le gésier (Zhang et Coon, 1997*a*). Par exemple, Rao et Roland (1989) montrent une diminution de la solubilisation du Ca de 35 % lorsque le niveau de Ca alimentaire augmente de 1 à 6 %. De plus, le niveau alimentaire de Ca affecte également son absorption. Ainsi, Hurwitz et Bar (1969) montrent une baisse de 23 % de la DPCA lorsque le Ca augmente de 0,6 à 3,9 %. Ces différents résultats

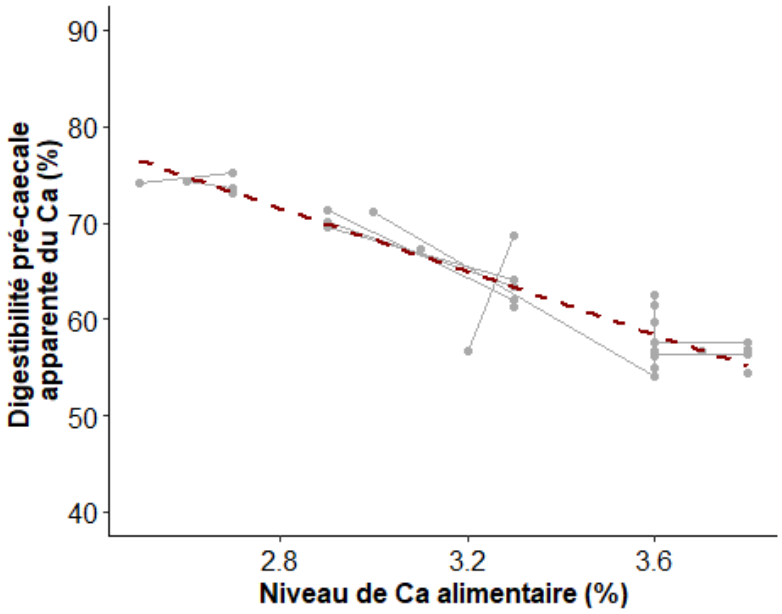


Figure 30 : Effet du niveau de Ca alimentaire sur la digestibilité pré-cæcale apparente du Ca chez la poule pondeuse.
Avec, Y = 117,43 – 16,39 × Ca alimentaire ; $P < 0{,}001$; $R^2 = 0{,}92$.
Données tirées de Bello et Korver (2019), Franschesh et al. (2005), Javadi et al. (2021), Liu et al. (2007), Pongmanee et al. (2020), Sommerfeld et al. (2020), van der Klis et al. (1997) et Zhai et al. (2022).

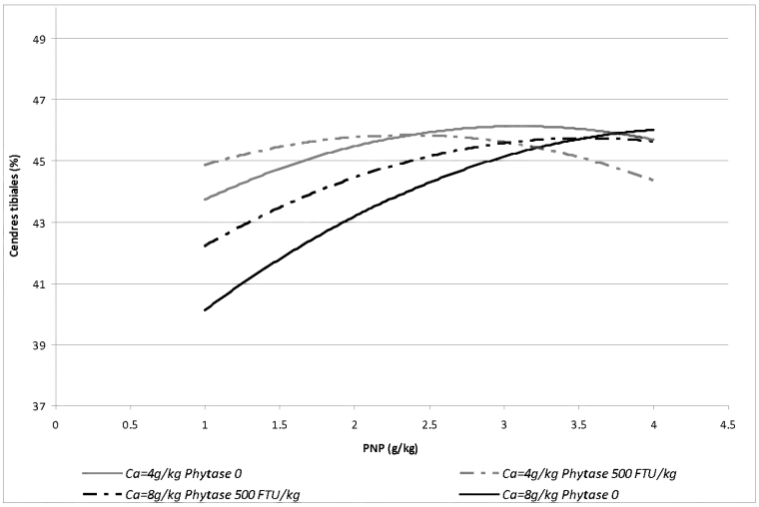


Figure 31 : Cendres osseuses en fonction du PNP, du Ca et de la phytase microbienne chez le poulet de chair.
Tirée de Rousseau et al. (2011).

mettent en lumière la plasticité de la poule pour adapter ses capacités digestives aux apport de Ca. Néanmoins, même si lors d'une carence le taux d'absorption augmente, la quantité nette absorbée (en g) diminue. En compilant les données de la littérature, nous avons pût établir une relation entre la DPCA du Ca et le niveau de Ca alimentaire (Figure 30). Cette étude est basée sur 40 observations tirées de 11 études publiées entre 1997 et 2022, avec des niveaux alimentaires en Ca variant de 2,50 à 3,80 %. Cette étude montre que la DPCA du Ca baisse linéairement avec le niveau de Ca alimentaire ($Y = 117{,}43 – 16{,}39 \times$ Ca alimentaire ; $P < 0{,}001$; $R^2 = 0{,}92$).

Du fait des fortes interactions entre Ca et P, un déséquilibre dans l'apport de ces minéraux peut engendrer une baisse de leur digestibilité. Par exemple, chez des poulets de chair de 21 jours, la baisse de P alimentaire induit une hausse de la digestibilité pré-cæcale du Ca (Hurwitz et Bar, 1971 ; Hurwitz et al., 1973). Bar et Hurwitz font la même observation avec des poules pondeuses nourries avec 3,6 % de Ca et 0,7 ou 0,2 % de P*t*. Dans cette étude, la baisse de P*t* alimentaire induit une augmentation de la DPCA du Ca et du P de 27 et 23 points de pourcentage, respectivement. Néanmoins, les poules carencées en P présentent une baisse du taux de ponte de 30 %. L'apport de Ca et P doit donc être réfléchi conjointement, comme le montrent Rousseau et al. (2011) dans une méta-analyse de l'utilisation du P chez le poulet de chair en fonction du Ca alimentaire et de la phytase microbienne (Figure 31). Selon ces auteurs, l'augmentation du Ca alimentaire doit être accompagnée d'une hausse de P pour assurer un dépôt osseux adéquat. Nie et al. (2013) ont montré que l'expression intestinale de l'ARNm de NaP*i*−IIb diminue quand le niveau alimentaire de P augmente. Ces mêmes auteurs montrent que l'expression des ARNm de la calbindine−28KD et du récepteur à la vitamine D évolue quadratiquement avec le niveau alimentaire de P, de telle sorte que leur expression est maximale pour un niveau de PNP de 0,25–0,30 %. Ces observations montrent la plasticité de l'épithélium intestinal des oiseaux pour répondre à leurs besoins.

Optimiser le niveau de Ca alimentaire permet également d'optimiser l'efficacité de la phytase microbienne (Bedford et Rousseaux, 2017). En effet, chez le poulet de chair, de forts niveaux de Ca ont tendance à augmenter le pH gastrique et à favoriser la précipitation du Ca avec le P (sous forme de P*i* ou PP) (Walk, 2016). En considérant qu'un régime bas P et haut Ca accentue la carence en P, le fait que le Ca limite l'activité de la phytase microbienne peut aggraver le manque de P et se répercuter sur la minéralisation osseuse.

Le moment de la journée où l'on apporte l'aliment module l'utilisation du Ca ou du P par l'animal. Par exemple, un jeûne provoqué l'après-midi entraîne une baisse de la qualité de

la coquille (Sauveur et Mongin, 1975), tandis que la baisse d'apport de P l'après-midi assure une meilleure qualité de coquille (Choi et al, 1979). De la même façon, Sauveur et Clavreul (1984) ont montré qu'il était possible d'améliorer la qualité de coquille avec un régime bas Ca/haut P le matin et bas P/haut Ca l'après-midi. Ces études montrent que l'apport d'une quantité importante de Ca en deuxième partie de journée est nécessaire et que le P peut affecter négativement la qualité de la coquille. La poule est peu sensible à un déficit de Ca en milieu de journée. Des études récentes montrent que la forme d'apport de Ca (FP *vs.* LP) peut être modulée entre le matin et l'après-midi pour optimiser son utilisation par l'animal (Molnar et al., 2018). Néanmoins, Poudel et al. (2022) ne montrent pas d'effet de la chrono-nutrition sur la minéralisation osseuse, selon ces auteurs, la forme d'apport montre un effet plus fort que le moment de distribution.

3.3.2.4 Vitesse de transit

Chez les oiseaux, il existe un reflux du contenu duodénal vers le gésier (Roche et al., 1979). Ce reflux améliore la digestion des nutriments (Sklan et al., 1978) et compense le transit rapide des aliments dans le duodénum (Moran, 1982). La motricité intestinale est très dépendante de la motricité gastrique (Roche et Decerprit, 1977). Par exemple, la contraction rétrograde de l'intestin nécessite une inhibition totale de l'activité motrice du gésier (Roche et al., 1979). Chez la poule, lors de la maturité sexuelle, l'activité gastrique est maintenue à un niveau élevé durant la nuit et il se produit très peu de contractions rétrogrades de l'intestin (Roche et Decerprit, 1977) : 70 % de moins par rapport à une poulette immature. La fréquence de contraction du gésier augmente en début de repas et baisse à la fin du repas, la baisse de contraction du gésier traduisant l'état de satiété (Savory, 1987).

Malgré une vitesse de transit intestinal élevée, les oiseaux présentent une forte capacité à absorber les nutriments (Svihus et Itani, 2019), surtout dans la partie proximale (*i.e.*, duodénum et jéjunum proximal) de l'intestin où le TMR est d'environ 75 minutes. Parmi les facteurs contrôlant l'utilisation digestive des minéraux, la vitesse de transit joue un rôle important. D'une façon générale, la baisse de la vitesse de transit est en lien avec une hausse de l'absorption de Ca (Bronner et Pansu, 1999). Le nombre de neurones de la paroi intestinale augmente avec l'âge, mais moins rapidement que n'augmente la taille de l'intestin. De fait, la densité des neurones de la paroi intestinale baisse avec l'âge (Duke, 1986), ce qui induit une baisse de la vitesse de transit intestinal (Akahori et al. 1971). Néanmoins, la baisse de capacité de l'intestin à absorber les minéraux avec l'âge ne permet pas de compenser la baisse de la vitesse de transit.

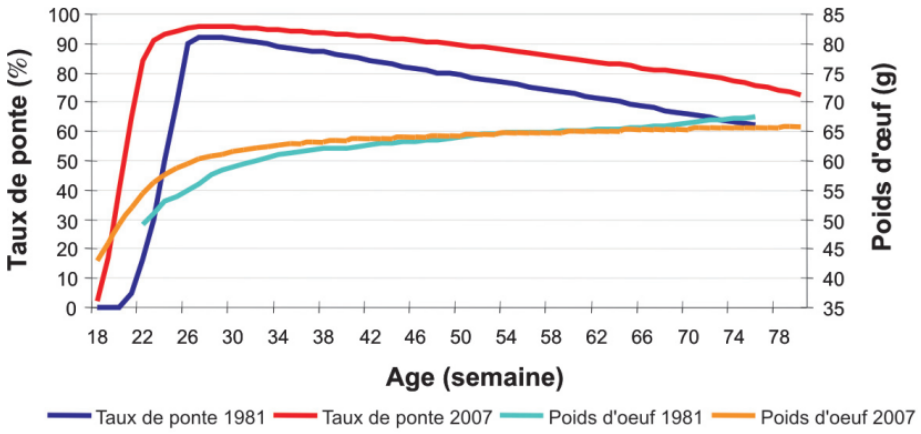


Figure 32 : Évolution du taux de ponte et du poids des œufs entre 1981 et 2007.
Tirée de Beaumont et al. (2010).

Tableau 3 : Évolution du poids de l'œuf et de ses constituants avec l'âge de la poule.
Tiré de Travel et al. (2010).

Âge des poules (semaines)	**34/35**		**50/51**		**70/71**	
	g	**%**	**g**	**%**	**g**	**%**
Œuf	61		66		68	
Jaune	16	26	19	29	20	29
Coquille	6	10	6	9	7	10
Blanc	39	64	41	62	41	60
Blanc/jaune	2,4		2,2		2,1	

4 Effet du vieillissement chez la poule

Après le pic de ponte, une baisse constante du niveau de production est observée avec une dégradation de la qualité de coquille (Travel et al., 2010) : la proportion d'œufs cassés pouvant atteindre 20 % en fin de carrière (Bar et Hurwitz, 1987 ; Gloux, 2019). Une baisse de qualité de la structure osseuse est également observée (Whitehead, 2004), avec une hausse de l'incidence de l'ostéoporose en élevage (Whitehead et Fleming, 2000).

4.1 Une production altérée avec le vieillissement de l'animal

Le taux de ponte baisse progressivement du pic de ponte, aux alentours de 25−30 semaines d'âge, jusqu'à la fin de période de ponte, aux alentours de 70 semaines d'âge (Figure 32). Ainsi, Tumova et Gous (2012) notent une baisse de la production de 24 points de pourcentage entre 25 et 85 semaines d'âge. Cette baisse du taux de ponte peut être expliquée en partie par l'augmentation de l'intervalle entre deux pontes (Sauveur, 1988), ainsi que par une diminution de la durée des séries de ponte de 26 % entre 25 et 85 semaines d'âge (Tumova et Gous, 2012).

Le vieillissement est également marqué par une augmentation du poids de l'œuf de 61 à 67 g entre 28 et 75 semaines d'âge (Tableau 3 ; Gu et al., 2021). Outre le poids de l'œuf, la masse des trois composants de l'œuf évolue également, néanmoins la masse du jaune augmente plus vite que celle du blanc et de la coquille. Par exemple, la proportion de jaune augmente de 26 à 29 %, alors que la proportion de blanc diminue de 63 à 61 % entre 34 et 70 semaines d'âge (Ternes et al., 1994). De fait le rapport blanc/jaune baisse de 2,6 à 2,1. En début de ponte, les œufs sont plutôt ronds, puis ils s'allongent avec l'âge de la poule (Travel et al., 2010). Cette modification de la forme de l'œuf, attribuable à une baisse de tonicité des muscles de la glande coquillière avec l'âge, participe à la baisse de solidité de la coquille de 6 % entre 26 et 51 semaines d'âge (Vlckova et al., 2018). La proportion de coquille croît avec l'âge, mais plus lentement que ne croît la masse des autres constituants. De fait, l'épaisseur de la coquille diminue avec l'âge (Curtis et al., 2005). Au niveau micro-structurel, Solomon (1991) observe une désorganisation de la couche mamillaire, affaiblissant la liaison entre la coquille et les membranes coquillières. Au sein même de la coquille, l'orientation des cristaux de calcite varie avec l'âge, induisant une fragilité supplémentaire (Rodriguez-Navaro et al., 2012).

4.2 Une dégradation progressive du squelette

Avec l'âge, l'incidence de l'ostéoporose augmente chez la poule pondeuse. Une étude indique que dans les troupeaux européens, 30 % des poules en fin de carrière sont touchées par

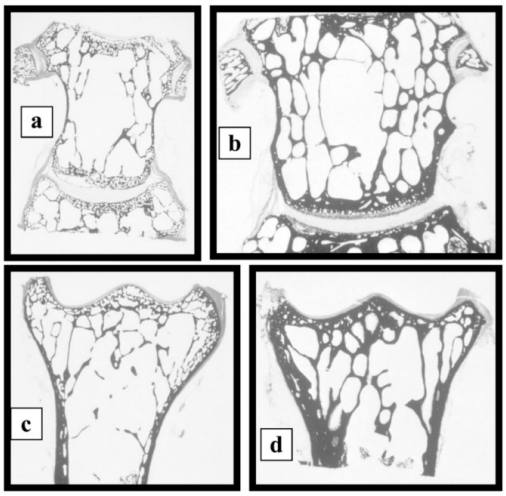


Figure 33 : Ostéoporose chez la poule pondeuse.
Les figures a et b représentent une section de vertèbre, les figure c et d représentent une section de tibia. Les figures b et d représentent un os sain. Les figures a et c montrent des os de poules atteintes d'ostéoporose : l'os cortical plus fin et les trabécules moins connectées.
Tirée de Whitehead et Fleming (2004).

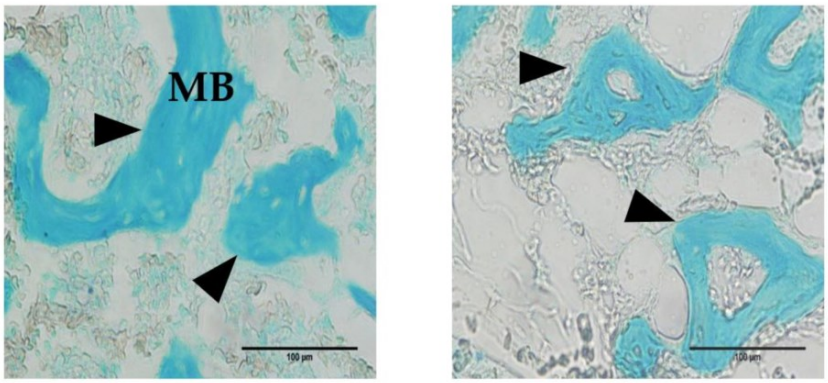


Figure 34 : Évolution de l'os médullaire avec l'âge.
Diaphyse tibiale de poule âgée de 25 (a) ou 52 semaines (b) colorée au bleu alcian. Les flèches noires indiquent la présence d'os médullaire (MB). À 25 semaines d'âge, les travées d'os médullaires sont larges, alors qu'à 52 semaines d'âge, celles-ci sont plus étroites.
Tirée de Yamada et al. (2021).

cette maladie (Whitehead et Fleming, 2000). L'ostéoporose correspond à une diminution du volume d'os structurel minéralisé au profit du volume d'os médullaire (Figure 33 ; Whitehead et Fleming, 2000), induisant une diminution de la solidité de l'os et augmentant le risque de fractures (Whitehead, 2004). Yamada et al. (2021), en réalisant des CT-scans de diaphyses tibiales sur des poules âgées de 25 ou 52 semaines, ont montré une baisse du volume d'os cortical et médullaire avec l'âge, associée à une baisse de la teneur en matière minérale de l'os cortical (Figure 34). Cransberg et al. (2001) indiquent que l'ostéoporose s'initie entre 16 et 31 semaines d'âge chez la poule pondeuse.

Selon Kim et al. (2012), la fragilisation de l'os est liée au fort niveau de production de la poule, ainsi qu'à la désynchronisation entre l'apport de Ca alimentaire le jour et la forte demande en Ca pour la production de la coquille la nuit. En effet, la nuit, lorsque la poule puise du Ca dans son os médullaire, elle dégrade également une partie de son os cortical. Contrairement à l'os médullaire, l'os cortical ainsi résorbé n'est pas reconstitué (Clunies et al., 1993). Sur le long terme, cela se traduit par une fragilisation de l'os dans son ensemble (Whitehead et Fleming, 2000). Pour illustrer cela, Kim et al. (2004) ont comparé le taux de cendres tibiales de poules en production avec ceux de poules ne pondant pas, dû à une incapacité à ovuler, mais présentant néanmoins des caractères sexuels secondaires (Tableau 4, *au verso*). Ces auteurs ont montré que le taux de cendres de l'os médullaire des poules ne pondant pas est plus important ($P < 0,05$). Ces mêmes auteurs ne montrent pas de différences en termes de taux de cendres entre des poules en production et des poules ne pondant pas et ne présentant pas de caractères sexuels secondaires. Cette expérimentation semble mettre en lumière le rôle prépondérant des stéroïdes sexuels dans la physiologie du tissu osseux, ainsi que l'effet de la ponte sur son intégrité. Eusemann et al. (2018), en inhibant le relargage de GnRH, ont montré que les poules ne pondant pas présentaient une plus faible incidence du taux de fracture entre 21 et 41 semaines d'âge. Pour compléter ces observations, Kim et al. (2005) montrent qu'il existe une corrélation négative forte entre le taux de cendre du tibia et le poids de la coquille (–0,45) et le taux de cendres de la coquille (–0,45).

À l'inverse, des études récentes montrent qu'il n'existe pas de corrélation entre les paramètres de minéralisation osseuse et le taux de ponte ou les paramètres de qualité de coquille (Castillo et al., 2021). Jansen et al. (2020) ne montrent pas de corrélation entre le taux de ponte et la force de fracture des os (tibiotarse et humérus), mais précisent que les paramètres osseux sont fortement héritables et, de fait, plutôt liés à la génétique de l'animal. Toscano et al. (2020), indiquent que le niveau de production à lui seul n'explique pas la fragilisation osseuse liée à

Tableau 4 ; Taux cendres des humérus, fémur et tibia de poules.[1]

	Taux de cendres (%)		
	Humérus	Fémur	Tibia
Contrôle[2]	62,5	62,3^{b}	64,6^{b}
Ovulation restreinte	63,8	68,8^{a}	68,0^{a}
Hors production	62,4	62,8^{b}	65,0$_{b}$

[1]Données tirées de Kim et al., (2004).
[2]Les poules « contrôle » sont des poules pondeuses en production ; les poules « ovulation restreinte » correspondent à des animaux exprimant des caractères sexuels secondaires, mais incapables d'ovuler suite à une mutation génétique ; les poules « hors production » sont des poules ne pondant pas et ne présentant pas de caractères sexuels secondaires.
[a-b]Les valeurs présentant des lettres différentes en exposant au sein d'une même colonne sont significativement différentes ($P < 0,05$), selon un test d'égalité des moyennes de Tukey HSD.

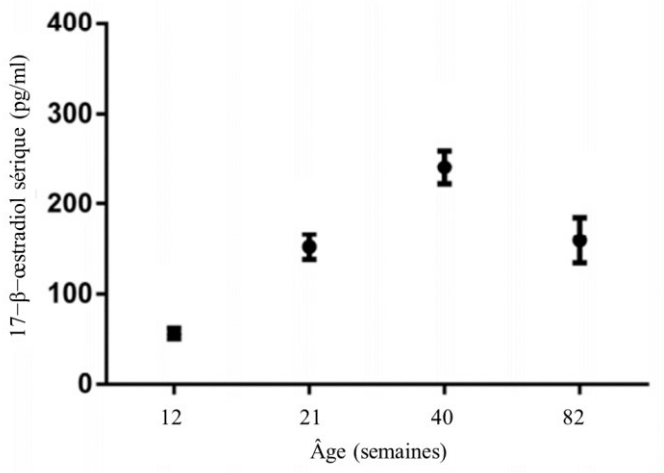


Figure 35 : Variation de la concentration en 17−β−œstradiol du sérum avec l'âge chez la poule pondeuse.
Tirée de Liu et al. (2018*a*).

l'âge. Outre l'âge au premier œuf, ces auteurs indiquent qu'il existe des prédispositions génétiques à la fragilité osseuse et que le manque d'exercice chez les poules élevées en cage accentue le problème de fragilité osseuse. Cette dernière hypothèse est partagée par d'autres auteurs (Whitehead et Fleming, 2000 ; Whitehead, 2004).

4.3 Des altérations du métabolisme phosphocalcique chez la poule pondeuse

La maturité sexuelle est, entre autres, marquée par une hausse importante des taux circulants d'œstrogènes chez la poule (Nys et al., 1986). En effet, peu avant la mise en place de la ponte, les taux de 17−β−œstradiol circulant sont multipliés par quatre. Cette hausse du taux d'œstrogènes circulant est responsable de la mise en place du cycle ovulatoire, ainsi que du développement de l'os médullaire, en association avec les androgènes (Whitehead, 2004). Tandis que certains auteurs indiquent que le taux de 17−β−œstradiol circulant est constant au cours du cycle de ponte (Braw-Tal et al., 2004) de 35 à 85 semaines d'âge, il est couramment accepté que ce dernier décroit avec l'âge chez la poule (Beck et Hansen, 2004). Ainsi, Liu et al. (2018*a*) montrent que le niveau d'œstrogènes sérique augmente de 60 % entre 13 et 40 semaines d'âge, puis diminue de 40 % entre 40 et 80 semaines d'âge (Figure 35). L'âge induit un fort stress oxydatif au niveau ovarien chez la poule, ce dernier serait en partie responsable de la baisse de la synthèse d'œstrogènes (Liu et al., 2018*b*). Outre le taux d'hormone circulant, Hansen et al. (2003) montrent une baisse de l'expression du récepteur-α aux œstrogènes entre 30 et 70 semaines d'âge. Whitehead et Fleming (2000) indiquent qu'une baisse du taux d'œstrogènes circulant induit une hausse de l'activité ostéoclastique et, par conséquent, une augmentation de la résorption osseuse chez la poule en fin de carrière. À titre de comparaison, chez la femme, la ménopause est caractérisée par un arrêt de la production d'œstrogènes, principal facteur endogène responsable de l'apparition de l'ostéoporose (Levin et al., 2018).

Chez les poules âgées, des modifications du métabolisme de la vitamine D_3 sont aussi mises en avant (Bar, 2008). Selon Abe et al. (1982), la baisse du taux circulant de 1,25−OH_2−D_3 entre 34 et 90 semaines d'âge serait dû à une baisse d'activité de la 1−α−hydroxylase. Cependant, selon Bar et Hurwitz (1987), les modifications du métabolisme de la vitamine D_3 seraient attribuables à une plus faible capacité de la poule à s'adapter aux variations de Ca alimentaire. Les œstrogènes augmentent l'absorption calcique en stimulant l'activation de la vitamine D_3 et l'expression de son récepteur, également en stimulant la synthèse de la calbindine−28KD duodénale (Hansen et Beck, 2004). Chez la poule âgée, une carence en Ca n'augmente pas le taux circulant de 1,25−OH_2−D_3 contrairement à la poule en pic de ponte (Bar et Hurwitz, 1987) : cette observation alimente l'hypothèse d'un défaut du métabolisme de la

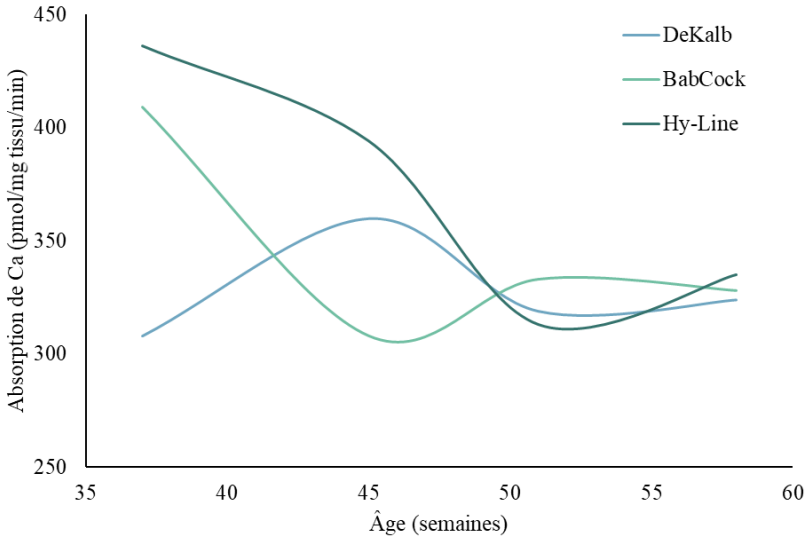


Figure 36 : Absorption de Ca en fonction de l'âge chez 3 souches de poule pondeuse.
Données tirées de Al-Bashtan et al. (1994).

vitamine D_3 avec l'âge chez la poule. Gloux et al. (2020*b*) décrivent une diminution de la concentration plasmatique en 1,25−OH_2−D_3 entre 23 et 90 semaines d'âge, en lien avec une augmentation de la 24−hydroxylase au niveau des reins.

Le vieillissement chez la poule pondeuse est marqué par une baisse de la capacité de l'intestin à absorber le Ca (Figure 36 ; Al-Bashtan et al., 1994). Wang et al. (2022) montrent une baisse de l'expression de l'ARNm et de la protéine calbindine−28KD entre 28 et 80 semaines d'âge dans les trois segments intestinaux. Néanmoins, l'effet de l'âge sur l'expression de la calbindine−28KD ne fait pas consensus. Par exemple, Yosefi et al. (2003), *via* une méthode ELISA, ne montrent pas de variation significative de la quantité de cette protéine au niveau duodénal entre 35 et 90 semaines d'âge. Plus récemment, San et al. (2021) ne montrent pas de variation de l'expression du gène de la calbindine−28KD entre 43 et 72 semaines d'âge mais notent cependant une hausse de 40 % de l'expression de ce gène dans le duodénum entre 23 et 43 semaines d'âge. Si le cas de la calbindine−28KD ne fait pas consensus, ces auteurs semblent en accord sur la baisse de l'expression de PMCA 1b avec l'âge. Wang et al. (2022) précisent que l'expression de la protéine PMCA 1b diminue dans tous les segments intestinaux avec l'âge. PMCA 1b est une pompe ATP−dépendante assurant le transport du Ca de l'entérocyte au plasma, au niveau de la membrane cellulaire. Enfin, Gloux et al. (2020*b*) montrent une baisse de l'expression de gènes impliqués dans l'absorption active et passive du Ca avec l'âge. Cette baisse de capacité de l'intestin à absorber le Ca favorise une plus forte mobilisation osseuse du Ca.

Considérés ensemble, ces résultats semblent indiquer une altération du métabolisme calcique chez la poule en fin de période productive, en lien avec une diminution du métabolisme de la vitamine D_3. Ce métabolisme, rendu moins efficace, contraint l'animal à puiser encore plus dans ses réserves osseuses, accentuant de ce fait les troubles osseux liés à l'âge et le risque de fracture.

OBJECTIFS DE THÈSE

Afin d'assurer le dépôt quotidien de plus de 2 g de Ca sur la coquille, la poule détourne l'ensemble de son métabolisme (Bar, 2009). Ce Ca est majoritairement apporté par l'alimentation (~ 60 %) et disponible au cours de la phase lumineuse. Cependant, en raison d'une désynchronisation entre l'apport de Ca alimentaire le jour et le besoin en Ca pour la calcification de la coquille la nuit, la poule puise le Ca dans ses réserves osseuses (Nys et Leroy, 2018). La mobilisation osseuse du Ca peut représenter jusqu'à 40 % du Ca déposé sur la coquille. Cette mobilisation entraine la dégradation de l'os cortical, qui fragilise le squelette dans son ensemble, et augmente l'incidence de l'ostéoporose en élevage (Whitehead et Fleming, 2004). Dans l'os, Ca et P sont complexés sous forme de cristaux d'hydroxyapatite, menant à la libération conjointe de Ca et P durant la résorption osseuse. Le ratio Ca : P de l'os étant de 2,2, la mobilisation maximale de 0,88 g de Ca entraine une libération maximale de 0,4 g de P. Les dynamiques d'utilisation du Ca et du P sont différentes au cours de la journée. Le P est principalement requis en première partie de journée pour reconstituer les réserves osseuses, alors que le Ca est principalement requis en seconde partie de journée pour assurer la calcification de la coquille. En raison de ce décalage, le P libéré au cours de la nuit est excrété *via* les urines, ce qui représente un enjeu environnemental pour la production.

Ces observations mettent en lumière le rôle fondamental de la nutrition pour assurer l'intégrité du métabolisme phosphocalcique de la poule pondeuse. La nutrition doit, tout d'abord, répondre aux besoins en minéraux de la poule. Si le besoin en Ca semble connu *i.e.*, 55 mg/kg PV pour les besoins d'entretien (Kebreab et al., 2009) et 2,2 g pour la production de l'œuf (Jonhston et Gous, 2007), les besoins en P semblent être surestimés. En effet, les besoins en P pour l'entretien et la production de l'œuf sont faibles : 14 mg/kg PV (Kebreab et al., 2009) et 120 mg (Suttle, 2010), respectivement. Néanmoins, la mobilisation osseuse du Ca entraine une modification des besoins en P chez la poule pondeuse (Nys, 2010), complexifiant la définition du besoin en P. Ceci a pour conséquence d'augmenter les marges de sécurité de l'incorporation du P dans l'aliment. La nutrition doit également adapter les apports et la forme de présentation de Ca et P à la dynamique de leur utilisation par l'animal en vue de réduire la mobilisation osseuse au cours de la nuit. Synchroniser les apports de minéraux aux besoins de la poule permettrait de prévenir les troubles osseux liés à l'âge ainsi que de limiter les rejets de P dans l'environnement. Dans ce contexte, l'utilisation digestive de ces minéraux, contrôlée par différents processus représente une étape clé de leur utilisation globale par l'animal. Aussi, une meilleure compréhension des mécanismes de façon intégrée apparait nécessaire.

L'objectif de ce doctorat est d'améliorer les connaissances et la compréhension des mécanismes contrôlant l'utilisation digestive de Ca et de P chez la poule pondeuse, en vue d'optimiser la qualité du squelette et de la coquille au cours du cycle de production, tout en limitant les rejets environnementaux de P. L'utilisation digestive des minéraux peut être décomposée en 4 déterminants majeurs : 1) la solubilisation des éléments minéraux rendant disponible le Ca et le P pour l'animal, 2) la formation de complexes entre le Ca et le P, ou avec d'autres éléments de la ration, rendant indisponible les nutriments pour l'animal, 3) la vitesse de transit des minéraux dans les différents organes digestifs, dépendant majoritairement de la forme d'apport du minéral, et 4) l'absorption des minéraux au niveau intestinal dépendant fortement du statut physiologique de l'animal. Finalement, la définition de l'utilisation digestive du Ca et du P apparait multifactorielle, dépendant d'éléments extrinsèques à l'animal (*e.g.*, la composition de l'aliment, la conduite d'élevage, *etc.*) et intrinsèques à l'animal (*e.g.*, son statut physiologique, son âge, sa génétique, *etc.*). L'intégration de ces facteurs de variation dans un modèle mathématique compartimental et mécaniste, permettant une représentation globale des flux de Ca et P dans le tractus digestif de la poule pondeuse à l'échelle de la journée, apparait pertinent. Une meilleure compréhension de la dynamique d'utilisation digestive du Ca et du P est la première étape avant de proposer des solutions nutritionnelles (ou autres) permettant d'optimiser l'utilisation des minéraux à l'échelle de la journée, et à terme d'améliorer la fin de carrière de la poule pondeuse.

Un premier objectif de ce travail a été d'identifier et de hiérarchiser les principaux leviers nutritionnels contrôlant l'utilisation du Ca et du P chez la poule. L'utilisation de Ca particulaire et l'incorporation de phytase microbienne dans l'aliment ont ainsi été identifiés comme étant deux leviers nutritionnels majeurs. Si les effets du Ca particulaire sur la qualité de la coquille et la minéralisation osseuse semblent reconnus, ils demeurent néanmoins variables d'une étude à l'autre. De plus, l'effet de Ca particulaire sur l'utilisation digestive des minéraux (temps de transit et solubilisation) n'est pas quantifié. Concernant la phytase microbienne, de nombreuses données existent chez le poulet de chair décrivant son effet sur la digestibilité pré-cæcale de P mais peu sont disponibles chez la poule pondeuse. Le temps de transit, le pH et les quantités de Ca de l'aliment étant différents entre le poulet de chair et la poule pondeuse, les mécanismes d'utilisation sont supposés distincts. En vue d'améliorer nos connaissances quant à l'effet de ces deux leviers sur les mécanismes digestifs et de quantifier l'effet de leur incorporation sur l'utilisation des minéraux par l'animal (paramètres de qualité de coquille et

de minéralisation osseuse), des méta-analyses de données issues de la littérature ont été réalisées.

Le Ca présente une forte propension à former des complexes insolubles avec le P phytique, ce qui altère l'utilisation digestive du Ca et du P et limite l'efficacité de la phytase microbienne chez le poulet de chair. L'incorporation de Ca particulaire, lentement solubilisé, pourrait donc limiter ce phénomène chez la poule pondeuse. Le second objectif de ce travail de thèse a été d'étudier la relation entre le Ca particulaire et l'efficacité de la phytase microbienne et de démontrer l'hypothèse de la formation de complexes Ca–acide phytique chez la poule pondeuse. Pour ce faire, une expérimentation *in vivo* de court terme a été réalisée. Dans cette expérimentation, 72 poules pondeuses ont été réparties dans quatre régimes expérimentaux suivant un design factoriel en 2 × 2 avec deux niveaux d'incorporation de Ca particulaire et deux niveaux de phytase microbienne/P*dispo*. Cette étude visait à étudier l'interaction entre la forme de présentation du Ca et la phytase microbienne sur les paramètres d'efficacité digestive ainsi que sur les performances de production, la qualité de la coquille et la minéralisation osseuse. L'objectif de cette étude était également d'évaluer les paramètres mécanistes de l'utilisation digestive du Ca et du P, tels que les temps moyen de rétention et le coefficient de digestibilité par segment en vue de valider ou de paramétrer certaines étapes clés du modèle.

Enfin, l'ensemble des données issues de la littérature et de l'essai ont été intégrées au fur et à mesure dans un modèle mécaniste compartimental, simulant les différentes étapes de l'utilisation digestive du Ca et du P chez la poule pondeuse. Il s'agit d'un travail itératif, dans lequel chaque étape est validée et complétée par l'étape suivante. Ce modèle a pour objectif de prédire l'utilisation digestive des minéraux, en considérant leur forme dans l'aliment et le statut physiologique de l'animal. Ce modèle permet une représentation globale des flux de Ca et de P à l'échelle de la journée (pas de temps = 1 minute). Il s'agit d'un modèle de recherche qui permettra de tester différentes stratégies alimentaires et de prédire leurs conséquences sur l'utilisation des minéraux par la poule pondeuse.

Ainsi, ce manuscrit se compose de quatre chapitres :

- Les travaux de méta-analyse feront l'objet du premier chapitre, constitué de deux sous-parties. La première sous-partie traitera de l'effet de la taille des particules de carbonate de Ca sur des paramètres de production (taux de ponte, poids des œufs), de qualité de coquille (épaisseur, gravité spécifique) ou de minéralisation osseuse (force de fracture des tibias). Cette méta-analyse fera le lien entre les différents phénotypes et l'utilisation

digestive du Ca par l'animal. La seconde sous-partie traitera de l'effet de l'incorporation de la phytase microbienne et du niveau de PNP sur des paramètres de digestibilité pré-cæcale du P, de production, de qualité de coquille et de minéralisation osseuse. Ce travail mettra en évidence l'interaction entre l'efficacité de la phytase microbienne et le niveau de PNP alimentaire.

- Le second chapitre sera dédié à l'étude de l'interaction entre la taille des particules de carbonate de Ca et la phytase microbienne. Il reposera sur l'expérimentation *in vivo* conduite au cours de ce doctorat. Au cours de ce chapitre, nous mettrons en évidence la formation de complexe Ca−acide phytique et leurs conséquences sur la digestibilité des minéraux, ainsi que sur les paramètres de production, la qualité de coquille et la minéralisation osseuse.
- Le troisième chapitre sera dédié à la quantification et à l'estimation de certains paramètres mécanistes de l'utilisation digestive des minéraux face à la phytase microbienne et au Ca particulaire. Au cours de ce chapitre nous évoquerons notamment plus en détail le concept de temps moyen de rétention dans les différents segments du tractus gastro-intestinal.
- Finalement, le dernier chapitre de ce manuscrit explicitera le développement du modèle mathématique mécaniste de l'utilisation digestive du Ca et du P chez la poule pondeuse. Ce chapitre décrira la structure du modèle, le paramétrage des équations et les étapes de validation du modèle (analyse de la sensibilité, comportement du modèle et évaluation de la qualité de prédiction).

Enfin, l'ensemble de ces résultats seront considérés dans une discussion générale.

RÉSULTATS DE THÈSE

CHAPITRE 1

Caractérisation des principaux leviers alimentaires permettant d'optimiser l'utilisation digestive du calcium et du phosphore

Effect of limestone particle size on performance, eggshell quality, bone strength, and in vitro/in vivo solubility in laying hens: a meta-analysis approach.

Hervo, F., A., Narcy, Y., Nys, and M.-P., Létourneau-Montminy. 2022. Poult. Sci. 101: 101686.

Meta-analysis of dietary non-phytate phosphorus level, microbial phytase incorporation and age on phosphorus utilization in laying hens

F. Hervo, A. Narcy, and M.-P. Létourneau-Montminy. Données non publiées

Partie 1 : Effect of limestone particle size on performance, eggshell quality, bone strength, and *in vitro*/*in vivo* solubility in laying hens: a meta-analysis approach

Hervo, F., A., Narcy, Y., Nys, and M.-P., Létourneau-Montminy. 2022. Effect of limestone particle size on performance, eggshell quality, bone strength, and *in vitro*/*in vivo* solubility in laying hens: a meta-analysis approach. Poult. Sci. 101: 101686.

https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101686

Publié en avril 2022

Résumé

La production de la coquille d'œuf requiert une quantité importante de Ca ; en effet, plus de 2 g seront transférés vers l'utérus chaque jour. Ce transfert massif de Ca se déroule principalement en fin de journée et au cours de la période sombre (*i.e.*, période sans éclairement), lors de la phase active de calcification. Durant cette période de 12 heures, la poule dépose 0,13 g de Ca par heure sur la coquille. Au cours de la période sombre, la poule n'a pas accès à l'aliment, de fait, il existe un décalage temporel entre le besoin important en Ca pour la coquille et l'apport de Ca alimentaire au cours des heures d'éclairement. Du fait de ce décalage, la poule puise le Ca dans son os médullaire, un type d'os spécifique aux oiseaux femelles et constituant une réserve transitoire de Ca. Les ostéoclastes résorbant l'os médullaire n'étant pas spécifique de ce type d'os, l'os cortical assurant la rigidité du squelette est résorbé également. Alors que l'os médullaire est reconstitué chaque jour, l'os cortical ne l'est pas. Avec l'âge, cette situation conduit à une fragilisation du squelette induite par une perte d'os structurel au profit de l'os médullaire. Ce phénomène correspond à l'ostéoporose et représente un véritable enjeu pour l'élevage de poule pondeuse.

Dans ce contexte, l'incorporation de Ca particulaire apparait être une solution efficace pour pallier les troubles osseux liés à l'âge. Le Ca particulaire, ou Ca grossier (≥ 0,8 mm) est retenu plus longtemps dans le gésier ce qui permet une diffusion plus lente de Ca soluble dans l'intestin au cours de la nuit comparativement au Ca fin (< 0,8 mm). Ainsi, l'utilisation de Ca particulaire assurerait une plus longue disponibilité du Ca alimentaire au cours de la période sombre, limitant la mobilisation osseuse. Au fil de la carrière de la poule, cette stratégie alimentaire permettrait de réduire les troubles osseux liés à une mobilisation répétée et importante du Ca. De très nombreuses études montrent l'effet du Ca particulaire sur les paramètres de minéralisation osseuse, ainsi que sur les paramètres de production ou de qualité de coquille. Néanmoins, les réponses à ce facteur sont variables d'une étude à l'autre.

L'objectif de cette étude était donc d'établir les lois de réponse des paramètres de production, de qualité de coquille et de minéralisation osseuse à la taille des particules de carbonate de calcium. Ce travail avait également pour objectif d'identifier les données qui permettront de paramétrer les équations définissant l'utilisation digestive du Ca particulaire, notamment concernant la solubilisation des particules de $CaCO_3$. Afin de répondre à ces différents objectifs, l'utilisation de la méta-analyse apparaissait pertinente, l'utilisation de modèles linéaires à effet aléatoire permettant de comparer les données tirées de différentes

études en considérant les spécificités de chaque étude. Cette approche a permis de quantifier plus finement l'effet de la taille des particules de carbonate de Ca sur les paramètres d'intérêt.

Pour ce travail, 58 articles publiés dans des journaux à comité de relecture et traitant de l'effet de la taille des particules de carbonate de Ca chez la poule pondeuse ont été sélectionnés. Les données portant sur l'effet de la taille des particules sont nombreuses. Pour ce travail, seules les études dans lesquelles le $CaCO_3$ était la source de Ca ont été sélectionnées. De plus, les poules devaient être en premier cycle de production (entre 18 et 90 semaines d'âge) et recevoir une alimentation couvrant les besoins théoriques de Ca et de P. L'étude menée ici montre que la solubilisation *in vitro* des particules de $CaCO_3$ diminue avec leur taille ($P < 0,001$) alors qu'inversement la solubilisation *in vivo* augmente ($P < 0,001$). De par son pH acide, la phase gastrique est essentielle pour la solubilisation du Ca. Le pylore assure une diffusion sélective des fines particules, ce qui implique que les larges particules sont retenues plus longtemps dans le gésier. De plus, les larges particules stimulent les sécrétions acides du proventricule et l'activité motrice du gésier. L'ensemble de ces processus favorisent la solubilisation du Ca particulaire. Ces données de solubilisation serviront à paramétrer les équations du modèle mécaniste. Cette étude indique également que l'augmentation de la taille des particules de carbonate de Ca induit une amélioration des paramètres de qualité de la coquille ($P < 0,001$) sans modifier les paramètres de production. Enfin, cette étude montre que la force de fracture du tibia baisse avec l'âge et que l'incorporation de $CaCO_3$ particulaire atténue cet effet (Âge × Taille de particule ; $P < 0,001$).

Abstract

Numerous publications over the past five decades have investigated the effect of limestone particle size (**LmPS**) on production performance, bone mineralization, and limestone solubilization in laying hens. Coarse limestone particles have been shown to improve eggshell quality and bone mineralization. However, there is a large variability of responses in birds to this factor, indicating the need to better quantify the effect of modulating factors related to coarse particles that could explain this variability. The objective of this meta-analysis was to study the impact of LmPS on the digestive and metabolic fate of Ca to optimize calcium utilization by laying hens. Fifty-eight papers published between 1971 and 2019, including 71 experiments were included in this study. Four categories of dependent variables were identified: Ca solubility, production performance, eggshell quality, and bone strength. Independent variables tested were LmPS and hen age. Results showed that the *in vitro* solubilization of limestone linearly decreased ($P < 0.001$; $R^2 = 0.91$) while *in vivo* solubilization linearly increased with LmPS ($P < 0.001$; $R^2 = 0.91$). Coarse limestone particles were retained longer in the gizzard ($P < 0.001$; $R^2 = 0.60$), inducing higher solubilization by gastric juices than fine limestone. LmPS showed no effect on production performance while all eggshell quality parameters increased with LmPS ($P < 0.001$; $R^2 = 0.91$): increasing specific gravity by 0.8 %, eggshell thickness by 1.1 %, and eggshell breaking strength by 3 % when increasing from 0.15 mm to 1.5 mm. LmPS had an effect on tibia breaking strength dependently of age (Age × LmPS, $P < 0.001$; $R^2 = 0.89$): coarse limestone particles increased tibia breaking strength with aging compared to fine limestone particles. The current study renders it possible to quantify the effects of age and LmPS on eggshell quality and tibia breaking strength. This work showed an interaction between eggshell quality and bone strength and showed that LmPS increases bone strength in older laying hens.

Introduction

Eggshell formation takes place in the shell gland during a daily cycle of mineralization (Nys et al., 2010). The hen has to export two grams of calcium (**Ca**) daily into the eggshell that is mainly composed of calcium carbonate (95 %). Part of the Ca is provided by the diet (60–70 %), but due to an offset of Ca intake during the light period and the Ca requirement to produce the eggshell during the dark period, another part of Ca is mobilized from bone, especially from a specific tissue: medullary bone (Nys, 2017). This type of bone, produced at the onset of sexual maturity (Hadley et al., 2016), represents a transitory and labile Ca reserve (Rodriguez-Navarro et al., 2018). As osteoclasts resorb medullary bone, cortical bone is also

degraded over time, leading to bone weakness with aging (Kim et al., 2005). This weakness increases the incidence of osteoporosis in layer flocks and causes economic losses for producers and welfare issues (Whitehead and Fleming, 2000). Moreover, with aging, laying rate decreases by 13.5 % during the production period (Herrera et al., 2018), and eggshell quality is reduced from 49 weeks onward (Wistedt et al., 2019). Thus, the rate of cracked eggs increases, causing economic losses for producers. With aging, the capacity of intestinal absorption of Ca decreases (Beck and Hansen, 2004), associated with a decrease in plasma 1,25−OH_2−D_3 (Abe et al., 1982). Indeed, 1,25−OH_2−D_3 has been clearly shown to stimulate Ca absorption by stimulating calbindin expression in the intestine (Bar, 2008).

One of the solutions to reduce the decrease in eggshell quality and bone strength with aging is to increase the use of coarse limestone particles (*i.e.*, > 0.8 mm). There is no consensus according the optimal ratio of coarse to fine limestone with age. However, a ratio of 75 % coarse: 25 % fine is often used in old hens. Several authors have shown a positive effect of coarse limestone on eggshell quality (Jardim-Filho et al., 2005*a*; Guo and Kim, 2012) and bone health in laying hens (Jardim-Filho et al., 2005*b*; de Araujo et al., 2011). According to Rao and Roland (1990), coarse limestone particles are retained longer in the gizzard and provide a greater amount of soluble Ca and for an extended time during the dark period compared to fine limestone particles. Additionally, hens fed with coarse limestone particles showed a continuous soluble Ca diffusion during the night and reduced their bone Ca mobilization (Fleming et al., 2006). Thus, coarse limestone particles improve the synchronization between the high Ca requirements to produce the eggshell and the dietary Ca supply.

The beneficial effects of coarse limestone particles on egg production, eggshell quality, and bone strength have been demonstrated in numerous publications, but results remain variable. In order to better quantify these effects and highlight the modulating factors, a meta-analysis tool has been used to describe to what extent coarse limestone particles can modulate eggshell quality and bone strength.

Material and methods

Data sourcing

Studies used in this meta-analysis were found on several databases: CAB Abstracts, Google Scholar, MEDLINE, and Food Science and Technology Abstracts by using the following keywords: *calcium particle size*, *ground limestone*, *laying hen*, *hen*, *poultry*, *production performance*, *egg quality*, *eggshell quality*, *bone quality*, *bone strength*,

digestibility, and *solubilit*y. Further publications were identified in the references of previous articles. This resulted in 82 publications which described the effect of calcium particle size on distinct parameters in poultry.

Inclusion criteria

Only publications on laying hens and with limestone as a Ca source were retained (Figure 37). As there is no consensus, fine calcium particles (**FP**) were defined lower than 0.8 mm, and large calcium particles (**LP**) were greater or equal to 0.8 mm, based on Rao and Roland (1990). Variations in dietary levels of Ca and phosphorus (**P**) within and between publications were low and were mostly due to the variation of age of animals between publications. Therefore, based on the NRC (1994), only studies in which animals received enough dietary Ca and P to cover their requirements, according to their age, were kept (*i.e.*, Ca between 3.2 and 4.5 % and total P between 0.36 and 0.72 %). All publications on the effect of Ca particle size in hens, from 18 weeks to 90 weeks were retained. The final dataset included 58 publications published between 1971 and 2019.

Three different databases were built. The first included data on *in vitro*/*in vivo* solubilization and gizzard retention. This database had thirteen publications published between 1971 and 2011; eight publications dealt with *in vitro* solubilization, five with *in vivo* solubilization, and only two with both. In all publications, the in vitro solubilization was determined using the method described by Zhang and Coon (1997*b*). The *in vivo* solubilization was calculated according to the method of Rao and Roland (1989). The second database included data on performance and eggshell quality and had forty-two publications published between 1971 and 2019. The third database included data on tibia breaking strength, comprising ten publications published between 1990 and 2015.

Calculations

A few studies (about 24 %) tested the effect of Ca particle size crossed with different levels of inclusion of large particles in dietary treatments. Additionally, several authors gave just a range of Ca particle sizes. In order to standardize the limestone particle size within and between publications, the mean calcium particle size and the proportion of fine and coarse particles in the limestone supply were considered. Limestone particle size (**LmPS**) was calculated as follow:

$$LmPS = \big(mean\ coarse\ limestone\ particle\ size\ (mm) \times proportion\ of\ coarse\ limestone\ (\%)\big) + (mean\ fine\ limestone\ paritlce\ size\ (mm) \times proporation\ of\ fine\ limestone\ (\%))$$

Tibia breaking strength is an indicator of bone mineralization frequently measured due to its link with bone fracture risk (Kim et al., 2012). However, several studies measured the force at yield stress (kg), while others measured the stress (kg/cm²). To standardize these variables, all breaking strength data were converted into force at yield stress (kg) by using the method of Crenshaw et al. (1981):

$$Stress\ (kg/cm^2) = \frac{F \times L \times C}{4 \times MI}$$

with F the force at yield stress (kg), L the length between supporting fulcra points (cm), C the ½ diameter of bone parallel to force applied (cm), and MI the area moment of inertia (cm^4).

Statistical analysis

Dependent variables measured in publications were classed into four categories (Tableau 5): 1) Fate of coarse limestone in the digestive tract: *in vitro* and *in vivo* solubility (%) and quantity of Ca recovered after 24 h in the gizzard (g); 2) Production performance: laying rate (%) and egg weight (g); 3) Eggshell quality: specific gravity, eggshell thickness (mm), and eggshell breaking strength (kg); 4) Bone strength: tibia breaking strength (kg).

Each dependent variable was analyzed with a linear mixed model as follows:

$$Y_{ij} = B_0 + S_i + B_iX_{ij} + b_iX_{ij} + e_{ij}$$

with Y_{ij} the dependent variable of the jth treatment of the ith study, B_0 the intercept of the study, X_{ij} the independent variable of the jth treatment of the ith study, S_i the random effect of the study on the intercept, b_i the random effect of the study on the regression coefficient, and e_{ij} the residual error unexplained by the model. For each of the dependent variables, linear and quadratic effects of particle size and age were tested in order to evaluate the behavior of the model and its tendency to plateau ($LmPS^2$, Age^2). The interaction LmPs × Age was also tested. Statistical analysis was conducted with R open-source software, version 3.02 (R core team, 2013). Linear mixed model studies were performed with the *lme* function of the package *nlme*, version 3.1–117 (Pinheiro et al., 2015).

Results

Fate of coarse limestone in the digestive tract

In vitro solubility significantly decreased with LmPS ($P < 0.001$; Tableau 6). As an example, *in vitro* solubilization of a limestone particle considered coarse (1.5 mm) was 17 % less than with a finer limestone particle (0.15 mm). *In vivo* solubility significantly increased ($P < 0.01$; Tableau 6) with increasing LmPS; *in vivo* solubilization of coarse limestone (1.5 mm) was 8 % greater than fine limestone (0.15 mm). Statistical analysis of the database showed that, after 24 h, gizzard Ca retention was increased with LmPS ($P < 0.001$). The quantity of Ca recovered in the gizzard after 24 h linearly increased between 0.10 g for fine particles (0.15 mm) and 5.2 g for coarse particles (1.5 mm), and reached a plateau at around 2 mm.

Production performance

The interaction between LmPS and age was tested and showed no significant effect on egg production or on egg weight. LmPS showed no significant effect on egg production or egg weight (Tableau 7). As expected, age showed a significant effect on egg production (Age and Age²; $P < 0.001$) with maximum laying at around 30 to 35 weeks and a decrease of 10 % of laying rate from 35 to 80 weeks, while before the twenty-fifth week the laying rate increased linearly until the laying peak (Figure 38). Age also influenced egg weight ($P < 0.001$). As an example, egg weight increased by 4.77 g from 35 to 80 weeks and reached a plateau at around 80 weeks (Figure 38).

Eggshell quality

The interaction between LmPS and age showed no significant effect on specific gravity, eggshell breaking strength, or eggshell thickness (Tableau 8). Current models showed that specific gravity, eggshell thickness, and eggshell breaking strength linearly increased with LmPS ($P < 0.001$). For example, increasing LmPS from 0.15 to 1.5 mm resulted in an increase of 0.08 %, 1.1 %, and 3.0 % of specific gravity, eggshell thickness, and breaking strength, respectively. Age showed a significant linear effect on specific gravity ($P < 0.001$; Tableau 8); it decreased by 0.6 % from 35 to 70 weeks. Age showed no significant effect on eggshell thickness or eggshell breaking strength.

Tibia Breaking strength

The interaction LmPS × Age showed a significant linear effect on tibia breaking strength ($P < 0.01$; Tableau 9). Tibia breaking strength significantly decreased with age ($P < 0.05$;

Figure 39), but this decrease was more pronounced with a smaller particle size. For example, tibia breaking strength was decreased by 30 % and 24 % from 35 to 80 weeks of age when hens received 0.15 mm and 1.5 mm limestone, respectively.

Discussion

From in vitro to in vivo solubilization of limestone

The present results show that *in vivo* solubility increased by 8 % when LmPS increased from 0.15 mm to 1.5 mm while the opposite was observed with *in vitro* solubility, with a decrease of 17 % from 0.15 mm to 1.5 mm. These results are in accordance with Zhang and Coon (1997*a*) who compared the *in vivo* and *in vitro* solubilization of limestone particles. They showed that 4 mm limestone particles increased *in vivo* solubilization by 10 % and decreased *in vitro* solubilization by 50 % compared to 0.65 mm limestone particles. Note that the term "*in vivo* solubilization" is commonly used in publications to describe the chemical reaction of solubilization of limestone in the gizzard. However, this term confounded the chemical reaction of solubilization and the physical disappearance of limestone from the gizzard by passing the pylorus. Here, we distinguish *in vivo* solubilization which describes the chemical process, and mean retention time which describes the physical one. The current observations can be explained by two main effects. Firstly, coarse limestone particles are specifically retained in the gizzard (Scott et al., 1971), they also show a slower disappearance compared to fine limestone. Rao et al. (1992) distributed 10 g of limestone with 25 % of fine particles (≤ 0.84 mm) and 75 % of coarse particles (comprised between 0.84 mm and 4 mm, with an average of 1.56 mm) and showed that four hours after ingestion, 43 % of coarse limestone particles had passed through the gizzard *vs.* 68 % of fine limestone particles. Based on these data, we calculated the mean retention time of coarse and fine limestone particles in the gizzard, according to the calculation method of van der Klis et al. (1990) in broilers. Coarse limestone particles showed a slower disappearance in the gizzard, compared to fine limestone particles; the mean retention time was 345 min and 64 min for coarse and fine limestone particles, respectively. Secondly, coarse particles stimulate acidic secretion by the proventriculus. Jimenez-Moreno et al. (2009) showed that the gizzard pH decreases with the size of cereals. Svihus (2011) noted that whole or coarsely ground cereals added to the diet decreased the gizzard pH by 0.2 to 1.2 units. The decrease in gizzard pH is due to a stimulation of the H^+/K^+-ATPase in the proventriculus (Guinotte et al., 1995), which secretes hydrochloric acid. Guinotte et al. (1993) showed that coarse limestone inclusion (> 1.2 mm) in the diet enhanced the H^+/K^+-ATPase activity by 11 %. The stimulation of the pump is mediated by mechanoreceptors (Duke, 1986) located in

the crop (Ruoff and Sewing, 1971). Thus, stimulation of acidic secretion by the coarse particles creates a favorable environment for limestone solubilization. Due to a transitory accumulation of coarse particles in the gizzard, coarse limestone particles stay longer in an acidic environment, and therefore, show a more complete solubilization compared to fine limestone particles which pass rapidly through the gizzard (Bo Linn et al., 1994). This effect is not described in the crop where limestone particles pass through independently of their size (Rao et al., 1992).

Performance and eggshell quality

As expected, LmPS did not affect production performance. In all experiments of this meta-analysis, laying hens received enough energy and nutrients to cover their requirements. The current study showed that egg production decreased with age while egg weight increased. These results agree with the observations of Tumova and Gous (2012) who showed a 13 % decrease of laying rate from the onset of laying to the end of the laying cycle, associated with an increase in egg weight of 9.9 g during the same period. After the peak production period, the sequence length (*i.e*., the period during which the hen lays one egg a day between two rest days) decreases and time between two sequences increases (Johnston and Gous, 2003). These subsequent effects partly explain the decrease of laying rate with age (Sauveur, 1988). The increase in egg weight is due to the increase of the relative proportion of the yolk during the laying cycle (Travel et al., 2010).

The present study showed that LmPS linearly improved eggshell quality. Lukic et al. (2009) showed that the response of the eggshell to coarse limestone particles is greater if the hen is fed a suboptimal Ca level. The enhancement of eggshell quality described in this meta-analysis could be due to the longer retention of coarse particles in the gizzard inducing an extended diffusion of soluble Ca during the night. As eggshell formation lasts approximatively 20 hours and mainly takes place during the night, coarse limestone particles reduce desynchronization between availability and requirement of Ca for the eggshell (Saki et al., 2019). Additionally, laying hens receiving coarse limestone mobilize less bone Ca, and also P, than hens receiving fine limestone, in accordance with Gloux et al. (2020).

The present study did not show a decrease in eggshell quality with aging. It is noteworthy that the genetic selection has contributed to a relative flattening of the egg weight curve as the hen ages (Bain et al., 2016). Egg weight being correlated negatively with the eggshell strength (Johnston and Gous, 2007), thus the genetic selection may have an impact on

the eggshell quality. As there are numerous old publications, it cannot be excluded that the genetic selection has masked the age effect. However, the decrease in eggshell quality with aging is a well-known phenomenon. These results are explained by the meta-design in which the variability within-experimentation is based on LmPS. Zita et al. (2012) observed a decrease of 7 % of eggshell thickness and 8 % of eggshell breaking strength from 30 to 60 weeks. The rate of cracked eggs increases throughout the laying period by up to 16 % (Travel et al., 2010). The decrease in eggshell quality with age seems to be partly due to a decrease in the calcium absorption capacity of the intestine (Al-Batshan et al., 1994; Franco-Jimenez and Beck, 2005) and to a decrease in the Ca transfer capacity of the shell gland to eggshell (Navickis et al., 1979). These decreases could be attributed to a decrease in plasma 1,25−OH_2−D_3 and kidney 1-α-hydroxylase with age (Abe et al., 1982; Bar and Hurwitz, 1987).

Tibia breaking strength

This meta-analysis showed that bone breaking strength quadratically decreased with age, and that the incorporation of coarse limestone particles lessened this decrease. The impact of age on bone strength is well known (Whitehead and Fleming, 2000; Yamada et al., 2021). Rath et al. (2000) showed a decrease of tibia breaking strength by 11 % from 35 to 55 weeks. High laying rate associated with an offset of calcium intakes and needs during the dark period induce heavy bone calcium mobilization (Kim et al., 2012). This bone mobilization also affects cortical bones and thus, increases the incidence of osteoporosis with age (Whitehead, 2004). Additionally, with aging, the Ca absorption capacity of the intestine decreases (Franco-Jimenez and Beck, 2005), contributing to the deterioration of bone integrity. Coarse limestone particles provide soluble calcium later during the dark period to supply the eggshell formation (Rao et al., 1992) and reduce the desynchronization between the Ca supply and demand to produce the eggshell. Finally, coarse limestone particles reduce bone mobilization (Fleming, 2008). Thereby, osteoclast bone resorption is reduced when the hen is fed with coarse limestone particles (Guinotte and Nys, 1991) and inversely, fine limestone particles stimulate bone resorption (Gloux et al., 2020). This leads to increased bone breaking strength with coarse limestone particles in accordance with our results (Figure 2). De Witt et al. (2009) did not observe a coarse limestone effect on tibia breaking strength before 66 weeks. Xavier et al. (2015) indicated a positive effect of coarse limestone on tibia breaking strength from 36 weeks to 90 weeks. Although authors do not agree on the pivotal age after which coarse limestone had a significant positive effect, they all reported a significant positive effect at the end of the laying period.

At 70 weeks of age, coarse limestone particles (1.5 mm) increased tibia breaking strength by 7.6 % compared to fine limestone particles. With aging, daily bone resorption to produce the eggshell induces bone weakness, because of a gradual loss of cortical bone without replacement (Whitehead, 2004). This could suggest a prioritization for eggshell production at the expense of bone integrity. However, the relationship between bone integrity and eggshell quality remains unclear. Sauveur et al. (1983) showed that eggshell weight decreased with bone P*i* mobilization (Y = 5.74 − 0.0066 × bone P*i* mobilization). Based on works of Miles and Harms (1982), the increase in plasma P*i* following bone mobilization could disturb the Ca deposition on the eggshell in utero. Furthermore, increased plasma P*i* due to bone resorption induces the secretion of FGF23, a phosphatemia regulator, by osteocytes and osteoblasts (Ren et al., 2017). FGF23 achieves negative feedback on bone resorption (Erben and Andrukhova, 2017) and reduces Ca absorption in the intestine by inhibiting 1,25−OH_2−D_3 production in the kidney (Ren et al., 2017). Therefore, FGF23 limits the Ca uptake from intestine and bone to the eggshell. To support this hypothesis, Keshavarz and Austic (1990) showed that high dietary phosphorus levels (*i.e.*, 1 %) led to decreased eggshell quality. According to Kim et al. (2005), high eggshell quality is associated with poorer bone quality, because hens that show high eggshell Ca deposition also show high bone Ca mobilization, increasing the incidence of fractures. Moreover, Eusemann et al. (2018) showed that the bone fracture incidence was reduced in a low-producing line compared to a high-producing line Conversely, Alfonso-Carrillo et al. (2021) did not show any correlation between eggshell quality (eggshell percentage, eggshell thickness, and eggshell breaking strength) and bone quality during an extended laying cycle of 100 weeks. According to these authors, bone characteristics and eggshell characteristics are independent and could be improved separately. These results are in agreement with Jansen et al. (2020) who showed no correlation between bone breaking strength and total eggshell production in genetically divergent layer lines based on performance.

Limits of the meta-analysis approach

It is clear from the literature that *in vivo* solubility of calcium particles depends on their size. Additionally, their geological origin, their composition in other minerals, and the internal capacity of the hen to dissolve the calcium have been shown to have an effect in a few studies (Guinotte et al., 1991; Saunders-Blades et al., 2009). The multifactorial dependence of limestone solubility limits the quantification of LmPS' effects in laying hens. Other factors could modulate LmPS' effects in laying hens, but the lack of data prevents such analysis. First, the incorporation level of coarse limestone particles. According to Xavier et al. (2015), tibia

breaking strength linearly increases with the proportion of coarse limestone in the diet. However, de Oliveira et al. (2013) showed a quadratic effect of incorporation level of coarse limestone with an optimal level at 60 %. Molnar et al. (2018) also described a quadratic effect with an optimal level of 70 % of coarse limestone. Second, the timing of coarse limestone distribution could also modulate its effects. During the early light period, the hen deposits calcium and phosphorus into medullary bone (Kebreab et al., 2009). The hen also needs a rapidly available calcium source such as fine limestone. During the dark period, the hen produces its eggshell (Nys et al., 2010). The hen needs a long-term calcium source, like coarse limestone, to reduce the desynchronization between the availability and the requirement of soluble Ca and therefore, reduce bone mobilization. Split feeding could be an interesting way to ensure calcium requirements. To support this hypothesis, Molnar et al. (2018) showed a positive effect of an evening distribution of coarse limestone on eggshell quality and a negative effect of a morning distribution of coarse limestone.

The aim of this meta-analysis was to quantify the effect of LmPS on the digestive availability and metabolic utilization of Ca by the laying hen. Current results show that coarse limestone particles improve eggshell quality, most likely by increasing mean retention time of Ca in the gizzard and increasing Ca absorption during the night. It also showed that coarse limestone particles improve eggshell quality regardless of age while its effect on bone strength is age dependent. Thus, coarse limestone particles help prevent bone weakness in layer flocks.

Tableau5 : Descriptive statistics.

	n[c]	N[c]	Mean	SD	Min.	Max.
Limestone particle size (mm)	309	58	1.251	0.824	0.039	6.500
In vitro solubility of calcium (%)[a]	61	8	50.76	15.66	24.20	100.00
In vivo solubility of calcium (%)[b]	43	5	79.23	9.47	54.00	96.00
Gizzard retention (g)	32	2	4.50	3.48	0.10	15.40
Egg production (%)	251	42	81.7	10.4	52.0	98.5
Egg weight (g)	251	37	62.44	3.56	54.70	70.20
Specific gravity	85	15	1.081	0.005	1.070	1.091
Eggshell thickness (mm)	137	19	0.370	0.035	0.260	0.446
Eggshell breaking strength (kg)	127	16	3.71	0.42	2.58	5.13
Tibia breaking strength (kg)	69	10	20.80	3.29	15.40	27.30

[a]*in vitro* solubility of calcium was determined according to the method of Zhang and Coon (1997*a*).
[b]*in vivo* solubility of calcium was determined according to the method of Rao and Roland (1989).
[c]n, number of observations; N, number of publications.

Tableau 6 : Response of *in vitro* and *in vivo* solubility (%) of particulate limestone to limestone particle size (mm).

	In vitro solubility[a]			*In vivo* solubility[b]		
	Slope	SD	*p-value*	Slope	SD	*p-value*
Intercept	73.454	2.916	**< 0.001**	70.167	3.671	**< 0.001**
LmPS[c]	−9.168	0.713	**< 0.001**	4.166	0.901	**< 0.001**
RMSE			5.534			2.389
R^2			0.843			0.905

[a]*in vitro* solubility of calcium was determined according to the method of Zhang and Coon (1997a).
[b]*in vivo* solubility of calcium was determined according to the method of Rao and Roland (1989).
[c]Limestone Particle Size

Tableau 7 : Response of egg production (%) and egg weight (g) to limestone particle size (mm) and age (week) in laying hens.

	Egg production (%)			Egg weight (g)		
	Slope	SD	*p-value*	Slope	SD	*p-value*
Intercept	75.072	2.904	**< 0.001**	52.419	0.902	**< 0.001**
LmPS	0.958	0.635	0.135	354×10^{-5}	0.191	0.985
Age	0.495	0.104	**< 0.001**	0.270	0.031	**< 0.001**
Age^2	-605×10^{-5}	931×10^{-6}	**< 0.001**	-142×10^{-5}	251×10^{-6}	**< 0.001**
LmPS × Age	-480×10^{-5}	102×10^{-4}	0.638	-198×10^{-5}	269×10^{-5}	0.463
RMSE			2.183			0.878
R^2			0.905			0.882

Tableau 4 : Response of specific gravity, eggshell thickness (mm), and eggshell breaking strength (kg) to calcium particle size (mm) and age (weeks) in laying hens.

	Specific gravity[a]			Eggshell thickness (mm)			Eggshell breaking strength (kg)		
	Slope	SD	*p-value*	Slope	SD	*p-value*	Slope	SD	*p-value*
Intercept	1088	2.271	**< 0.001**	0.367	0.018	**< 0.001**	3.359	0.276	**< 0.001**
LmPS[b]	1.493	0.512	**< 0.001**	0.005	0.001	**< 0.001**	0.121	0.045	**< 0.001**
Age	−0.127	0.038	**< 0.001**	720×10^{-4}	323×10^{-3}	0.825	0.003	0.005	0.468
LmPS × Age	-150×10^{-6}	900×10^{-8}	0.089	-430×10^{-5}	270×10^{-5}	0.114	-762×10^{-5}	835×10^{-5}	0.364
RMSE			704×10^{-6}			546×10^{-5}			0.168
R^2			0.989			0.983			0.912

[a]value of parameters for specific gravity has been multiplied by 1000.
[b]Limestone Particle Size

Tableau 9 : Response of tibia breaking strength (kg) to calcium particle size (mm) and age (weeks) in laying hens.

	Tibia breaking strength (kg)		
	Slope	SD	*p-value*
Intercept	16.921	3.229	**< 0.001**
LmPS[a]	−0.045	0.376	0.907
Age	0.291	0.174	0.111
Age²	−0.0038	0.018	**0.049**
LmPS × Age	0.0164	0.0074	**< 0.05**
RMSE			**1.306**
R^2			**0.894**

[a]Limestone Particle Size

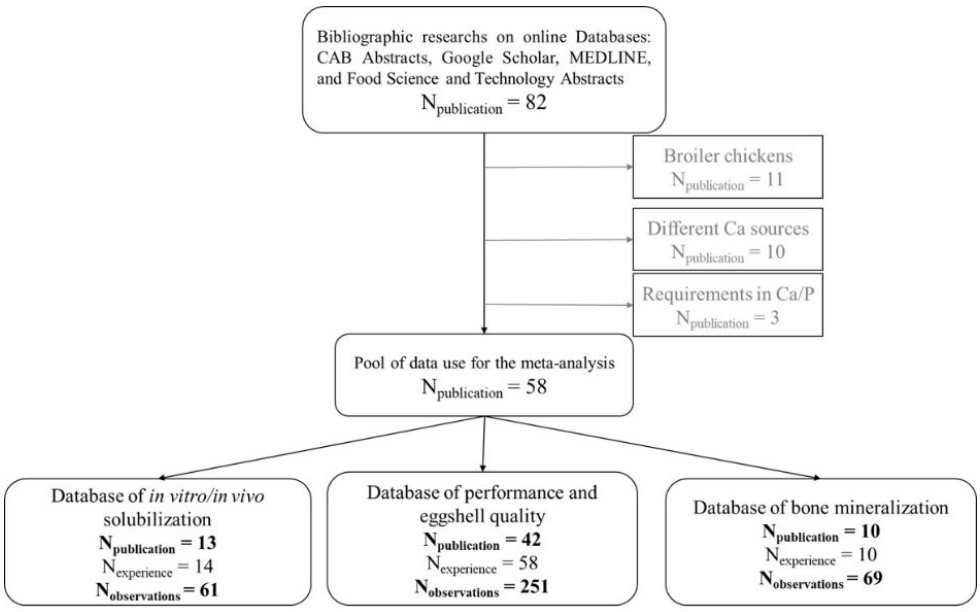


Figure 37 : Prisma diagram describing the data sourcing and the main inclusion criteria used to build the different databases used in the meta-analysis.

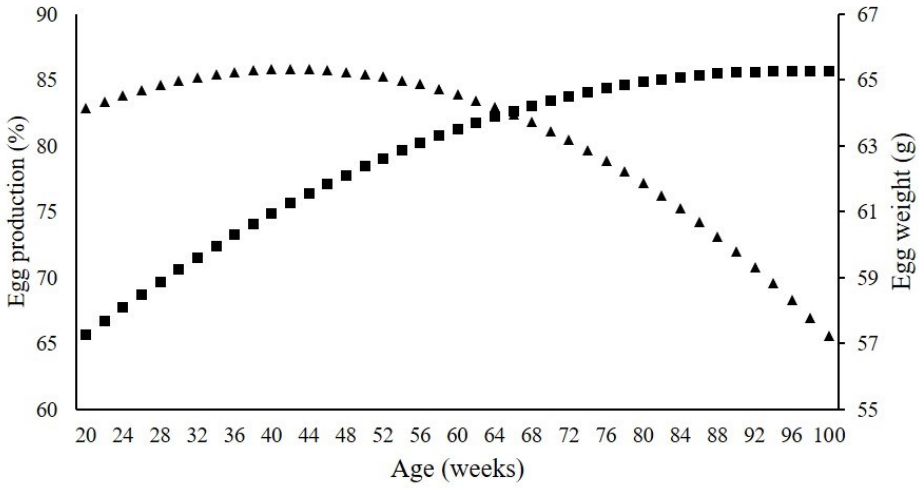


Figure 38 : Evolution of egg production (%) and egg weight (g) with age in laying hens.
Triangles line represents egg production (Y = 75.072 + 0.495 × Age – 0.00605 × Age²; $R^2 = 0.905$; RMSE = 2.183; $P < 0.001$). Squares line represents egg weight (Y = 52.419 + 0.270 × Age – 0.00142 × Age²; $R^2 = 0.882$; RMSE = 0.878; $P < 0.001$).

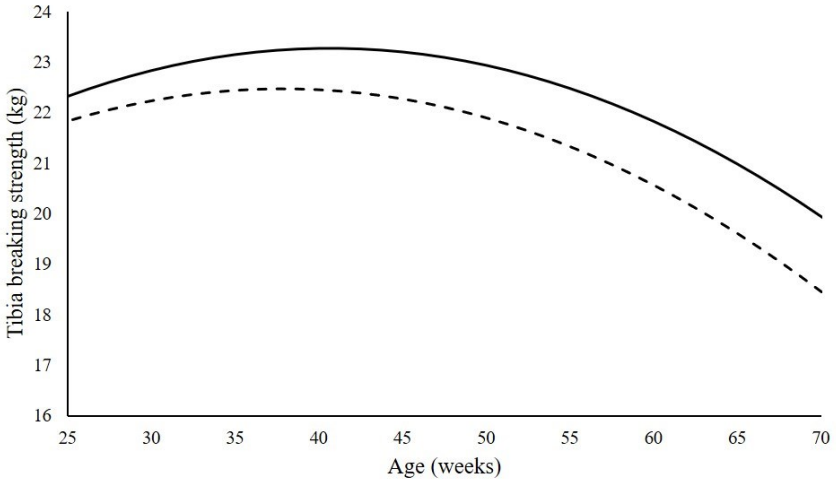


Figure 39 : Impact of age on tibia breaking strength (kg) in laying hens.
(Y = 16.921 + 0.291 × Age – 0.044 × LmPS – 0.004 × Age² + 0.016 × LmPS × Age; $R^2 = 0.894$; RMSE = 1.306; $P < 0.001$).
Full line represents hens fed with coarse limestone particles (1.5 mm) and dotted line represents hens fed with fine limestone particles (0.15 mm).

Partie 2 : Meta-analysis of dietary non-phytate phosphorus level, microbial phytase incorporation and age on phosphorus utilization in laying hens

F. Hervo, A. Narcy, and M.-P. Létourneau-Montminy

Données non publiées

Résumé

Le P est un nutriment essentiel pour la poule pondeuse, intervenant dans de nombreux processus métaboliques, notamment en étant un élément constitutif de la trame minérale osseuse. Toute carence alimentaire s'accompagne rapidement d'une diminution de la production et des paramètres de minéralisation osseuse. À l'inverse, un excès de P dans l'aliment se traduit par une hausse des rejets phosphorés dans l'environnement, sans améliorer pour autant les paramètres de production. Dans ce contexte, il apparait essentiel d'apporter la quantité de P la plus juste à la poule pondeuse. La définition du besoin en P de la poule pondeuse est donc un enjeu majeur en matière de nutrition.

Dans les matières premières végétales, le P est majoritairement contenu sous forme d'acide phytique, une molécule de réserve. Il est alors qualifié de PP, une forme peu disponible pour l'animal. Pour assurer un apport suffisant de P à l'animal, des phosphates sont ajoutés à la ration. Ces phosphates, issus de l'extraction minière, représentent une ressource non renouvelable et constituent le troisième nutriment le plus cher de la ration, après l'énergie et la protéine. Afin de valoriser le PP et de limiter l'incorporation de phosphates, la phytase microbienne est couramment ajoutée à la ration. Cette enzyme est capable d'hydrolyser l'acide phytique libérant ainsi les groupements PO_4 facilement utilisables par l'animal. L'utilisation de phytase microbienne implique la définition d'équivalence phytase, c'est-à-dire la quantité de P*dispo* qu'une unité de phytase peut libérer. Cette notion d'équivalence phytase dépend de la phytase microbienne considérée, mais également du critère de réponse sélectionné (minéralisation osseuse, production, digestibilité, *etc.*). L'incorporation de phytase microbienne dans la ration nécessite alors de redéfinir les niveaux d'incorporation de P pour couvrir les besoins de la poule pondeuse.

Alors que de nombreuses données permettent d'établir les équivalences phytase et de redéfinir les apports de P chez le poulet de chair, moins de données sont disponibles chez la poule pondeuse. L'objectif de ce travail était de compiler les données disponibles dans la littérature afin d'améliorer notre compréhension de l'utilisation de la phytase microbienne chez la poule pondeuse et de quantifier l'effet de son incorporation sur différents critères de réponses : production, qualité de la coquille et minéralisation osseuse. Cette méta-analyse repose sur 440 observations issues de 49 articles publiés entre 1997 et 2021. Différentes analyses ont été conduites afin d'étudier l'effet de la phytase microbienne, du niveau de PNP, de l'âge et de leurs interactions sur des paramètres de production (taux de ponte et indice de

consommation), de qualité de coquille (taux de coquille et force à la rupture), de minéralisation osseuse (taux de cendres des tibias) et de DPCA du P.

Cette étude montre que l'incorporation de phytase microbienne permet d'améliorer la DPCA du P et que l'amplitude de cet effet diminue lorsque le niveau de PNP augmente (Phytase × PNP ; $P < 0,05$). Par exemple, par rapport à un régime sans phytase microbienne, l'incorporation de 300 FTU de phytase microbienne par kilogramme d'aliment permet d'augmenter la DPCA du P de 13 et 7 points de pourcentage pour un aliment contenant 0,10 et 0,30 % de PNP, respectivement. La phytase microbienne améliore le taux de ponte et cet effet est atténué lorsque le niveau de PNP augmente (Phytase × PNP ; $P < 0,001$). Par exemple, le taux de ponte de poules recevant un régime contenant 0,10 % de PNP et 300 FTU/kg est similaire à celui de poules recevant un régime contenant 0,26 % PNP et sans phytase microbienne. L'incorporation de phytase microbienne diminue l'indice de consommation (Phytase ; $P < 0,001$) et améliore légèrement les paramètres de qualité de coquille. Enfin, la phytase microbienne et le niveau de PNP améliorent le taux de cendres des tibias de façon indépendante ($P < 0,05$). Cette méta-analyse confirme et quantifie l'effet de la phytase microbienne sur la valorisation du PP, afin de répondre aux besoins de la poule, même dans un régime contenant peu de PNP. Cette étude met en évidence différentes équivalences phytase selon le critère de réponse sélectionné. La base de données constituée pour cette méta-analyse fournira également des données nécessaires à l'évaluation de la qualité de prédiction du modèle digestif.

Abstract

Phosphorus (**P**) is an essential nutrient for the laying hen and a sub-optimal level of dietary P rapidly leads to a decrease in production and bone mineralization. In plant, most of P stored is present as phytic P (**PP**) and is poorly available for the hen. Thus, mineral phosphates are added to the diet, increasing feed cost and P excretion. To optimize PP utilization, microbial phytase is added to the diet. This enzyme is able to hydrolyze phytic acid and thus, release non-phytic P (**NPP**). However, the response of the laying hen to microbial phytase is not well defined. A meta-analysis of 440 observations from 49 publications published between 1997 and 2021 was performed, to determine the optimal response of the laying hen to microbial phytase incorporation (FTU/kg), dietary NPP (%) and age (weeks) regarding production, bone mineralization and P digestibility. In order to precisely evaluate the effect of the phytase effect, only negative controls were kept, thus, diets were iso-NPP within experiments. Microbial phytase increased apparent precaecal digestibility of P and the magnitude of this effect was reduced when dietary NPP increased (Phytase × NPP; $P < 0.05$). Microbial phytase incorporation increased egg production and this effect was reduced with higher dietary NPP level (Phytase × NPP; $P < 0.001$). Microbial phytase incorporation reduced FCR ($P < 0.05$), slightly increased eggshell proportion ($P < 0.05$) and increased tibia ash content ($P < 0.05$). In conclusion, the laying hen respond to microbial phytase more efficiently in a low-P diet, and the determination of phytase-equivalency depends on the response criteria considered.

Introduction

Phosphorus (**P**) is an essential macronutrient involving in numerous biological functions, such as energy metabolism, cell signalization, egg formation, and bone metabolism (Li et al., 2017). A sub-optimal dietary P level rapidly leads to a decrease of production (Waldroup, 1999; Teng et al., 2020) with defects on bone mineralization (Pongmanee et al., 2020). In seeds, most of P (60–70 %) is stored in phytic acid, as phytic P (**PP**; Pointillart, 1994). Phytic acid, or *myo*−inositol−(1, 2, 3, 4, 5 or 6)−P, is a phosphorylated cyclic sugar alcohol and represents a storage molecule of P (Angel et al., 2002). The P contains in phytic acid is poorly available and has to be hydrolyzed by phytase to liberate free PO_4 (Selle and Ravindran, 2007). In laying hen, the importance of mucosal phytase activity of the intestine is discussed (Marounek et al., 2010; Sommerfeld et al., 2020). Nevertheless, PP is considered as poorly available for the laying hen (Humer et al., 2015). To cover the P requirements, phosphates are commonly added to the diet because of their high P-availability (Sauvant et al., 2004). Phosphates are derived from soil extractions, representing an exhaustible resource (Lei and

Sthal, 2010) and are the third most expensive ingredients in animal nutrition (Boling et al., 2000). An excess of dietary NPP leads to an increase in P excretion with urine (Martinez-Rojas et al., 2018). In order to reduce the phosphates incorporation and to reduce P excretion microbial phytase is added to the diet.

In broilers, many studies showed that microbial phytase incorporation increases the precaecal digestibility of P (Rutherford et al., 2004; Ravindran et al., 2021) and improve production performance (Shirley and Edwards, 2003; Walk et al., 2018). Although microbial phytase shows positive effect on apparent retention of P in laying hen (Lim et al, 2003; Panda et al., 2005), only a few studies quantified its effect on apparent precaecal digestibility (Pongmanee et al., 2020). In laying hen, microbial phytase is also known to increase production performance dependently of the dietary NPP, according to the meta-analysis of Ahmadi and Rodehutscord (2012). However, the response of eggshell quality parameters and bone mineralization parameters to microbial phytase incorporation are more variable (Hughes et al., 2009; Jalal and Sheideler, 2001). The first purpose of this meta-analysis was to quantify the effect of microbial phytase incorporation on apparent precaecal digestibility of P in laying hen. This quantification is a necessary step to the development of a mechanistic model predicting the digestive fate of P and Ca in laying hens. The second purpose of this work was to quantify the effect of microbial phytase on production performance, eggshell quality and bone mineralization. This study also tried to investigate the potential interaction between microbial phytase and other factors such as NPP and age.

Material and methods

Data sourcing and inclusion criteria of publications

Publications investigating the effect of phytase in laying hens were searched on different online databases: CAB Abstracts, Google Scholar, MEDLINE, Embase and Food Science and Technology Abstracts using several key words: *laying hen, phytase, microbial phytase, ileal or precaecal digestibility, production performance, egg quality, eggshell quality, bone mineralization,* and *bone strength*. Publications were also identified in the references of previous articles. Only peer-reviewed publications were kept. All data were put in a database including general information about the publication (author name, date, *etc.*), qualitative (breed, diet type, *etc.*) and quantitative data (feed composition, production performance, P/Ca digestibility, *etc.*).

Throughout publications, diets were formulated to cover the requirement of the animal, expect for total phosphorus (***t*P**). Microbial phytase incorporation was mainly (86 %) comprised between 150 and 900 FTU/kg, with some data at 1,000 FTU/kg or more. Because there were insufficient data of super-dosing (*i.e.*, > 2,500 FTU/kg; Cowieson et al., 2011), these publications were removed from the analysis. When provided, the analyzed values of phytase activity were preferred to calculated values. All phytase studies showed at least 3 experimental diets: a positive control, with adequate level of dietary non-phytate phosphorus (**NPP**) without microbial phytase; a negative control, with a sub-optimal NPP level without microbial phytase; and a negative control + microbial phytase, with a sub-optimal NPP level with microbial phytase. To accurately study the effect of microbial phytase, only negative control with or without microbial phytase incorporation were considered. Moreover, only publications where laying hens were in first production cycle were kept. Age was thus comprised between 24 and 86 wk. Due to a wide variability of method measuring tibia ash content, only publications where tibia ash was determined on dried fat-free tibia were kept. Each experimentation of each publication received a unique code. The resulted database comprised 440 observations from 49 publications published between 1997 and 2021.

Dependent variables, independent variables and databases

Based on diet formulation of each experiment, dietary levels of Ca, *t*P, phytic phosphorus (**PP**) and NPP were calculated based on INRA-CIRAD-AFZ tables data (2017). Six dependent variables were analyzed from 4 databases: 1) Production performance with egg production (%) and feed conversion ratio (**FCR)**; 2) eggshell quality with eggshell proportion (%) and eggshell breaking strength (kg); 3) bone mineralization with tibia ash content (%); and 4) P digestibility with the apparent precaecal P digestibility (**APCD**; %). Descriptive statistics of each dependent variable are shown in Tableau 10. Independent variables considered were the level of microbial phytase incorporation (FTU/kg), the level dietary NPP (%) and age (weeks). Interactions between independent variables were tested when it was possible, *i.e.* when the interaction was tested within experimentation. Unfortunately, due to a low variability of dietary PP and Ca levels within and between publications, these factors were not included in this analysis.

Statistical analysis

Considering that many external factors, *i.e.* physiological stage of the animal and methodology, could affect observations and also bias models, the study effect was considered

as a random effect in models (Sauvant et al., 2008). So that, each dependent variable was analyzed with a linear mixed model as follows:

$$Y_{ij} = B_0 + S_i + B_i X_{ij} + b_i X_{ij} + e_{ij}$$

with Y_{ij} the dependent variable of the jth treatment of the ith study, B_0 the intercept of the study, X_{ij} the independent variable of the jth treatment of the ith study, S_i the random effect of the study on the intercept, B_i the overall regression coefficient of Y on X (a fixed effect), b_i the random effect on the regression coefficient of Y on X, and e_{ij} the residual error unexplained by the model. Statistical analysis was conducted with R software, version 3.02 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Linear mixed model studies were performed with the *lme* function of the package *nlme*, version 3.1–117 (Pinheiro et al., 2015). Residuals were tested for normality according a Shapiro-Wilk test. Outliers were identified according an extreme studentized deviate test (Grubbs's test). Performance of models was evaluated using the significance level of the estimated parameters, R^2 and root mean square error (**RMSE**). Statistical significance was considered when $P < 0.05$, and trend was reported when $0.05 \leq P < 0.10$.

Results

Descriptive statistics of the data

Microbial phytase efficiency depends on different factors relative to feed such as the ingredients, dietary level of Ca and NPP or to the animal such as genetic or age. In this study, experimental diets were mainly based on corn and soybean meal (83 %). Moreover, dietary levels of Ca and PP were relatively constant between publications: 3.5 ± 0.32 % and 0.22 ± 0.02 % (mean ± standard deviation), respectively. Source of phosphate supplementation is known to influence P availability. In selected publications, two sources of phosphate supplementation were used: mono−Ca phosphate (**MCP**, 30 %) and di−Ca phosphate (**DCP**, 70 %). The MCP and DCP are both known to be highly available in poultry (INRA-CIRAD-AFZ, 2017). Twelve different microbial phytases were used in phytase-containing diets among selected-publications: Natuphos 600® is the most commonly used (51 %), followed by Quantum Blue® (15 %), and Ronozyme® (7 %). Laying hens among selected-publications were ranged between 24 and 86 wk: 42 % were between 24 and 45 wk-old, and 58 % were between 46 and 86 wk-old. Thirteen genetics were represented among the selected-publications, with a main proportion of Hyline-W36, White Leghorn, and Lohmann Brown for 27 %, 18 % and 16 % respectively.

Apparent precaecal digestibility of P

The APCD of P was increased with phytase incorporation, however this effect was reduced when dietary NPP increased (Phytase × NPP; $P < 0.05$; Tableau 11). For example, relatively to a diet without microbial phytase, 300 FTU/kg increased P APCD by 13 percentage points in a 0.1 % NPP a diet and by 7 percentage points in a 0.3 % NPP diet (Figure 40). Microbial Phytase showed a quadratic effect on APDC of P with the maximum value observed at 800 FTU/kg.

Production performance

Microbial phytase incorporation increased egg production (Tableau 12) and this effect was higher when dietary NPP is low (Phytase × NPP; $P < 0.001$). For example, compared with a diet without phytase, 300 FTU/kg increased egg production by 2 and less than 1 percentage points in a 0.1 and 0.3 % NPP diet, respectively (Figure 41). Microbial phytase showed a quadratic effect on egg production ($P < 0.001$) with a plateau at 580 FTU/kg in a diet without dietary NPP. Microbial phytase incorporation decreased FCR (Figure 42) and reach a plateau around 450 FTU/kg of diet (Phytase²; $P < 0.001$). Dietary NPP level showed no effect on FCR. Models showed that age decreased egg production ($P < 0.05$) and FCR ($P < 0.001$).

Eggshell quality and bone mineralization

Eggshell proportion was affected nor by dietary NPP level, nor by microbial phytase incorporation, but was reduced with age ($P < 0.05$; Tableau 13). Microbial phytase increased eggshell breaking strength (Figure 43) as much as dietary NPP decreased (Phytase × NPP; $P < 0.05$; Tableau 14). Age sowed no effect on eggshell breaking strength, only a trend to decrease it ($P = 0.059$). Decreasing dietary NPP level significantly decreased the tibia ash content ($P < 0.05$; Tableau 15). For example, increasing NPP level from 0.1 to 0.3 % increased tibia ash content by 5 percentage points. Microbial phytase incorporation increased the tibia ash content ($P < 0.05$) by 0.3 percentage points per 100 FTU/kg in a diet containing 0.1 % NPP.

Performance of statistical models

Plots of residuals against predicted values indicated the adequacy of the models, they are presented in Figure 44, 45 and 46. Plots showed a good distribution or residuals around 0 for the different models. All residuals were less than 10 % for each dependent variable (data not shown): 6.1, 6.8, 3.5, 8.9, 2.3 and 3.9 % for egg production, FCR, eggshell proportion, eggshell breaking strength, tibia ash and APCD of P, respectively.

Discussion

Microbial phytase is commonly added in poultry diet to improve the PP utilization and also releasing available P (**aP**) in the digestive tract. Thus, microbial phytase can replace part of supplemented phosphate of the diet. For example, adding 300 FTU of microbial phytase per kilogram of feed to a 0.10 % NPP-diet resulted in an equivalent APCD of P to a 0.34 % NPP-diet without microbial phytase. The positive effect of microbial phytase was however alleviated when dietary NPP increased. Such observation is in accordance with those observed in broilers (Majeed et al., 2020). This phenomenon could be explained by the fact that the capacity of the hen to absorb P increase when the dietary NPP decreased (Rodehutscord et al., 2002). For example, Nie et al. (2013) have shown a two-fold expression of the duodenal NaP*i*−IIb when dietary NPP is reduced from 0.30 to 0.10 %. Thus, extra-P release by the microbial phytase can be easily absorb in a low-P diet. Additionally, if the dietary NPP and extra-P release by the microbial phytase exceed the absorption capacity of the laying hen (by saturating the P transporters), no additional effect of microbial phytase addition can be observed. This result showed that adding microbial phytase to adequate-P diet, drastically reduce the response of the laying hen to the enzyme.

The present model described a slight decrease of egg production from 90 to 87 % for 0.3 and 0.1 % of dietary NPP, respectively. It is well known that a decrease in dietary NPP level induces a rapid decrease in performance production (Snow et al., 2005). For example, Keshavarz (2000) have shown that egg production decreased from 84 to 71 % when dietary NPP is reduced from 0.3 to 0.1 %, in accordance with the meta-analysis work of Ahmadi and Rodehutscord (2012). Reducing dietary NPP has been shown to decreased daily feed intake (Nie et al., 2013; Punna and Roland, 1999; van der Klis et al., 1997), which could in turn decreased energy intake and thus impairing egg production (Rodehutscord et al., 2002). However, the low magnitude effect of dietary NPP on egg production in this study, may translate the low P requirement of the laying hen (Rodehutscord et al., 2023). For example, Jing et al. (2018) showed that 0.15 % NPP was sufficient to maintain egg production and bone mineralization. Microbial phytase improved egg production and this effect was reduced when dietary NPP increased, in accordance with Ahmadi and Rodehutscord (2012). It is well known that an excess of P did not increase production parameters (Keshavarz, 2000: Ousterhout, 1980). Thus, the reducing response of egg production to microbial phytase when dietary NPP increased translate the excess of P supply.

No interaction Phytase × NPP was observed on bone ash relative content in the current study. Because only negative controls were kept in this study, the dietary NPP of experimental diets was maybe too low to observe this interaction related to a maximum of bone mineralization. This point translates the specific P requirement for different response criteria as previously showed (Rodehutscord et al., 2023). Adding microbial phytase to the diet or increased dietary NPP level both increased the relative tibia ash content. Phosphorus is a major component of bone mineral matrix with Ca (Suttle, 2010), they are complexed in the form of hydroxyapatite crystals. If one or the other mineral is inadequate, bone mineralization is impaired. For example, decreasing aP from 0.35 to 0.16 % without microbial phytase decreased bone mineral content by 8 % (Bello et al., 2020). Interestingly, a recent study showed that without microbial phytase, 0.15 % available P did not impair bone traits (Jing et al., 2021). The discrepancies between experiments could be explain by feed ingredients, age of the hen and length of the experimental period.

Conclusion

Phosphorus requirement is not accurately defined in laying hens and depends on P system used and response criteria. According to the current study, 0.10 % NPP with 300 FTU/kg seems to be sufficient to maintain a good level of production and bone mineralization. More studies are necessary to defined P requirement of the laying hen.

Tableau 10 : Summary statistics of the data used in the meta-analysis.

Item[2]	n	N	Mean	SD	Min.	Max.
Independent variable						
Phytase (FTU/kg)	440	49	246	302	0	1800
NPP (%)	440	49	0.2	0.093	0.078	0.502
Age (weeks)	440	49	49	14	26	78
Dependent variable						
Egg production (%)	354	44	85.4	8.03	60.06	99.00
FCR	295	38	2.03	0.318	1.282	3.120
Eggshell proportion (%)	86	17	9.69	0.647	7.729	10.800
Eggshell breaking strength (kg)	78	13	3.62	0.683	2.310	4.775
Tibia ash (%)	107	13	54.2	6.53	38.10	64.10
APCD P (%)	34	5	46.9	12.36	21.90	69.80

[1]n, number of observations; N, number of publications; SD, standard deviation; Min., minimal value of the parameter; Max., maximal value of the parameter.
[2]NPP, non-phytic P; FCR, feed conversion ration; APCD P, apparent pre-caecal digestibility of P.

Tableau 11 : Response of apparent precaecal P digestibility (%) to microbial phytase (FTU/kg) and dietary NPP level (%) in laying hens.[1]

	coefficient	SE	p-value
Intercept	30.89	7.632	**< 0.001**
Phytase	5.93×10^{-2}	5.850×10^{-3}	**< 0.001**
NPP	63.59	11.882	**0.033**
Phytase²	-0.20×10^{-5}	0.500×10^{-6}	**0.034**
Phytase × NPP	−0.11	0.024	**0.011**
RMSE			**5.392**
R^2			**0.697**

[1]SE, standard error; RMSE, root mean square error; R^2, coefficient of determination.

Tableau 12 : Response of egg production (%) and feed conversion ratio (FCR) to microbial phytase (FTU/kg), dietary non-phytic P level (NPP; %) and age (weeks) in laying hens.[1]

	Egg production			FCR		
	coefficient	SE	p-value	coefficient	SE	p-value
Intercept	88.46	2.80	**< 0.001**	2.534	0.137	**< 0.001**
Phytase	0.018	0.023×10^{-1}	**< 0.001**	-0.241×10^{-3}	0.515×10^{-4}	**< 0.001**
NPP	8.145	7.341	0.268	−0.164	0.231	0.480
Age	−0.105	0.041	**0.012**	-0.964×10^{-2}	0.022	**< 0.001**
Phytase²	-0.100×10^{-4}	0.100×10^{-5}	**< 0.001**	0.100×10^{-6}	0.300×10^{-8}	**< 0.001**
Phytase × NPP	−0.039	0.102×10^{-1}	**< 0.001**	0.364×10^{-3}	0.207×10^{-3}	0.081
RMSE			**1.388**			**0.046**
R^2			**0.922**			**0.967**

[1]SE, standard error; RMSE, root mean square error; R^2, coefficient of determination.

Tableau 13 : Response of eggshell proportion (%) to microbial phytase (FTU/kg), dietary NPP level (%) and age (weeks) in laying hens.[1]

	coefficient	SE	p-value
Intercept	10.389	0.253	**< 0.001**
Phytase	0.130×10^{-3}	0.638×10^{-4}	**0.048**
NPP	−0.316	0.645	0.672
Age	-1.107×10^{-2}	0.048×10^{-1}	**0.031**
RMSE			**0.128**
R^2			**0.836**

[1]SE, standard error; RMSE, root mean square error; R^2, coefficient of determination.

Tableau 14 : Response of eggshell breaking strength (kg) to microbial phytase (FTU/kg), dietary NPP level (%) and age (weeks) in laying hens.[1]

	coefficient	SE	p-value
Intercept	5.884	0.521	**< 0.001**
Phytase	0.756×10^{-3}	0.215×10^{-3}	**0.001**
NPP	7.537	1.673	**0.007**
Age	−0.111	0.607×10^{-2}	0.059
Age²	-0.894×10^{-3}	1.801	0.082
Phytase × NPP	-0.364×10^{-2}	0.138×10^{-2}	**0.015**
RMSE			**0.134**
R^2			**0.909**

[1]SE, standard error; RMSE, root mean square error; R^2,

coefficient of determination.

Tableau 15 : Response of tibia ash content (%) to microbial phytase (FTU/kg), dietary NPP level (%), and age of the hen (weeks).[1]

	coefficient	SE	p-value
Intercept	61.286	5.892	**< 0.001**
Phytase	0.404×10^{-2}	0.124×10^{-3}	**0.002**
NPP	25.979	12.563	**0.045**
Age	−0.283	0.103	0.090
Phytase × NPP	−0.010	0.609×10^{-2}	0.096
RMSE			**5.16**
R^2			**0.796**

[1]SE, standard error; RMSE, root mean square error; R^2, coefficient of determination.

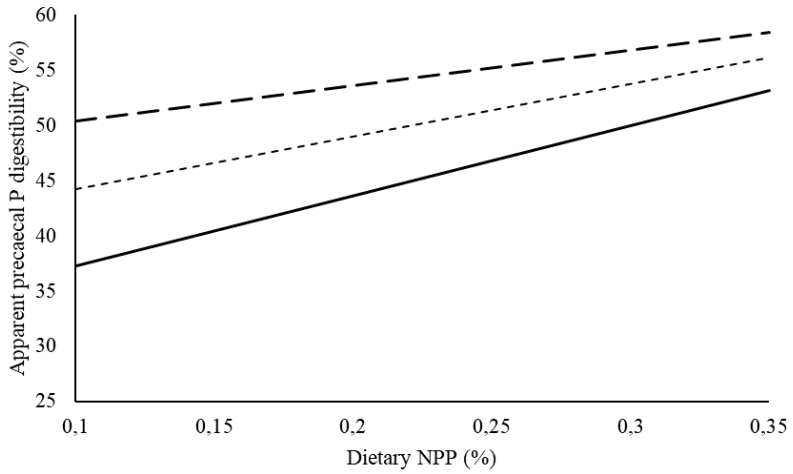


Figure 40 : Response of pre-caecal P digestibility to dietary NPP level (%) in laying hens fed different level of microbial phytase (FTU/kg).
Solid curve: 0 FTU/kg; thin dotted curve: 150 FTU/kg; and dotted curve: 300 FTU/kg).
$Y = 30.89 + (5.93 \times 10^{-2} \times \text{Phytase}) + (63.59 \times \text{NPP}) + (-0.200 \times 10^{-5} \times \text{Phytase}^2) + (-0.11 \times \text{Phytase} \times \text{NPP})$; RMSE = 5.392, $R^2 = 0.697$.

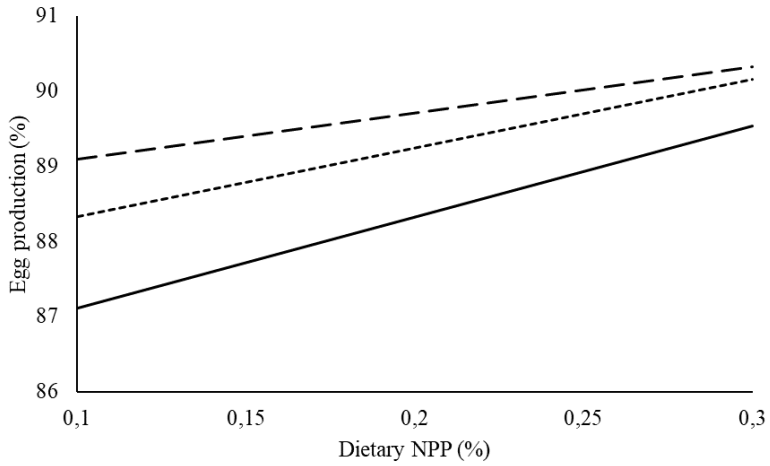


Figure 41 : Response of egg production to dietary NPP level (%) in laying hens fed different level of microbial phytase (FTU/kg).
Solid curve: 0 FTU/kg; thin dotted curve: 150 FTU/kg; and dotted curve: 300 FTU/kg).
$Y = 88.46 + (0.018 \times Phytase) + (8.145 \times NPP) + (-0.105 \times Age) + (-0.100 \times 10^{-4} \times Phytase^2) + (-0.039 \times Phytase \times NPP)$; RMSE = 1.388, $R^2 = 0.922$.

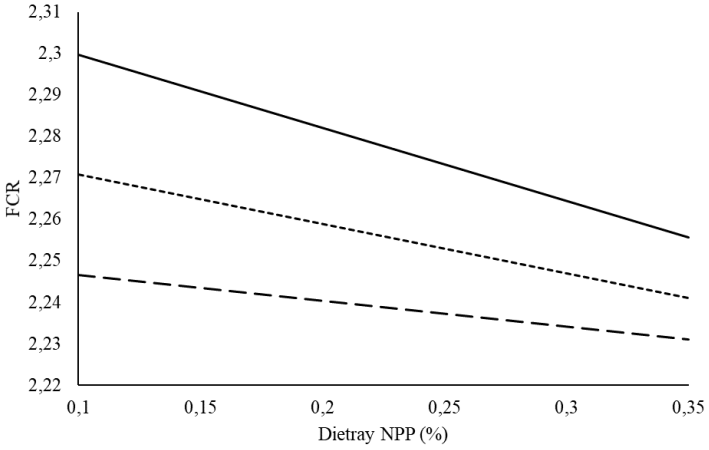


Figure 42 : Response of feed conversion ratio (FCR) to dietary NPP level (%) in laying hens fed different level of microbial phytase.
Solid curve: 0 FTU/kg; thin dotted curve: 150 FTU/kg; and dotted curve: 300 FTU/kg).
$Y = 2.534 + (-0.241 \times 10^{-3} \times Phytase) + (-0.164 \times NPP) + (-0.964 \times 10^{-2} \times Age) + (0.100 \times 10^{-6} \times Phytase^2) + (0.364 \times 10^{-3} \times Phytase \times NPP)$; RMSE = 0.046, $R^2 = 0.967$.

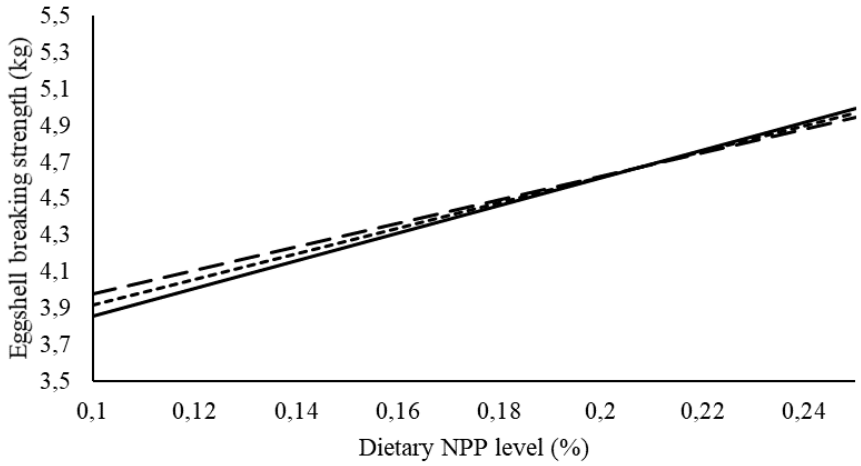


Figure 43 : Response of eggshell breaking strength (kg) to dietary NPP level (%) in laying hens fed different level of microbial phytase.
Solid curve: 0 FTU/kg; thin dotted curve: 150 FTU/kg; and dotted curve: 300 FTU/kg).
$Y = 5.884 + (0.756 \times 10^{-3} \times \text{Phytase}) + (7.537 \times \text{NPP}) + (-0.111 \times \text{Age}) + (-0.894 \times 10^{-3} \times \text{Age}^2) + (-0.364 \times 10^{-2} \times \text{Phytase} \times \text{NPP})$; RMSE = 0.134, $R^2 = 0.909$.

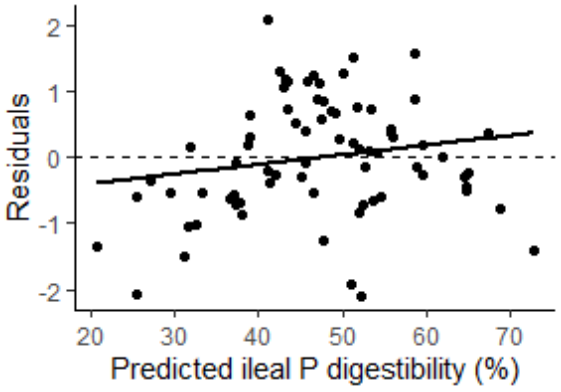


Figure 44 : Plot of residuals (observed values – predicted values) against predicted values of pre-caecal P digestibility (%).
Results from the mixed model described in Tableau 11. The line represents the regression of residuals on apparent pre-caecal P digestibility ($Y = 30.89 + (5.93 \times 10\text{-}2 \times \text{Phytase}) + (63.59 \times \text{NPP}) + (-0.200 \times 10\text{-}5 \times \text{Phytase}^2) + (-0.11 \times \text{Phytase} \times \text{NPP})$).

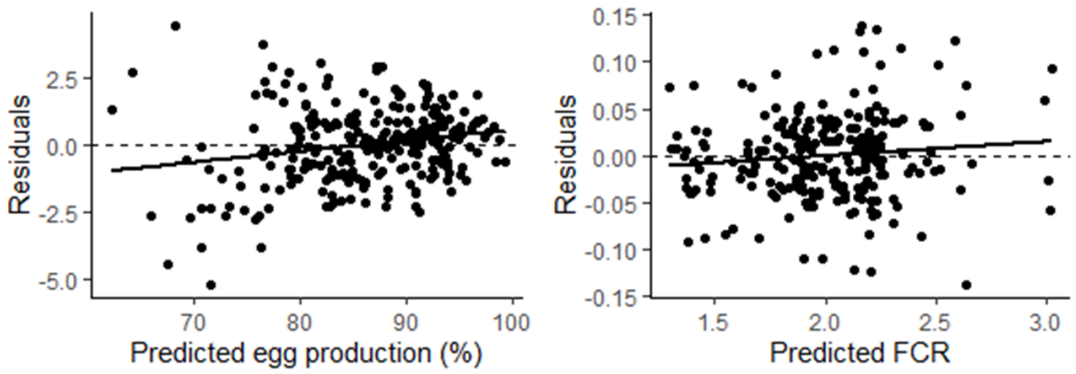


Figure 45 : Plot of residuals (observed values – predicted values) against predicted values of egg production (%) and FCR.
Results from the mixed model described in Tableau 12. The line represents the regression of residuals on egg production (Y = 88.46 + (0.018 × Phytase) + (8.145 × NPP) + (−0.105 × Age) + (−0.100 × 10-4 × Phytase²) + (−0.039 × Phytase × NPP)), and on FCR (Y = 2.534 + (−0.241 × 10^{-3} × Phytase) + (−0.164 × NPP) + (−0.964 × 10^{-2} × Age) + (0.100 × 10^{-6} × Phytase²) + (0.364 × 10^{-3} × Phytase × NPP)).

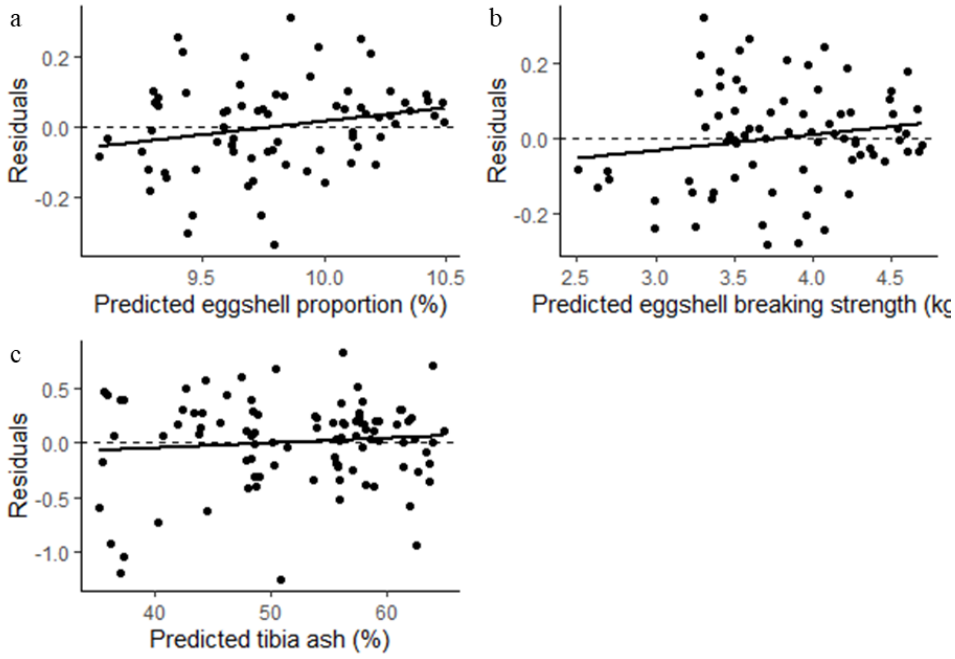


Figure 46:Plot of residuals (observed values – predicted values) against predicted values of eggshell proportion (%), eggshell breaking strength and tibia ash.
Results from the mixed model described in Tableau 13, 14, and 15, respectively. The line represents the regression of residuals on eggshell proportion ((Y = 10.389 + (0.130 × 10^{-3} × Phytase) + (−0.316 × NPP) + (−1.107 × 10^{-2} × Age)), on eggshell breaking strength (Y = 5.884 + (0.756 × 10^{-3} × Phytase) + (7.537 × NPP) + (−0.111 × Age) + (−0.894 × 10^{-3} × Age²) + (−0.364 × 10^{-2} × Phytase × NPP)), and on tibia ash ((Y = 61.286 + (0.404 × 10^{-2} × Phytase) + (25.979 × NPP) + (−0.283 × Age) + (−0.010 × 10^{-2} × Phytase × NPP)).

CHAPITRE 2

Étude de l'interaction entre la phytase microbienne et la taille des particules de carbonate de Ca sur la digestibilité pré-cæcale du calcium et du phosphore, sur les paramètres de production, de qualité de la coquille et de minéralisation osseuse

Effect of phytase and limestone particle size on mineral digestibility, performance, eggshell quality and bone mineralization in laying hens

F. Hervo, M.-P. Letourneau-Montminy, N. Même, B. Méda, M. J. Duclos, and A. Narcy. Poult. Sci. 102 : 102613.

https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102613

Publié en mars 2023

Résumé

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que l'incorporation de Ca particulaire permet d'optimiser l'utilisation digestive de Ca, notamment par un temps de rétention plus long du Ca dans le gésier. Une seconde analyse a permis de quantifier la capacité de la phytase microbienne pour valoriser le PP en fonction de l'apport de PNP. Si, chez le poulet de chair, il a été établi que l'incorporation de Ca particulaire potentialisait l'action de la phytase microbienne, cette interaction n'a, pour l'heure, pas été testée chez la poule pondeuse.

Le Ca est capable de se complexer à l'acide phytique pour former des sels, les phytates, rendant inaccessible les sites d'hydrolyse à la phytase. Comparativement aux fines particules, l'incorporation de Ca particulaire permet de créer un décalage entre l'arrivée de l'acide phytique et le Ca soluble, grâce à la plus lente solubilisation du Ca et au volume plus important des particules. Par ces mécanismes, l'incorporation de Ca particulaire limiterait la formation de complexes Ca−acide phytique chez le poulet de chair. Étant donné les teneurs élevées en Ca de l'aliment et les spécificités physiologiques (pH du gésier, besoins en Ca et P) de la poule pondeuse par rapport au poulet de chair, nous émettons l'hypothèse qu'il existe des réponses spécifiques de la phytase microbienne à l'incorporation de Ca particulaire chez la poule. L'objectif de ce second chapitre était donc d'étudier le comportement de la phytase microbienne en présence de fines ou de larges particules de carbonate de Ca chez la poule pondeuse dans une perspective de meilleure compréhension des mécanismes d'utilisation digestive ; étape préalable à leur modélisation et *in fine* à l'édition de nouvelles recommandations alimentaires.

Pour ce faire, soixante-douze poules pondeuses Lohmann Tradition, âgées de 30 semaines, ont reçu aléatoirement l'un des quatre régimes expérimentaux pour une durée de quatre semaines. Les régimes expérimentaux suivaient un plan factoriel 2 × 2, avec deux niveaux d'incorporation de phytase microbienne : 300 FTU/kg avec 0,18 % PNP, ou sans phytase microbienne avec 0,34 % PNP ; et deux niveaux d'incorporation de larges particules de $CaCO_3$ (LP ≈ 2−4 mm) : 0 ou 75 %. Les LP étaient complétées de fines particules de $CaCO_3$ (FP < 0,5 mm). Ainsi, les quatre régimes expérimentaux étaient les suivants : FP300 et FP0, recevant des fines particules avec et sans phytase microbienne, respectivement, et MIX300 et MIX0, recevant des LP avec et sans phytase microbienne, respectivement. Durant les quatre semaines expérimentales, les œufs ont été ramassés et pesés quotidiennement et la qualité de la coquille a été analysée une fois par semaine (poids, épaisseur et force à la rupture de la coquille). Les refus alimentaires ont été collectés chaque semaine afin de calculer l'indice de

consommation. À la fin de l'expérimentation, les poules ont été euthanasiées et le tibia droit a été prélevé afin d'analyser la force à la rupture et le taux de cendres. De même, le contenu de l'iléon distal a été prélevé afin de calculer la DPCA du Ca et du P ainsi que la dégradation du PP. Aucune différence entre traitement n'a été observée en ce qui concerne la consommation alimentaire quotidienne moyenne, l'indice de consommation ou encore les paramètres osseux. L'incorporation de LP a amélioré le poids de coquille de 6,9 %, l'épaisseur de coquille de 4,5 % et le taux de coquille de 6,9 % dans les régimes supplémentés en phytase microbienne uniquement (Phytase × Taille ; $P < 0,05$). Dans les groupes recevant uniquement des FP, la DPCA du P était plus basse chez les poules recevant de la phytase microbienne (Phytase × Taille ; $P < 0,001$). Cependant, dans les groupes recevant des LP, la DPCA du P n'était pas significativement différente entre les groupes avec et sans phytase microbienne. Le fait que la DPCA du P soit dégradée en présence de phytase microbienne dans les groupes recevant des FP s'explique par une plus faible dégradation du PP ($P < 0,001$). Ces résultats indiquent que les FP favorisent la formation de complexes entre le Ca et l'acide phytique, limitant la libération de PNP par la phytase microbienne. Cette étude renforce l'intérêt de l'utilisation du Ca particulaire chez la poule pondeuse, qui permettrait d'optimiser l'utilisation digestive du P.

Abstract

The effect of microbial phytase and limestone particle size (**LmPS**) was assessed in Lohmann Tradition laying hens from 31 to 35 wk of age. Seventy-two hens were used in a completely randomized trial according to a 2 × 2 factorial arrangement with two levels of phytase/basal available P (***a*P**); 0 FTU/kg with 0.30 % *a*P or 300 FTU/kg with 0.15 % *a*P, and two limestone particle sizes; fine particles (**FL**, <0.5 mm) or a mix (**MIX**) of 75 % coarse limestone (**CL**, 2–4 mm) and 25 % FL. Diets contained equivalent levels of Ca (3.5 %), phytic P (**PP**; 0.18 %) and *a*P (0.30 %) considering the P equivalency of phytase. Thus, dietary treatments were **FL0** and **MIX0** without phytase, and **FL300** and **MIX300** with 300 FTU/kg phytase. Performance were recorded daily and eggshell quality (eggshell weight proportion, weight, thickness and breaking strength) was measured weekly. At the end of the trial, bone parameters (tibia breaking strength, elasticity and ash) and the apparent pre-caecal digestibility (**APCD**) of P and Ca were determined. No differences were observed between treatments in feed intake, FCR and bone parameters. Addition of MIX increased the eggshell proportion, weight and thickness in groups receiving no phytase (+6.5 %, +6.9 %, and +4.5 %, respectively) while no effect was observed in groups receiving phytase (Phytase × LmPS, $P < 0.05$). In hens receiving FL, the APCD of P was lower in diets supplemented with phytase (−14 percentage points; Phytase × LmPS, $P < 0.001$). A higher phytate disappearance was observed in hens fed diets with phytase in combination with MIX (Phytase × LmPS, $P = 0.005$). Phytase and MIX together increased the APCD of Ca by 7.3 percentage points (Phytase × LmPS, $P < 0.001$). In conclusion, addition of CL could limit the formation of Ca-phytate complex thus improving the response of the birds to phytase compared to FL.

Introduction

Around 60 to 70 % of seed phosphorus (**P**) is complexed to myo-inositol to form phytic acid, which drastically reduces its bioavailability to the animal (Abbasi et al., 2019). Thus, phosphates are added to the diet to meet the daily requirements of poultry. The use of phytase enhances the bioavailability of P from phytic acid, and reduces P excretion (Selle and Ravindran, 2007). The positive effects of phytase on digestive performance, especially on pre-caecal digestibility of P are well known in broilers (Babatunde and Adeola, 2020; Bournazel et al., 2018; Ravindran et al., 2020). However, less studies measuring P digestibility have been performed in laying hens (Javadi et al., 2021; van der Klis et al., 1997).

Another nutritional concern in laying hens is the high requirement for Ca occurring during the night to produce the eggshell. The diet provides approximately 60 % of the Ca required (Nys, 2017), however, because of a desynchronization between dietary Ca availability during the light period and the high Ca requirement to produce the eggshell during the dark period (Nys and Leroy, 2018), additional Ca is mobilized from medullary bone (Kim et al., 2012). To reduce the gap between the requirement and the demand for Ca, coarse limestone (**CL**) is commonly added to the diet (Molnár et al., 2018). Compared to fine limestone (**FL**), CL is retained for longer in the gizzard (Rao et al., 1992). The acidic content of the gizzard and a longer retention time of CL in this organ allow a slower solubilization of Ca and provide a longer diffusion of available Ca in the duodenum during the night, reducing bone Ca mobilization (Fleming, 2008). Moreover, CL has been shown to increase eggshell quality, without influencing production performance parameters (Hervo et al., 2022).

Phytic acid has the capacity to chelate some divalent cations to form phytic acid salts: phytate (Angel et al., 2002; Maenz et al., 1999). Due to the high Ca concentration in laying hen's feed, phytic acid can easily bind Ca to form unavailable complexes. This process depends on pH (Grynspan and Cheryan, 1983) and Ca-to-phytic acid ratio (Wise, 1983). In broilers, FL shows a higher capacity than CL to form insoluble complexes with phytate, thus reducing P digestibility, growth performance and bone mineralization (Bradbury et al., 2016; Majeed et al., 2020; Manangi and Coon, 2007). However, no data are available in laying hens. The objective of the current study was to assess the effect of microbial phytase, limestone particle size and their interaction on mineral digestibility in laying hens. The hypothesis was that FL could form insoluble complexes with phytic acid thus reducing phytase efficiency and P digestibility.

Materials and methods

The experiment was conducted under the guidelines of the French Ministry of Agriculture for Animal Research at the Experimental Poultry Unit of Tours, INRAE, Nouzilly, France (PEAT INRAE 1295, doi.org/10.15454/1.5572326250887292E12). The experimental design was approved by the Regional Ethics Committee on animal experimentation (Tours, France) and the French Ministry of Higher Education and Research (Paris, France; authorization: APAFIS #32000-202 1061008462021 v3).

Animal housing and management

Seventy-two laying hens (Lohmann Tradition, Lohmann, Saint-Fulgent, France) were housed in groups of three hens per cage from 18 to 25 wk of age. During this period, animals were fed according to breeder recommendations (Lohmann Tradition, 2020) to cover all nutritional requirements, *i.e.,* 3.4 % Ca and 0.34 % available P (***a*P**). At 26 wk of age, hens were transferred to individual cages for a 5-wk adaptation period. This was followed by a 4-wk experimental period from 31 to 35 wk of age. Temperature was maintained between 18 and 20°C with 16 h of light per day (from 6 a.m. to 10 p.m.). On each day of the 4-wk experimental period, eggs were collected and weighed to obtain egg production, egg weight and to calculate egg mass. Cumulative weekly refusals were weighed to determine the average daily feed intake (**ADFI**) and feed conversion ratio (**FCR**). Animals were weighed at the beginning and end of the experiment.

Experimental treatments and diets

Diets contained corn and wheat and were offered as mash form. Experimental diets were formulated to meet all nutrient requirements, with 3.5 % Ca and 0.34 % *a*P, according to breeder recommendations (Lohmann Tradition, 2020) (Tableau 16). At 31 wk of age, 72 laying hens were assigned to one of the four experimental treatments, with 18 replicates per treatment. A 2 × 2 factorial arrangement was used with two limestone particle sizes (**LmPS**), 100 % fine limestone (**FL**) or a mix (**MIX**) of FL (25 %) and coarse limestone (**CL**, 75 %), and two levels of phytase, 0 FTU/kg or 300 FTU/kg. The mean diameter was below 0.5 mm for FL and between 2 and 4 mm for CL. Since the origin of limestone is known to influence the solubilization of Ca in the digestive tract of poultry (Kim et al., 2019), the same source of CL was used and CL particles were ground to obtain FL. Microbial phytase (a novel biosynthetic bacterial 6-phytase produced by *Trichoderma reesei*, Adisseo France SAS, Commentry, France) was added to two diets at 300 FTU/kg to provide 0.15 % *a*P (only a matrix value for *a*P was considered). To summarize, **FL0** contained fine limestone without phytase; **MIX0** contained coarse and fine limestone without phytase; **FL300** contained fine limestone with 300 FTU/kg phytase; and **MIX300** contained coarse and fine limestone with 300 FTU/kg phytase. Feed and water were provided *ad libitum* except for the last day of the experiment. For the last 10 days of the experiment, hens received a diet supplemented with titanium dioxide (**Ti**) at 5.0 g/kg to determine the apparent pre-caecal digestibility (**APCD**) of P and Ca.

Sample collection and analysis

Limestone particle size distribution

The particle size distribution of limestone was determined by sifting the limestone through a series of sieves. Sieve sizes were according to the US standard mesh chart as follows: #100 (150 µm), #50 (300 µm), #30 (600 µm), #12 (1,700 µm), #10 (2,000 µm), #8 (2,360 µm) and #6 (3,350 µm). The geometric mean diameter (mm) and the geometric standard deviation (mm) were calculated for CL, FL, and mixed limestones, according to the method described by Wilcox et al. (1970). Limestone contained 38 % Ca according to the manufacturer.

Eggshell quality

Once per week, eggs were collected to evaluate eggshell thickness and breaking strength using a DET 6000 (Nabel Co., Kyoto, Japan). Shells were then cleaned and dried at 110°C for 2 h. Dried eggshells were weighed, and the eggshell proportion (%) was calculated.

Feed and digesta analysis

At 35 wk of age, all birds were euthanized by injection of sodium pentobarbital at the wing-vein. To synchronize hens, they were fasted from 10 p.m. the previous evening to the time of laying on the day of sampling. From the moment of laying (t lay = t0), hens were fed and euthanized 4 hours later. As eggshell formation had not started, hens were considered to be in a steady state. The digesta of the distal half of the ileum was collected. Digesta were frozen at –20 °C, freeze-dried for 72 h, and stored in order to determine the APCD of P and Ca and the PP disappearance. Diets and digesta of the distal ileum were analyzed to determine the Ca, *t*P and Ti concentration using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES Thermo Scientific™ iCAP™ 7200, Courtaboeuf, France; method 990.08; AOAC International, 2006). Phytate concentration was determined in diets and digesta using a kit based on the modification of the ammonium molybdate method (Phytic Acid Assay Kit; NEOGEN Europe Ltd., Auchincruive, Scotland). Diets were analyzed for phytase activity (Adisseo France SAS, Commentry, France) and for dry matter and crude protein content by near-infrared spectroscopy, with a Büchi NIRFlex N−500 spectrometer (Büchi SARL, Vellibon-sur-Yvette, France).

Bone parameters

The right tibia was collected for measurement of breaking strength (N) and elasticity (mm) with the three-point destructive bending test using an Instron compression machine

(Model 4411, Instron Corp., Canton, MA, USA) loaded with a 200-N load cell. A 6−cm distance between the two fixed points supporting the tibia and a crosshead speed of 5.0 mm/min were held constant throughout each measurement. Tibia ash content was determined on dried defatted bones according to the method described by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990). Briefly, soft tissues were gently removed before bones were dried at 100 °C for 24 h. Tibias were defatted by immersion in a diethyl-ether solution for 24 h before ashing at 600 °C overnight.

Calculations and statistical analysis

The apparent pre-caecal digestibility of P and Ca was determined using Ti as an indigestible marker. The same method was applied to determine the phytic P (**PP**) disappearance at the ileum level. The apparent pre-caecal digestibility and the PP disappearance were calculated as follows:

$$\text{APCD (\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{Ti}_{feed}}{\text{Ti}_{digesta}} \times \frac{\text{mineral}_{digesta}}{\text{mineral}_{feed}}\right)\right] \times 100$$

Where $\text{Ti}_{digesta}$ and $\text{mineral}_{digesta}$ are the Ti and mineral content (P, Ca or PP; g/kg) in the freeze-dried digesta, respectively, and Ti_{feed} and mineral_{feed} are the Ti and mineral content (P, Ca or PP; g/kg) in the feed, respectively.

A randomized block design was used (with a total of 18 blocks of 4 cages) with a 2 × 2 factorial arrangement: 2 limestone particle size and 2 levels of phytase resulting in 4 treatments, each with 18 replicates. Statistical analysis was performed using R open-source software version 3.02 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). All data were tested for normality according to a Shapiro test. Analysis of variance was conducted to determine the effect of phytase, limestone particle size and their interaction. For each dependent variable, the experimental unit was the individual. The block effect of the experimental design, representing the position of the cage into the building and considering the potential variability due to the environment, was considered as a fixed effect. For egg weight and bone parameters body weight was also introduced as a covariable. Tukey's range test was used for multiple means comparisons when $P < 0.05$. As egg production did not follow normality, a non-parametric Kruskal-Wallis test was performed to determine the effect of phytase, limestone particle size, and their interaction. A Dunn test with a Bonferroni correction for the *p*-value was used for multiple means comparisons. Statistical significance was considered when $P < 0.05$, and a trend was reported when $0.05 \leq P < 0.10$.

Results

Particle size distribution and phytase activity

As expected, fine limestone was characterized by a main proportion of particles smaller than or equal to 0.30 mm (71 %) and coarse limestone showed a high proportion of particles larger than 2.36 mm (64%; Tableau 17). Thus, the geometric mean diameter of FL and CL was 0.21 ± 0.17 and 2.76 ± 0.13 mm, respectively. It is noteworthy that in the MIX, due to the combination of 75 % CL and 25 % FL, the geometric mean diameter of limestone was 1.36 ± 0.32 mm. Phytase activity in adequate P level diets was 85 and 45 FTU/kg for FL0 and MIX0, respectively. The analyzed phytase activity of FL300 and MIX300 was 373 and 293 FTU/kg, respectively (Tableau 16).

Production performance

There was no mortality during the experimental period. No significant effect was observed on ADFI, body weight, or egg production (Tableau 18). Diets with FL increased FCR by 3.2 % compared with MIX ($P < 0.05$). Phytase increased egg weight by 3.7 % in diets containing FL but had no effect in MIX diets (Phytase × LmPS, $P < 0.05$).

Eggshell quality and bone mineralization

The addition MIX increased the eggshell proportion ($P < 0.001$), weight ($P = 0.005$) and thickness ($P = 0.003$) in diets without phytase (respectively, 6.5 %, 6.9 %, and 4.5 %; Phytase × LmPS; Tableau 19). Phytase incorporation increased eggshell breaking strength in a lower extent in hens fed MIX than in hens fed FL (Phytase × LmPS, $P = 0.002$): +3.2 and +6.5 %, respectively. No significant effect was observed on the tibia elasticity, ash weight, ash relative content or breaking strength (Tableau 20). However, tibia breaking strength of hens fed with phytase tended to be lower compared with hens fed without phytase ($P = 0.082$).

Apparent pre-caecal digestibility

As expected, laying hens receiving exogenous phytase ingested significantly less total P than others (−25 %, $P < 0.001$; Tableau 21). No effect of dietary treatments was observed on Ca intake. Incorporation of MIX increased the APCD of Ca in a greater extent in hens fed phytase compared to hens fed without phytase: +9.5 and 7.0 %, respectively (Phytase × LmPS, $P = 0.002$; Tableau 21). The P APCD of hens was decreased with phytase addition with a higher magnitude in hens receiving FL than MIX diets (−28 % and −9 %; Phytase × LmPS, $P < 0.001$; Tableau 21). The incorporation of microbial phytase increased PP disappearance by 30

compared with 10 percentage points in hens fed MIX and FL diets, respectively (Phytase × LmPS, $P = 0.005$; Tableau 21).

Discussion

Only a few studies have been performed regarding the effect of phytase on the APCD of P and Ca in laying hens. Moreover, there is no information on the effect of limestone particle size together with phytase on these parameters in laying hens; only data in broilers are available. As a result, part of this discussion is based on data issued from broiler trials. Phytase incorporation is known to increase APCD of P in the laying hen (Keshavarz, 2000; van der Klis et al., 1997). For instance, Bello and Korver (2019) showed that 32 weeks-old hens fed 0.18 % NPP with 300 FTU/kg exhibited a 18 % higher APCD of P than hens fed with 0.38 % NPP without phytase. Additionally, Pongmanee et al. (2020) showed no differences in APCD of P between 37 weeks-old laying hens fed with 0.35 % PNP without phytase or with 0.16 % NPP with 300 FTU/kg, in accordance with the present results. The discrepancies between authors concerning phytase effect may be related to age of the laying hen (Bello and Korver, 2019) or to the length of the experimental period (Javadi et al., 2021). In the current experiment, it is noteworthy than hens fed FL exhibited a lower APCD of P in the diet formulated with phytase compared to other groups ($P < 0.001$; Tableau 21). Calcium can form insoluble complexes with phytate when the pH is above 5.0 (Nolan and Duffin, 1987), and this pH condition is found in the crop of the laying hen (Classen et al., 2016; Denbow, 2015). These complexes limit mineral solubilization, which in turn limits the capacity of phytase to liberate P from phytate (Selle et al., 2009). Consequently, the formation of Ca−phytate complex could reduce the APCD of P (Tamim et al., 2004). Results of the current experiment support this hypothesis: the positive impact of microbial phytase on PP disappearance was more important when using the mix of CL and FL compared to FL alone. The formation of the Ca−phytate complex is greatly influenced by limestone particle size in broilers: Manangi and Coon (2007) have shown that FL facilitates the formation of these complexes. In an *in vitro* assay, at pH = 6.5 and after 30 min, FL (0.03 mm) reduced PP degradation by phytase by 15 % compared to CL (1.31 mm). Fine limestone is highly soluble compared to CL and rapidly provides a high quantity of soluble Ca in the gizzard (Kim et al., 2019). This soluble Ca can easily bind phytate and also decrease the APCD of P and Ca (Li et al., 2021). For example, the same authors found that, in broilers, the APCD of P was decreased from 87 to 61 % in diets supplemented with phytase when limestone particle size decreased from 0.80 mm to 0.15 mm. To reinforce the significance of limestone particle size in Ca−phytate complex formation, an increase in dietary Ca in broilers did not

affect the APCD of P when limestone was supplied as CL but decreases it by 16 % with FL (Kim et al., 2018). Phytase inclusion allows to reduce the quantity of non-absorbed P at the pre-caecal level (by 16 % in the current study) decreasing in turn the P excretion (Lim et al., 2003; Abudabos, 2011). For instance, Martinez Rojas et al. (2018) showed that the use of phytase in a low P diet allows a reduction of the total amount of P present in the excreta by approximately 24 % compared to a control diet receiving an adequate P level.

The level of APCD of Ca observed in this study was high (around 79 %). This could be partly explained by the experimental design: laying hens were fasted from the evening (10 p.m.) until they laid the next day (8:30 a.m. in average) to favor feed ingestion and ensure the presence of content in the ileal compartment. After laying, Ca and P are required to finalize medullary bone replenishment (Etches, 1987). The Ca deposition into medullary bone occurs mainly during the first 6 hours after laying (Clunies et al., 1993; Hurwitz, 1964). Fasting may have induced hypocalcemia and enhanced intestinal Ca absorption by the 1,25−OH_2−D3 pathway (Bar, 2008; van der Klis et al., 1990) in order to meet the mineral demand. To reinforce this hypothesis, observed APCD of P was quite high when comparing to data of Keshavarz (2000) with values of 29 and 33 % in hens fed 0.30 % NPP without or with 300 FTU/kg, respectively. Thus, it cannot be excluded that Ca and P absorption has been increased in the current experiment due to physiological regulations. CL increased the APCD of Ca in a greater extent in hens fed diets with phytase. By favoring P absorption in phytase supplemented diets, CL decreases the propensity of Ca to complex phosphate (Hurwitz and Bar, 1965) and phytate (Selle et al., 2009) in the small intestine. Consequently, Ca would be more available for absorption.

In laying hens, P is an essential mineral involved in many functions such as bone development, energy metabolism, cell membrane structure and egg formation (Suttle, 2010). As mentioned earlier, during eggshell formation, bone resorption is stimulated to provide sufficient Ca (Dacke et al., 1993). Through this process, P is also released and excreted in the urine (Nys and Leroy, 2018). Eggshell production consequently increases the P requirement more than predicted by the small amount of P in the egg (~120 mg). In commercial feeds, microbial phytase is commonly used to save phosphate and limit P excretion (Humer et al., 2015). In the current study, 300 FTU/kg of phytase were added, saving 7.2 g of phosphate per kg of feed with a replacement of 1.5 g *a*P without affecting feed intake or growth performance. These results corroborate those of Pongmanee et al. (2020), who reported an equivalency of

1.9 g *a*P in terms of ADFI and FCR for 300 FTU of phytase per kg in a diet containing 1.9 g *a*P in 37-wk-old laying hens.

It is worth noting that hens were individualized during the experimental period which was relatively short compared to practical conditions. So, the current results are probably not completely representative of commercial flocks. Egg production was maintained in the current experiment. A low dietary non-phytic P (**NPP**) level is known to decrease egg production (Teng et al., 2020). In their meta-analysis, Ahmadi and Rodehutscord (2012) showed that the effect of phytase on egg production is greater with low levels of NPP. Based on their results, 300 FTU of microbial phytase per kg feed containing 1.7 g NPP did not significantly decrease the production performance of laying hens compared to a diet formulated with 3.4 g NPP. The current study showed that phytase inclusion increased egg weight in the presence of FL, allowing to reach the same egg weight than MIX300 (Tableau 18). Concerning the effect of phytase on egg weight, phytase mainly acts on P utilization, which is not a major constituent of the egg as stated before. Meanwhile, the amino acids constituting proteins represent 11 % of the egg white (Nys and Guyot, 2011). Phytic acid can form insoluble complexes with proteins (Kies et al., 2006; Selle et al., 2012), affecting amino acid availability. Phytase, by hydrolyzing phytate, can release amino acids and thus increase their digestibility in broilers (Rutherfurd et al., 2002). In accordance with our results, Skrivan et al. (2018) observed that inclusion of phytase at 300 FTU/kg increased egg weight by 2 %, in 36−wk−old laying hens receiving 1.8 g NPP. However, in the MIX diets, no effect of phytase was observed on egg weight. In the current study, CL was 2.76 mm and Scott et al. (1971) specified that particles greater than 1.0 mm were specifically retained in the gizzard. Coarse limestone has been shown to increase the gizzard grinding capacity (Roche and Martinoli, 1974) and decrease the gizzard pH (Singh et al., 2014). It is thus possible that CL improved amino acid digestibility and consequently increased egg weight compared to FL. By this mechanism, CL may hide the positive effect of phytase on egg weight.

Coarse limestone also improved eggshell weight and thickness in diets without phytase by providing solubilized Ca for an extended period compared to FL (Rao and Roland, 1990). A recent meta-analysis already described the positive effect of CL on eggshell thickness (Hervo et al., 2022): addition of CL (1.36 mm) increased eggshell thickness by 1.5 % compared to FL (0.21 mm). Phytase addition and MIX together increased eggshell breaking strength. Bello et al. (2020) observed that phytase addition (600 FTU/kg) in 60−wk−old laying hen during 10 wk increased the eggshell breaking strength. Eggshell breaking strength is a synthetic indicator

resulting from Ca and proteins deposition and arrangement. Indeed, proteins of the eggshell are known to play a major role in the ultrastructure (Gautron and Nys, 2007).

No effect of dietary treatment was observed on bone characteristics. Phosphorus is a major constituent of bone together with Ca in the form of hydroxyapatite (Whitehead, 2004). Even if the mineral P level was low, the extra P provided by phytase was sufficient to reach equivalent levels of bone ash content and mechanical properties compared to control diets (Tableau 20). Hens receiving phytase used P more efficiently for bone metabolism, as illustrated by the tibia ash weight to *t*P intake ratio: 5.3, 5.5, 6.6, and 7.1 for FL0, MIX0, FL300, and MIX300, respectively (Phytase: $P < 0.001$; data not shown). No effect of the MIX was observed on bone strength in the current study. However, a reduction of bone resorption was previously observed using CL (Guinotte and Nys, 1991; Gloux et al., 2020). Indeed, by diffusing soluble Ca into the intestine longer during the eggshell calcification period, CL limits bone mobilization. Because the structural bone content declines with age and leads to bone weakness (Whitehead, 2004), the effect of CL would be more pronounced in aged laying hens. In this way, de Witt et al. (2009) did not observe an effect of CL (2.9 mm) on bone strength before 66 wk of age. Thus, in the current study, the absence of an effect may have been due to the young age of the birds.

To conclude, this study demonstrates that using CL as a Ca source compared with FL improves the digestive utilization of P and Ca in phytase formulated diets maintaining performance and bone characteristics in a short-term. Further studies are needed to elucidate the underlying mechanisms in a dynamic way and the overall P excretion. Then, mineral requirements can be refined and nutritional strategies based on precision feeding implemented (*i.e.*, “chrono-nutrition”).

Tableau 16 : Ingredients, calculated and analyzed nutrient levels, and phytase activities of experimental diets.[1]

	0 FTU		300 FTU	
	FL	**MIX**	**FL**	**MIX**
Ingredients (g/kg)				
Corn	532	532	537	537
Wheat	100	100	100	100
Soybean meal (46% CP)	240	240	240	240
Soybean oil	20	20	18.4	18.4
Corn gluten meal	5.3	5.3	5.3	5.3
Fine limestone[2]	83.7	21	87.5	22
Coarse limestone[3]	0	62.7	0	65.5
Monocalcium phosphate[4]	10.3	10.3	3.1	3.1
Phytase[5]	0	0	0.0091	0.0091
NaCl	3	3	3	3
Layer premix[6]	4	4	4	4
DL−Methionine	1.7	1.7	1.7	1.7
Nutrient composition (%)[7]				
Calculated values[8]				
DM	89	89	89	89
ME (kcal/kg)	2,749	2,749	2,751	2,751
CP	17.1	17.1	17.1	17.1
Dig. Lys	0,73	0,73	0,73	0,73
Dig. Met	0,25	0,25	0,25	0,25
Ca	3.50	3.50	3.50	3.50
*t*P	0.56	0.56	0.39	0.39
NPP	0.34	0.34	0.18	0.18
PP	0.22	0.22	0.16	0.16
*a*P	0.30	0.30	0.30	0.30
Analyzed values				
DM	89.7	89.7	89.9	89.9
CP	17.3	17.8	17.8	17.7
Ca	3.52	3.68	3.58	3.49
*t*P	0.55	0.52	0.38	0.39
PP	0.20	0.16	0.19	0.19
Phytase activity (FTU/kg)	85	45	373	293

[1]FL, fine limestone (< 0.5 mm); MIX, mix of 25 % fine limestone and 75 % coarse limestone (2−4 mm); 0, diet without phytase and 0.34 % NPP; 300, diet with 300 FTU/kg phytase and 0.18 % NPP

[2]Fine limestone was < 0.5 mm (geometric mean diameter = 0.21 ± 0.17 mm) and was obtained by grinding coarse limestone particles.

[3]Coarse limestone was between 2 and 4 mm (geometric mean diameter = 2.76 ± 0.13 mm). Calcium content in limestone was 38 % Ca, according to producer.

[4]Monocalcium phosphate contained 17.0 % Ca, and 22.7 % P, according to producer.

[5]Phytase was a novel biosynthetic bacterial 6-phytase produced by *Trichoderma reesei* (Rovabio PhyPlus, Adisseo France SAS, Commentry, France).

[6]Layer premix contains the following, expressed per kilogram: vitamin A = 2,500,000 UI; vitamin D3 = 860,000 UI; vitamin E = 20,000 UI; vitamin K3 = 1,000 mg; vitamin B1 = 1,000 mg; vitamin B6 = 1,600 mg; pantothenic acid = 5,000 mg; vitamin B6 = 1,400 mg; vitamin B12 = 5.2 mg; vitamin PP = 20,000 mg; folic acid = 600 mg; biotin = 60 mg; Cu = 3,200 mg; Fe = 10,000 mg; Zn = 14,000 mg; Mn = 16,000 mg; I = 400 mg; Se = 40 mg.
[7]DM, dry matter; ME, metabolizable energy; CP, crude protein; *t*P, total P; NPP, non-phytate P; *a*P, available P; PP, phytic P.
[8]Calculated values of nutrients based on INRA-AFZ tables (2017).

Tableau 17 : Proportion of particle size distribution for fine limestone, coarse limestone, and mixed limestone (75 % coarse and 25 % fine).

Sieve diameter (mm)	**FL[1]**	**CL[2]**	**MIX[3]**
>3.35	0	29.5	22.3
>2.36 to 3.35	0	34.5	23.9
>2.00 to 2.36	0	22.6	18.2
>1.70 to 2.00	0	13.2	10.2
>0.60 to 1.70	2.3	0.2	0.8
>0.30 to 0.60	26.3	0	5.8
>0.15 to 0.30	30.8	0	7.9
<0.10	40.6	0	10.9
Geometric mean diameter (mm)	**0.21**	**2.76**	**1.36**
Geometric standard deviation (mm)	**0.17**	**0.13**	**0.32**

[1]FL, Fine Limestone.
[2]CL, Coarse Limestone.
[3]MIX, mixed limestone particles with 75 % CL and 25 % FL.

Tableau 18 : Effect of phytase and limestone particle size on average daily feed intake, feed conversion ratio, egg production, egg weight, and egg mass.[1]

	ADFI[2] (g/day)	FCR[3]	Final body weight (g)	Egg production (%)	Egg weight (g)
Treatment[4]					
FL0	101.9 ± 1.05	1.64 ± 0.019	1,785 ± 49.6	94.1 ± 8.6	62.8 ± 0.46^{b}
MIX0	101.8 ± 0.91	1.57 ± 0.021	1,796 ± 43.4	95.4 ± 7.5	64.0 ± 0.55^{ab}
FL300	103.8 ± 0.88	1.60 ± 0.022	1,780 ± 39.3	96.1 ± 7.3	65.1 ± 0.54^{a}
MIX300	101.3 ± 1.09	1.57 ± 0.021	1,882 ± 57.7	93.6 ± 8.9	63.9 ± 0.41^{ab}
Phytase					
0	101.8 ± 0.69	1.60 ± 0.015	1,790 ± 32.6	94.7 ± 8.1	63.4 ± 0.36^{b}
300	101.9 ± 0.70	1.58 ± 0.015	1,835 ± 36.7	94.8 ± 8.4	64.5 ± 0.34^{a}
LmPS					
FL	102.8 ± 0.69	1.62 ± 0.015^{a}	1,782 ± 31.9	95.1 ± 8.0	63.9 ± 036
MIX	101.2 ± 0.71	1.57 ± 0.015^{b}	1,840 ± 36.6	94.5 ± 8.5	63.9 ± 0.34
Source of variation			*P-value*		
Phytase	0.976	0.332	0.356	0.276	0.015
LmPS	0.179	0.023	0.235	0.151	0.888
Phytase × LmPS	0.275	0.077	0.392	0.231	0.021

[1]Mean values of 18 replicates of 1 hen once per week during 4 weeks for each treatment ± standard error of the mean (SEM).
[2]ADFI, Average Daily Feed Intake.
[3]FCR, Feed Conversion Ratio.
[4] FL, fine limestone (< 0.5 mm); MIX, mix of 25 % fine limestone and 75 % coarse limestone (2−4 mm); 0, diet without phytase and 0.34 % NPP; 300, diet with 300 FTU/kg phytase and 0.18 % NPP.
[5]LmPS, Limestone particle size.
$^{a-b}$: Means within a column with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$), based on Tukey's HSD means separation. Except for egg production, where different superscripts differ significantly ($P < 0.05$), based on Dunn test (with a Bonferroni correction for the *p*-value) means separation.

Tableau 19 : Effect of phytase and limestone particle size on eggshell proportion, eggshell weight, eggshell thickness, and eggshell breaking strength.[1]

	Eggshell proportion (%)	Eggshell weight (g)	Eggshell thickness (mm)	Eggshell breaking strength (kg)
Treatment[2]				
FL0	9.18 ± 0.086^{b}	5.72 ± 0.055^{b}	0.357 ± 0.0030^{b}	4.72 ± 0.099^{b}
MIX0	9.78 ± 0.088^{a}	6.12 ± 0.073^{a}	0.373 ± 0.0033^{a}	5.07 ± 0.100^{ab}
FL300	9.47 ± 0.087^{bc}	6.13 ± 0.057^{a}	0.366 ± 0.0029^{ab}	5.03 ± 0.105^{ab}
MIX300	9.54 ± 0.064^{ab}	6.09 ± 0.045^{a}	0.365 ± 0.0021^{ab}	5.23 ± 0.077^{a}
Phytase				
0	9.50 ± 0.067	5.92 ± 0.050^{b}	0.366 ± 0.0024	4.89 ± 0.072^{b}
300	9.49 ± 0.051	6.10 ± 0.036^{a}	0.366 ± 0.0017	5.15 ± 0.063^{a}
LmPS[3]				
FL	9.34 ± 0.063^{b}	5.94 ± 0.044^{b}	0.362 ± 0.0021^{b}	4.89 ± 0.074^{b}
MIX	9.67 ± 0.053^{a}	6.11 ± 0.039^{a}	0.369 ± 0.0018^{a}	5.17 ± 0.061^{a}
Source of variation			*p-value*	
Phytase	0.960	< 0.001	0.884	0.005
LmPS	< 0.001	0.002	0.025	0.006
Phytase × LmPS	< 0.001	0.005	0.003	0.002

[1]Mean values of 18 replicates of 1 hen once per week during 4 weeks for each treatment ± standard error of the mean (SEM).
[2]FL, fine limestone (< 0.5 mm); MIX, mix of 25 % fine limestone and 75 % coarse limestone (2–4 mm); 0, diet without phytase and 0.34 % NPP; 300, diet with 300 FTU/kg phytase and 0.18 % NPP.
[3]LmPS, Limestone Particle Size.
$^{a-b}$: Means within a column with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$), based on Tukey's HSD means separation.

Tableau 20 : Effect of phytase and limestone particle size on tibia breaking strength, tibia elasticity, tibia ash, and tibia ash weight.[1]

	Tibia breaking strength (N)	Elasticity (mm)	Tibia ash (%)	Ash weight (g)
Treatment[2]				
FL0	94.1 ± 3.53	1.73 ± 0.066	49.8 ± 0.49	2.95 ± 0.073
MIX0	91.8 ± 3.02	1.73 ± 0.057	49.6 ± 0.54	2.77 ± 0.052
FL300	88.1 ± 2.78	1.74 ± 0.066	49.2 ± 0.66	2.77 ± 0.063
MIX300	87.9 ± 2.76	1.61 ± 0.030	49.4 ± 0.41	2.82 ± 0.063
Phytase				
0	92.7 ± 2.63	1.73 ± 0.043	49.7 ± 0.35	2.87 ± 0.046
300	88.0 ± 1.92	1.68 ± 0.039	49.3 ± 0.38	2.79 ± 0.044
LmPS[3]				
FL	90.8 ± 2.51	1.73 ± 0.046	49.5 ± 0.41	2.86 ± 0.050
MIX	90.1 ± 2.06	1.67 ± 0.034	49.5 ± 0.33	2.79 ± 0.041
Source of variation		*p-value*		
Phytase	0.082	0.354	0.113	0.207
LmPS	0.785	0.241	0.443	0.201
Phytase × LmPS	0.339	0.300	0.197	0.277

[1]Mean values of 18 replicates of 1 hen for each treatment ± standard error of the mean (SEM).
[2]FL, fine limestone (< 0.5 mm); MIX, mix of 25 % fine limestone and 75 % coarse limestone (2−4 mm); 0, diet without phytase and 0.34 % NPP; 300, diet with 300 FTU/kg phytase and 0.18 % NPP.
[3]LmPS, Limestone particle size.

Tableau 21 : Effect of phytase and limestone particle size on P and Ca intake, apparent pre-caecal digestibility of P and Ca, and digestible P and Ca of feed.

	Mineral intake (g/day)		APCD (%)[3]		PP disappearance
	Ca[2]	P[1]	Ca	P	(%)[4]
Treatment[5]					
FL0	3.71 ± 0.09	0.55 ± 0.012	75.6 ± 1.89^{b}	48.6 ± 2.32^{a}	49.58 ± 9.47^{b}
MIX0	3.87 ± 0.13	0.53 ± 0.021	80.9 ± 2.21^{ab}	45.6 ± 2.93^{a}	50.57 ± 5.12^{b}
FL300	3.71 ± 0.09	0.41 ± 0.010	75.9 ± 1.87^{b}	34.9 ± 2.62^{b}	59.72 ± 8.93^{b}
MIX300	3.71 ± 0.10	0.41 ± 0.013	82. 9 ± 2.19^{a}	41.5 ± 2.84^{ab}	80.64 ± 8.37^{a}
Phytase					
0	3.78 ± 0.066	0.55 ± 0.012^{a}	78.2 ± 1.56	47.3 ± 1.86^{a}	50.04 ± 5.53^{b}
300	3.71 ± 0.082	0.41 ± 0.008^{b}	78.9 ± 1.62	39.1 ± 1.98^{b}	71.14 ± 6.38^{a}
LmPS[6]					
FL	3.71 ± 0.079	0.47 ± 0.016	74.5 ± 1.32^{b}	41.4 ± 2.09	53.98 ± 6.55
MIX	3.78 ± 0.070	0.53 ± 0.017	80.3 ± 1.54^{a}	43.7 ± 2.05	66.26 ± 5.85
Source of variation			*p-value*		
Phytase	0.317	<0.001	0.735	<0.001	0.004
LmPS	0.342	0.945	<0.001	0.341	0.085
Phytase × LmPS	0.329	0.491	0.002	<0.001	0.005

[1]Mean values of 17, 17, 16 and 14 replicates of 1 hen for treatment FL0, MIX0, FL300 and MIX300, respectively ± standard error of the mean (SEM).

[2]Mean values of 14, 15, 17 and 14 replicates of 1 hen for treatment FL0, MIX0, FL300 and MIX300, respectively ± standard error of the mean (SEM).

[3]APCD, Apparent Pre-Caecal Digestibility.

[4]Mean values of 7, 6, 5 and 6 replicates of 1 hen for the treatment FL0, MIX0, FL300 and MIX300, respectively ± standard error of the mean (SEM).

[5]FL, fine limestone (< 0.5 mm); MIX, mix of 25 % fine limestone and 75 % coarse limestone (2–4 mm); 0, diet without phytase and 0.34 % NPP; 300, diet with 300 FTU/kg phytase and 0.18 % NPP.

[6]LmPS, Limestone Particle Size.

$^{a-b}$: Means within a column with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$) based on Tukey's HSD means separation

CHAPITRE 3

Quantification des paramètres de l'utilisation digestive du calcium et du phosphore chez la poule pondeuse

Effect of limestone particle size and microbial phytase addition on phosphorus and calcium digestive utilization along the gastrointestinal tract

Hervo, F., M.-P., Letourneau-Montminy, B., Méda, and A., Narcy.

En préparation pour une soumission dans British Poultry Science.

Résumé

Les chapitres précédents ont permis de définir et d'étudier les principaux leviers nutritionnels qui permettraient d'optimiser l'utilisation digestive du Ca et du P. Le paramétrage d'un modèle mécaniste compartimental repose sur la quantification de flux de matière entre deux compartiments ou plus. Dans un modèle digestif, les compartiments représentent les différents organes du tractus gatro-intestinal (TGI) et le flux de matière entre ces derniers représente l'avancée du bol alimentaire le long du TGI. Au niveau de l'intestin, une partie des minéraux sera absorbée et chaque segment intestinal présente une capacité propre à absorber le Ca ou le P. Concernant le transit intestinal, les données disponibles dans la littérature sont majoritairement issues d'études réalisées chez le poulet de chair. De plus, les données disponibles chez la poule pondeuse ne considèrent pas l'effet du $CaCO_3$ particulaire sur le transit des minéraux le long tu TGI. Pour ce qui est des données d'absorption de minéraux en fonction du segment, peu de données sont disponibles et les données ne sont pas forcément à jour.

L'objectif du présent travail était de quantifier certains paramètres mécanistes intervenant dans les processus d'utilisation du Ca et du P chez la poule pondeuse, tels que le temps moyen de rétention (TMR) ou encore des coefficients digestibilité apparente par segment intestinal. Pour ce faire, soixante-douze poules pondeuses de 30 semaines ont été réparties aléatoirement dans l'un des quatre régimes expérimentaux. Suivant un schéma factoriel en 2 × 2, les régimes expérimentaux présentaient deux niveaux d'incorporation de larges particules de $CaCO_3$ (LP) : 0 ou 75 % (complétés par 100 ou 25 % de fines particules de $CaCO_3$ (FP), respectivement), sans phytase microbienne ou avec 300 FTU/kg. Suite aux quatre semaines d'expérimentation, le contenu digestif des différents segments du TGI a été prélevé afin de déterminer le TMR de la MS et le recouvrement du Ca et P (par rapport à l'ingéré, sur base de MS) dans tous les segments et les coefficients de digestibilité apparente du Ca et du P dans les différents segments intestinaux.

Le TMR de la MS est rapide dans les différents segments : 27, 15, 3, 32 et 55 minutes dans le jabot, le gésier, le duodénum, le jéjunum et l'iléon, respectivement. L'incorporation de carbonate de Ca particulaire réduit le TMR de la MS dans le jabot de 50 % chez les poules recevant un régime sans phytase microbienne mais ne montre pas d'effet chez les poules recevant un régime avec phytase microbienne (Phytase × LP ; $P < 0,05$). Au niveau du jéjunum, l'incorporation de $CaCO_3$ particulaire augmente de TMR de la MS de façon plus importante

chez les poules recevant un régime avec phytase microbienne, comparativement aux poules recevant un régime sans phytase microbienne (Phytase × LP ; $P < 0,05$) : + 42 et +15 %, respectivement. L'incorporation de LP augmente le recouvrement du Ca (g/kg MSI) dans le jabot et le gésier de façon plus importante chez les poules recevant un régimes sans phytase microbienne relativement aux poules recevant un régime avec phytase microbienne (Phytase × LP ; $P < 0,001$) : +115 et +68 % dans le jabot et +1765 et +779 % dans le gésier pour les régimes sans et avec phytase microbienne, respectivement. L'incorporation de LP diminue le recouvrement du P (g/kg MSI) dans le jabot et le gésier de façon plus importante dans les régimes contenant de la phytase microbienne comparativement aux régimes sans phytase microbienne (Phytase × LP ; $P < 0,001$) : −16 et −8 % dans le jabot et −16 et−26 % dans le gésier pour les régimes avec et sans phytase microbienne, respectivement. Au niveau du jéjunum et de l'iléon, le recouvrement du P est significativement plus bas dans les régimes MIX300 comparativement aux autres régimes (Phytase × LP ; $P < 0,05$) : 2,30 et 3,19 g/kg MSI dans le jéjunum et 1,91 et 2,87 g/kg MSI dans l'iléon pour le régime MIX300 et les autres régimes, respectivement. Cette étude confirme que le Ca et le P sont principalement absorbés dans la partie proximale de l'intestin, et que le jéjunum est le principal site d'absorption : 28 et 56 % en moyenne, pour le P et le Ca, respectivement. Il apparait que, malgré un comportement différent dans le jabot et le gésier dépendamment de l'incorporation de LP, la cinétique d'absorption des minéraux au niveau intestinal soit peu affectée par le régime. De façon très intéressante cette étude semble indiquer que l'hypothèse selon laquelle Ca et P suivraient le même schéma de transit que la MS le long du TGI ne soit pas correcte.

Abstract

Digestive utilization of phosphorus (**P**) and calcium (**Ca**) is related to their solubilization, the hydrolysis of phytate, their passage rate along the gastrointestinal tract (**GIT**) and to their absorption rate along the intestine. To improve P and Ca availability of the diet, it appears essential to better understand the fate of these minerals in the GIT of the laying hen in regards with diet composition. Is this purpose, this study assed the effect of limestone particle size and microbial phytase incorporation on different digestive traits in laying hen. Seventy-two hens were used in a randomized complete block design according to a 2 × 2 factorial arrangement to evaluate the effect of two coarse limestone (**CL**) inclusion, *i.e.* a mix (**MIX**) of 75 % CL (2−4 mm) and 25 % fine particles (**FL**, < 0.5 mm) or 100 % FL, in two different basal diets formulated without (MIX0 and FL0) or with 300 FTU of phytase/kg diet (MIX300 and FL300). At the end of the trial, digesta of the crop, gizzard, duodenum, jejunum and ileum were kept to determine the mean retention time (**MRT**) of dry matter (**DM**) and the recovery rate (g/kg DM intake) of Ca and P in each segment of the GIT and the apparent digestibility coefficient (**AD**) of Ca and P in each intestinal segment. The DM MRT decreased with CL incorporation in hens fed without phytase only (LmPS × Phytase; $P < 0.05$). In the crop and the gizzard, P recovery decreased with CL incorporation in a greater extent in hens fed phytase (LmPS × Phytase; $P < 0.05$). In the crop and the gizzard, Ca recovery increased with CL incorporation in a greater extent in hens fed without phytase (LmPS × Phytase; $P < 0.05$). The AD of P and Ca along the intestine did not differ among dietary treatment, and the jejunum appeared the main place of mineral absorption. This study showed that CL incorporation improve mineral utilization in the proximal part of the GIT.

Introduction

In poultry production, efficient utilization of phosphorus (**P**) is crucial from an environmental and economical perspective (Abbasi et al., 2019). In laying hens, special emphasis was paid to calcium (**Ca**) because of the high demand for eggshell formation. However, even if the P requirement for the eggshell is low (Suttle, 2010), dietary P must be adjusted with care to optimize performance and skeletal integrity (Rodehutscord et al., 2023). In the body, P and Ca are intimately linked in bone where they are stored together in the form of hydroxyapatite. Calcium is mainly supplied by the diet (Nys, 2017) but during the active phase of eggshell formation occruing in the dark period, feed intake and consequently Ca intake is nul. Medullary bone (**MB**) which is a special endosteal tissue specific to laying hens, acts as a labile Ca reservoir and is resorbed to answer to the high Ca demand during eggshell formation. This process leads to the simultaneous release of P which is excreted through the urine (Manangi et al., 2018). During the periods of non-eggshell formation, the metabolism favors the restoration of bone reserves (Etches, 1987).

Mineral availability for egg production depends on their kinetics of absorption along the gastrointestinal tract (**GIT**). To our knowledge, the digestion kinetics of P and Ca has not been extensively studied in laying hens. Their overall kinetics is related to their solubilization, which occurs mostly in the acidic condition of the gizzard (Zhang and Coon, 1997*a*), to the hydrolysis of phytate (Angel et al., 2002), a storing form of P for the plant, to their passage rate along the GIT and to their absorption rate (Hurwitz and Bar, 1965). All these processes are strongly dependent of the diet composition. Microbial phytase, an enzyme widely used in poultry diets, hydrolyses phytate in the digestive tract and releases phosphates. In addition, nutrients can interact with each other and affect their availability to the animal. In particular, Ca can form *de novo* complex with phytic acid under certain pH condition (*i.e.*, pH ≥ 5.0; Humer et al., 2015). These Ca−phytate complexes reduce the efficiency of phytase to release P from phytic acid (Walk et al., 2012). In laying hens, coarse particles of limestone (*i.e.*, ≥ 0,8 mm) are used in combination with fine limestone. Coarse particles are stored in the gizzard (Rao et al., 1992) and release soluble Ca progressively to the intestine. Such a strategy is especially interesting during the night to cover the high Ca demand for the eggshell (Saunders-Blades et al., 2009). According to recent findings, coarse particles enhance the effect of phytase compared with fine particles improving the pre-caecal digestibility of P (Hervo et al., 2023). Calcium from coarse particles is less susceptible to form *de novo* complexes with phytic acid improving the hydrolysis of phytate (Kim et al., 2018). In this regard, the crop and the gizzard play a major

role in the digestive utilization of P and Ca as they represent main sites of activity of microbial phytase (Gao et al., 2013). Both flows of Ca and P arriving in the small intestine (**SI**) mainly depends on all processes taking place in the proximal part of the GIT. Then, the absorption of Ca and P takes place in the duodenum and the jejunum (Hurwitz et al., 1973). The capacity of the intestine to absorb minerals depends on the transit time and the absorption capacity in each intestinal segment and on the availability of minerals. The acidic pH of the digesta is rapidly buffered at the beginning of the SI due to biliary and pancreatic secretions. In these conditions of increasing pH, Ca can precipitate with phosphate or phytic acid inhibiting its absorption (Hurwitz and Bar, 1971; Selle et al., 2009).

The aim of the present work was to compare the effect of coarse *vs* fine particles of limestone on the kinetics of P and Ca along the digestive tract of hens using diets formulated with or without microbial phytase. It was hypothesized that the kinetics of absorption of P is faster in the presence of coarse limestone particles than with fine particles.

Materials and methods

The experiment was conducted under the guidelines of the French Ministry of Agriculture for Animal Research at the Experimental Poultry Unit of Tours, INRAE, Nouzilly, France (PEAT INRAe 1295; doi.org/10.15454/1.5572326250887292E12). The experimental design was approved by the Regional Ethics Committee on animal experimentation (Tours, France) and the French Ministry of Higher Education and Research (Paris, France; authorization: APAFIS #32000-202 1061008462021 v3).

Animal housing and management

During the pre-experimental period, *i.e.*, from 18 to 25 weeks of age, seventy-two laying hens (Lohmann Tradition, Lohmann, Saint-Fulgent, France) were raised in collective cages. During this period, animals received a commercial diet containing 3.4 % Ca and 0.34 % available P (***a*P**) (Lohmann, 2020). At 26 weeks of age, laying hens were transferred in individual cages, for a 5−weeks adaptation period prior a 4−weeks experimental period from 31 to 35 weeks of age. During all the experimental period, hens were provided with 16h of light per day (from 6 a.m. to 10 p.m.), and temperature was maintained between 18 and 20°C.

Experimental treatments and diets

Four experimental corn and wheat-based diets (Tableau 22) were formulated and distributed as mash form in a randomized complete block design according to a 2 × 2 factorial arrangement to assess the effect of coarse limestone (**CL**) inclusion which was a mix (**MIX**) of

75 % CL (2−4 mm) and 25 % fine particles (**FL**, < 0.5 mm) or 100 % FL, in two different basal diets formulated without (**MIX0** and **FL0**) or with 300 FTU of phytase/kg diet (**MIX300** and **FL300**). Diets contained equivalent levels of Ca (3.5 %) and *a*P (0.3 %) considering the P equivalency of phytase in MIX300 and FL300 diets. A total of 72 laying hens were randomly allotted to one of the four experimental treatment, with 18 replications per treatment. To avoid source effect of the limestone, FL were grinded from CL. Phytase used in this trial was a novel biosynthetic bacterial 6−phytase produced by *Trichoderma reesei* (Adisseo France SAS, Commentry, France). To evaluate the nutrient digestibility and the mean retention time (**MRT**), titanium dioxide (**Ti**) was added to the diet at 5.0 g/kg for the 10 lasts days. Feed and water were offered *ad libitum*.

Sample collection

At 35 weeks of age, hens were synchronized on their oviposition; they were fasted from the previous evening (10 p.m.) to the time of laying the day of sampling. Then, from the lay (t lay = t0), feed was re-supplied and hens were euthanized at t +4 h by injection of sodium pentobarbital. The GIT was removed and divided into 5 segments: crop, proventriculus + gizzard (named gizzard for the remaining of the article), duodenum, jejunum and ileum. The Meckel's diverticulum was defined as the frontier between the jejunum and the ileum. Proventriculus and gizzard were not separated because feed pass rapidly through the proventriculus, also it did not contain enough feed (Svihus, 2011). In each segment, pH was measured and digesta of each intestinal section was flushed to determine the MRT of dry matter (**DM**) and the apparent digestibility of Ca and P along the intestine. Digesta were frozen at –20 °C prior freeze-drying for 72 h and were then stored for further analysis.

Chemical analysis

Diets and digesta of each segment were analyzed for Ca, total P (***t*P**) and Ti concentration using inductively plasma optical emission spectrometry (ICP OES Thermoscientific^{TM} iCAP^{TM} 7200, Courtaboeuf, France; method 990.08; AOAC International, 2006). Diets were analyzed for phytase activity (Adisseo France SAS, Commentry, France) and for DM and crude protein by near-infrared-spectroscopy, with a Büchi NIRFlex N-500 spectrometer (Büchi SARL, Vellibon-sur-Yvette, France).

Calculations and statistical analysis

The mean retention time (min) of the DM of the i^{th}segment of the GIT was calculated, according to van der Klis et al. (1990), as follow:

$$MRT_{DM,i} = Time \times \frac{[Ti]_i \times W_i}{DM\ intake \times [Ti]_{diet}}$$

Where Time (min) is the duration of the meal before sampling, DM intake is the quantity of feed ingested during the meal period (g/kg DM) and W_i is the weight of freeze-dried digesta in the ith segment (g). $[Ti]_i$ and $[Ti]_{diet}$ represent the Ti concentrations (g/k DM) in the digesta of the ith segment and the diet, respectively.

The recovery of P and Ca, in g/kg DM intake (**DMI**) was calculated in each segment of the GIT, according to Metzler et al. (2009), as follow:

$$Recovery\ of\ nutrient\ (g/kg\ of\ DMI) = [nutrient]_i \times (\frac{[Ti]_{diet}}{[Ti]_i})$$

Where $[nutrient]_i$ is the P or Ca content in the ith segment (g/kg DMI) and $[Ti]_{diet}$ and $[Ti]_i$ are the Ti concentration (g/kg DM) in the diet and the ith segment, respectively.

In each intestinal segment, the apparent digestibility coefficient (**AD**, %) of P and Ca was calculated as follow:

$$Apparent\ Digestibility_{nutrient} = 100 \times [1 - \left(\frac{[nutrient]_i}{[nutrient]_{diet}} \times \frac{[Ti]_{diet}}{[Ti]_i}\right)]$$

Where $[nutrient]_i$ and $[Ti]_i$ are the minerals and Ti concentrations (g/kg DM) in freeze-dried digesta of the ith segment, respectively and $[nutrient]_{diet}$ and $[Ti]_{diet}$ are minerals and marker concentrations in the diet (g/kg DM), respectively.

The relative apparent nutrient digestibility (**AD_t**; % AD_{max}) up to the end of the ileum was calculated by relating the cumulative AD for Ca and P up to the ith segment of the small intestine (SI) to the cumulative MRT of DM up to that segment according to Orskov and McDonald (1979), using an exponential function, as follow:

$$AD_t = AD_{max} \times (1 - e^{-kt})$$

Where AD_t (%) is the relative apparent digestibility of Ca and P (%), at time t; AD_{max} is the maximal value of apparent digestibility coefficient of Ca and P at the ileal level; and k is the rate constant of DM through the SI, calculated as $1/MRT_{DM}$. The AD_{max} represents the apparent pre-ceacal digestibility of P and Ca, thus the AD_t represents the relative mineral digestibility in relation to the pre-ceacal digestibility. The equation was fitted according to a non-linear procedure on R, using the *drc* package and parameters (V_i and t½) were thus estimated. With

V_i the initial velocity of nutrient absorption, and t½ the time needed to reach the half of AD_{max}. The maximal digestible Ca and P (g/kg DM) of each diet has been calculated by multiplying the cumulative AD_{max} of Ca or P up to the ileum (%) by the Ca or P content of the diet (g/kg DM).

Statistical analysis was performed using R software, version 3.02 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). All data were tested for normality according to a Shapiro-Wilk test. A randomized block design was used, with a total of 18 blocks of 4 cages, with a 2 × 2 factorial arrangement. For each dependent variable, experimental unit was the individual animal and the block effect of the experimental design was considered as cofactor. Because of high variability of the data and a non-normal distribution, outliers (*i.e.* > ±2.5 SD) were removed from the analysis. Two-way ANOVA was used to determine the effect of phytase, limestone particle size as well as their interaction. Tukey's range test was used to compare multiple means comparisons. When data were unbalanced (inequality between group), analysis results were confirmed according to a non-parametric Kruskal-Wallis test. A Dunn test with a Bonferroni correction for the *p*-value was used for multiple means comparisons. Statistical significance was considered when $P < 0.05$, and trend was reported when $0.05 \leq P < 0.10$.

Results

The pH of the crop, the duodenum and the jejunum were unaffected by dietary treatment (Tableau 23). In the gizzard, hens receiving FL increased the pH in diets with microbial phytase only (+6.2 %; Phytase × LmPS, $P > 0.05$). In hens receiving MIX, microbial phytase decreased the ileal pH by 6.5 % (Phytase × LmPS, $P < 0.05$).

The average MRT of DM from all experimental diets in the crop, the gizzard, the duodenum, the jejunum and the ileum were 28 ± 2.4, 15 ± 0.8, 4 ± 0.3, 32 ± 1.8 and 54 ± 2.8 minutes (mean ± SEM), respectively (Tableau 24). The MRT of DM from all experimental diets was 133 ± 4.3 and 90 ± 3.8 minutes in average for GIT and SI, respectively (data not shown). Incorporation of coarse limestone significantly reduced the MRT of DM in the crop of hens fed without phytase (Phytase × LmPS, $P < 0.05$). In the jejunum, incorporation of coarse limestone significantly increased the MRT of DM in a greater extent for hens fed with phytase compared with hens fed without phytase: +42 and +15 %, respectively (Phytase × LmPS, $P < 0.05$). In the ileum, the MRT of DM tended to be lower in the FL300 compared with other treatments (Phytase × LmPS, $P = 0,07$). In the overall SI, the MRT of DM

of the FL300 diet was significantly lower than the FL0 and MIX300 diets (Phytase × LmPS, $P < 0.05$).

In the crop and the gizzard, coarse limestone incorporation decreased the recovery of P in a greater extent in hens fed diets with phytase compared with those fed diets without phytase: −8 and −16 %, respectively, in the crop and −16 and −26 %, respectively, in the gizzard (Phytase × LmPS, $P < 0.05$. Tableau 24). In the jejunum and the ileum, incorporation of coarse limestone particles decreased the P recovery in hens fed with phytase: −32 and −37 %, respectively (Phytase × LmPS, $P < 0.05$). In the crop, incorporation of coarse limestone increased the Ca recovery by 115 % in hens fed without phytase and by 68 % in hens fed with phytase (Phytase × LmPS, $P < 0.001$) (Tableau 25). Same observation in the gizzard where coarse limestone particles increased the recovery of Ca from 41 to 759 g/kg DMI in hens fed without phytase and from 45 to 395 g/kg DMI in hens fed with phytase (Phytase × LmPS, $P < 0.001$). In the duodenum, however, coarse limestone inclusion increased the Ca recovery in a greater extent for hens fed with phytase compared with hens fed without phytase (Phytase × LmPS, $P < 0.001$). No difference was observed in the jejunum or the ileum for the Ca recovery.

The apparent digestibility coefficient per SI segment of P and Ca are presented in Tableau 26. For the P, the apparent digestibility coefficient was 3.7 ± 2.7, 27.8 ± 3.3 and 6.1 ± 1.6 % (mean ± SEM) for the duodenum, jejunum and ileum, respectively. No significant differences were observed between dietary treatment. For the Ca, the apparent digestibility coefficient was 16.1 ± 4.6, 53.6 ± 4.8 and 6.1 ± 1.8 % (mean ± SEM) for the duodenum, jejunum and ileum, respectively with no significant differences between dietary treatment.

Calcium showed a faster absorption kinetics than the P (Figure 47) and lower half-absorption time (t½): 11 and 29 minutes in average for Ca and P, respectively (Tableau 27). The Ca absorption rate were 0.102, 0.048, 0.081 and 0.065 min^{-1} for the FL0, MIX0, FL300 and MIX300 diet, respectively. The maximal digestible Ca ranged from 22.9 for FL0 to 29.5 g/kg for MIX300, with no effect of the dietary treatment. The P absorption rate were 0.039, 0.036, 0.014 and 0.027 min^{-1} for the FL0, MIX0, FL300 and MIX300 diet, respectively. The maximal digestible P ranged from 1.1 for FL300 to 2.7 g/kg for FL0.

Discussion

In laying hens, the gizzard plays a central role in the regulation of P and Ca flows and solubilization (Guinotte et al., 1995; Angel et al., 2002). The current results showed that dry

matter passed rapidly through the crop and the gizzard and are consistent with those of van Krimpen et al. (2011). Interestingly, the MRT in the crop was lower when using MIX0 compared to FL0 illustrating a stimulation of its emptying attributable to coarse particles (Chaplin et al., 1992). The absence of effect of dietary treatments on the MRT in the gizzard was not expected given the known specific retention of coarse particles reported in the literature. Svihus et al. (2002) mentioned that a significant proportion of fine particles of the digesta pass through the gizzard within 30 minutes. To pass through the pylorus, coarse particles have to be finely grinded (Hetland et al., 2002) and are generally selectively retained in the gizzard (Svihus, 2011). Moore (1999) noticed that independently of their initial size, particles were homogeneously ground in the gizzard. Amerah et al. (2008) reported that the main part of particles entering into the duodenum were smaller than 0.1 mm, while Scott et al. (1971) described that Ca particles less than 1 mm are able to pass through the pylorus. This last observation was confirmed in the present study where particles with a geometric mean diameter of 1 mm were found in the duodenum (data not shown). In the present study, four hours after feeding, the Ca recovery in the gizzard of the MIX0 and MIX300 diets was 18 and 9-fold higher than the respective FL diets. This observation was in accordance with Rao et al. (1992) who reported that after 24 h, 4 % of Ca were recovered in the gizzard of laying hens fed FL (0.78 mm), while 20 % were recovered in those fed CL (1.60 mm). These results are inconsistent with the absence of effect of the diet on the MRT in the gizzard and point out a specific aspect related to the methodology employed. The determination of the MRT assumes that Ti, as a marker of the solid phase (Salles and Janssens, 2003), follows the transit of dry matter and that all nutrients follow the same pattern. In the case of Ca, coarse particles stay longer in the gizzard as proved by Ca recovery, and thus do not follow DM and Ti.

From previous results in hens, the effect of phytase on P apparent pre-caecal digestibility is higher when using a mix of coarse and fine limestone than fine limestone alone (Hervo et al, 2023). Additionally, according to these authors, the pre-caecal disappearance of phytate was higher in hens fed with the mix of coarse and fine limestone than those fed with fine limestone alone. These results were in accordance with studies in broilers (Kim et al., 2018; Li et al., 2021). Phytic acid has a higher capacity to chelate Ca from FL than CL forming unavailable complexes and reducing the release of P from phytate (Manangi and Coon, 2007). The crop and the gizzard seem to play a major role in this regard as the recovery of P is the lowest in those compartments in hens fed the MIX300 diet. This reflects a higher hydrolysis of phytate by phytase and a higher passage rate of P in the proximal GIT thanks to coarse particles.

A higher pH was observed in the gizzard with FL300. It can be due to the higher buffering capacity of FL compared to CL combined with the degradation of phytic acid which has acidogenic properties (Walk et al., 2012). The higher retention of coarse particles in the gizzard can also stimulate the activity and development of the gizzard (Biggs et Parsons, 2009; Roche and Martinoli, 1974, Mahdavi Sabati et al., 2019) as well as the release of H^+ and enzymes (Kheravii et al., 2018). The pH of the gizzard is also controlled by the crop through a mechanic action (Guinotte et al., 1995): the distension of the crop due to the bulking effect of coarse particles activates mechanoreceptors which in turn stimulates acidic secretion through the activation of H^+/K^+-ATPase in the proventriculus. In laying hens, inclusion of CL (> 1.2 mm) increases H^+/K^+-ATPase specific activity from 123 to 149 µmol/mg/h compared with FL (< 0.5 mm) (Guinotte et al., 1993). All of these processes favor digestion by particle size reduction and chemical degradation of nutrients. The higher grinding capacity of the gizzard may have favored the solubilization of minerals and their passage in the SI (Singh et al., 2014).

The gizzard can manage the flow of soluble Ca into the duodenum by selectively retaining CL (Rao and Roland, 1989; Scott et al., 1971). Moreover, its muscular activity drives the intestinal muscular activity (Roche et al., 1979). Duke (1986) specify that the muscular activity of the gizzard and the duodenum are coordinated. Thus, CL by affecting the gizzard motricity could regulate the transit flow of nutrient along intestinal segments (Hetland et al., 2004) and their absorption. As stated before, the determination of the mean retention time assumes that Ti is a marker of the solid phase following the transit of dry matter (Salles and Janssens, 2003). Nevertheless, coarse particles of limestone were specifically retained in the gizzard. Thus, due to this longer sequestration, Ti gastric emptying flow does not represent well the gastric emptying of particles (Svihus et al., 2002). Given that particles could be sedimented in the stomach (Browns et al., 1993) and that indigestible markers heterogeneously distributed throughout particulate matter (Siddons et al., 1985), coarse particles followed another pattern of emptying compared with fine particles and Ti. Thus, in the MIX diets, Ca absorption may be over-estimated, and values reported probably reflect more the absorption of fine Ca particles which pass rapidly through the gizzard. Based on this assumption, it can be deduced that limestone particle size affected more the fate of Ca throughout the crop and the gizzard than its absorption throughout the SI. The main part of P follows the transit of dry matter so it can be estimated that the calculation of the digestibility coefficient along the SI was reliable.

In laying hens, Ca is mainly absorbed in the proximal part of the SI (Adedokun and Adeola, 2013). Hurwitz et al. (1973) showed that during the no-eggshell formation state, 18, 21 and 1 % of Ca were absorbed in the duodenum, the jejunum and the ileum, respectively. These values are lower than those observed in the current study, where the average absorption among dietary treatments was 15, 52 and 7 % of Ca absorption in the duodenum, jejunum and ileum, respectively. This difference may be explained by the differential transit of coarse limestone throughout the gizzard as previously mentioned. According to several authors (Liu et al., 2016; Wasserman and Taylor, 1973), the duodenum presents a greater capacity to absorb Ca and P considering the short MRT of DM in this segment: 4 *vs* 32 min for duodenum and jejunum, respectively. Based on these observations, the duodenum presents a two-fold capacity to absorb Ca compared with jejunum: 3.8 %/minutes and 1.6 %/minutes, respectively. The Ca digestion kinetics was slowing down by CL incorporation in the diet, especially in the MIX0 diet ($k = 0.048$ min^{-1}) compared to FL diets ($k = 0.092$ min^{-1}). The inclusion of CL mainly acts as a regulator of Ca diffusion into the intestine.

In laying hens, the jejunum has been described as the main site of P absorption (Hurwitz and Bar, 1965). This is in accordance with the current results, where 48 % of P absorption took place in this segment. When considering the recovery of P into the duodenum (7.0 g/kg DMI), the greater concentration of P (g/kg DMI) in this segment compared with the feed (+70 %) may translate the endogenous P losses occurring in this segment. In laying hens, P endogenous losses are estimated at 0.34 g/kg DMI (Verardi et al., 2019). In broilers and laying hen, duodenum is supposed to have the greater capacity to absorb P compared with jejunum or ileum (Li et al., 2018; Liu et al., 2016). However, in the current study, due to short DM retention time and endogenous losses occurring in this segment, we cannot confirm this hypothesis. As mentioned before, FL promote the formation of unavailable Ca−phytate complexes, limiting the hydrolysis of PP into non-phytic P by phytase (Kim et al., 2018). This complex formation decreases P digestibility without affecting Ca digestibility in broilers (Li et al., 2021). Additionally, MRT along the SI with the FL300 diet was significantly lower than other diets. This lower transit time of digesta probably decreased the capacity of SI to absorb minerals. Together, these observations seem to indicate that a low dietary P with FL as Ca source is detrimental for the P utilization by the laying hen as previously showed in broilers (Kim et al., 2019).

From these data, it appeared that Ca is absorbed more rapidly than P along the SI, the t½ is two times lower for P compared to Ca. This result may be mitigated by the important endogenous P losses occurring in the duodenum, also virtually increasing the P absorption

kinetics up to the ileum. Additionally, these results indicate the greater capacity of the laying hen to absorb Ca than P, when regarding the maximal minerals absorption at the ileal level: 26.4 and 1.9 g/kg of diet in average for Ca and P respectively, representing 74 % and 41 % of the dietary mineral incorporation, respectively. However, the greater capacity of Ca uptake is virtually increase due to the longer retention of CL in the gizzard.

To conclude, this study showed that Ca provide as CL showed a different behavior in the crop and the gizzard compared with FL or P. The CL incorporation modified the gizzard activity which in turn improved the utilization of Ca and P. This study showed that minerals were rapidly absorbed in the intestine and that jejunum was the main place of absorption. This study also points out that Ca, P and DM do not follow the same pattern throughout the GIT. To asses the role of each intestinal segment in mineral absorption, the use of Ti as an indigestible marker does not appear completely suitable.

Tableau 22 : Ingredients and nutrient composition of the experimental diets.

	0FTU		300FTU	
	FP	**MIX**	**FP**	**MIX**
ingredients (g/kg)				
Corn	532	532	537	537
Wheat	100	100	100	100
Soybean meal (46 % CP)	240	240	240	240
Soybean oil	20	20	18.4	18.4
Corn gluten meal	5.3	5.3	5.3	5.3
Fine limestone[1]	83.7	21	87.5	22
Coarse limestone[2]	0	62.7	0	65.5
Monocalcium phosphate[3]	10.3	10.3	3.1	3.1
Phytase[4]	0	0	0.00906	0.00906
NaCl	3	3	3	3
premix Layer premix[5]	4	4	4	4
DL - Methionine	1.7	1.7	1.7	1.7
Nutrient composition[7]				
Calculated values (%)[8]				
DM	89.1	89.1	89.0	89.0
ME (kcal/kg)	2,749	2,749	2,754	2,754
CP	17.1	17.1	17.1	17.1
Dig. Lys	0,73	0,73	0,73	0,73
Dig. Met	0,25	0,25	0,25	0,25
Ca	3.50	3.50	3.50	3.50
*t*P	0.56	0.56	0.39	0.39
NPP	0.34	0.34	0.18	0.18
*a*P (without phytase)	0.30	0.30	0.15	0.15
Analyzed values (%)				
DM	89.8	89.7	89.9	89.9
CP	17.3	17.8	17.8	17.7
Ca	3.52	3.68	3.58	3.49
P*tot*	0.55	0.52	0.38	0.39
Phytase activity (FTU/kg)	85	45	373	293

[1]Fine limestone particles were < 0.5 mm (geometric mean diameter = 0.14 mm), and were obtained by grinding coarse limestone particles. Carbonate was 38 % Ca.
[2]Coarse limestone particles were comprised between 2−4 mm (geometric mean diameter = 2.40 mm).
[3]Monocalcium phosphate was 17.0 % Ca, and 22.7 % P.
[4]Phytase was a novel biosynthetic bacterial 6-phytase produced by *Trichoderma reesei* (Adisseo France SAS, Commentry, France).
[5]Layer premix contains the following (per kilogram): vitamin A = 2,500,000 UI; vitamin D3 = 860,000 UI; vitamin E = 20,000 UI; vitamin K3 = 1,000 mg; vitamin B1 = 1,000 mg; vitamin B6 = 1,600 mg; pantothenic acid = 5,000 mg; vitamin B6 = 1,400 mg; vitamin B12 = 5.2 mg; vitamin PP = 20,000 mg; folic acid = 600 mg; biotin = 60 mg; Cu = 3,200 mg; Fe = 10,000 mg; Zn = 14,000 mg; Mn = 16,000 mg; I = 400 mg; Se = 40 mg.
[7]DM, dry matter; ME, metabolizable energy; CP, crude protein; *t*P, total P; NPP, non-phytic P; *a*P, available P.
[8]Calculated values of nutrients based on INRA-CIRAD-AFZ tables (2017).

Tableau 23 : pH of digesta in each segment of gastro-intestinal tract in laying hen fed experimental diets containing different level of microbial phytase and coarse limestone particles.[1, 2]

pH	0		300		Pooled SEM	*P*-value		
	FL	MIX	FL	MIX		Phytase × LmPS	Phytase	LmPS
Crop	5.16	5.08	5.14	5.15	0.029	0.785	0.748	0.547
Gizzard	4.36^{ab}	4.33^{ab}	4.59^{a}	4.31^{b}	0.038	0.045	0.160	0.032
Duodenum	6.27	6.22	6.26	6.29	0.015	0.415	0.259	0.197
Jejunum	6.27	6.33	6.26	6.22	0.023	0.406	0.209	0.860
Ileum	6.79^{ab}	7.18^{a}	6.79^{ab}	6.59^{b}	0.061	0.032	0.056	0.278

[1]Mean values of 15, 10, 14 and 12 replicates of 1 hen for the treatment FL0, MIX0, FL300 and MIX300.
[2]FL, fine limestone (< 0.5 mm); MIX, mix of 25 % fine limestone and 75 % coarse limestone (2−4 mm); 0, diet without microbial phytase and 0.34 % NPP; 300, diet with 300 FTU/kg microbial phytase and 0.18 % NPP; LmPS, limestone particle size.
$^{a-b}$: Means within a column with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$), based on Tukey HSD means comparison.

Tableau 24 : Mean retention time (MRT, min) of the solid fraction of digesta along the gastro-intestinal tract in laying hen fed experimental diets containing different level of microbial phytase and coarse limestone particles.[1]

MRT (min)[2]	0		300		Pooled SEM	*P*-value		
	FL	MIX	FL	MIX		Phytase × LmPS	Phytase	LmPS
Crop	38^{a}	16^{b}	26^{ab}	31^{ab}	2.4	0.007	0.842	0.045
Gizzard	16	16	15	14	0.8	0.736	0.339	0.894
Duodenum	3	3	4	4	0.3	0.495	0.200	0.426
Jejunum	33^{ab}	38^{a}	24^{b}	34^{ab}	1.8	0.043	0.081	0.068
Ileum	61	52	42	59	2.8	0.072	0.260	0.645
Small intestine	97^{a}	93^{ab}	70^{b}	97^{a}	3.8	0.033	0.121	0.169

[1]Mean values for 16, 15, 13, and 13 replicates of 1 hen for treatment FL0, MIX0, FL300.
[2]FL, fine limestone (< 0.5 mm); MIX, mix of 25 % fine limestone and 75 % coarse limestone (2−4 mm); 0, diet without microbial phytase and 0.34 % NPP; 300, diet with 300 FTU/kg microbial phytase and 0.18 % NPP; LmPS, limestone particle size.
$^{a-b}$: Means within a column with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$), based on Tukey HSD means comparison.

Tableau 24 : Intake of Ca and P (g/kg diet on a DM-basis) and recovery of P and Ca (g/kg of DMI) in digesta along the gastro-intestinal tract of laying hens fed experimental diets without or with 300 FTU/kg of phytase (0 or 300) and without or with coarse limestone particles (FL or MIX)[1].

Recovery (g/kg of DMI)[2]	0		300		SEM	*P*-value		
	FL	MIX	FL	MIX		Phytase × LmPS	Phytase	LmPS
Phosphorus								
Intake	4.98	4.47	3.50	3.54				
Crop	5.06^{a}	4.65^{ab}	4.50^{ab}	3.79^{b}	0.151	0.035	0.030	0.098
Gizzard	6.36^{a}	5.35^{ab}	6.49^{a}	4.82^{b}	0.202	< 0.001	0.743	< 0.001
Duodenum	8.28	8.31	6.65	4.86	0.532	0.073	0.018	0.504
Jejunum	3.35^{a}	3.19^{a}	3.39^{a}	2.30^{b}	0.129	0.004	0.105	0.017
Ileum	2.79^{a}	2.78^{a}	3.03^{a}	1.91^{b}	0.096	< 0.001	0.158	0.006
Calcium								
Intake	32.01	33.68	32.73	31.94				
Crop	39.12^{ab}	84.14^{a}	36.63^{b}	61.36a^{b}	4.681	< 0.001	0.208	< 0.001
Gizzard	40.75^{c}	759.93^{a}	44.88^{c}	394.57^{b}	53.984	< 0.001	0.123	< 0.001
Duodenum	51.56^{b}	116.29^{b}	43.13^{b}	283.43^{a}	24.415	< 0.001	0.120	< 0.001
Jejunum	17.62	11.36	11.75	21.50	2.325	0.375	0.736	0.714
Ileum	12.00	11.14	9.88	9.00	0.845	0.620	0.213	0.615

[1]Mean values of 16, 14, 16 and 14 hens for the treatment FL0, MIX0, FL300 and MIX300 for Ca recovery, and of 16, 17, 16 and 14 hens for the treatment FL0, MIX0, FL300 and MIX300 for P recovery.

[2]DMI, dry matter intake; FL, fine limestone (< 0.5 mm); MIX, mix of 25 % fine limestone and 75 % coarse limestone (2–4 mm); 0, diet without phytase and 0.34 % NPP; 300, diet with 300 FTU/kg phytase and 0.18 % NPP; LmPS, limestone particle size.

$^{a-b}$: Means within a column with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$), based on Tukey HSD means separation.

Tableau 26 : Apparent digestibility coefficient (AD) of P and Ca of experimental diets containing different level of microbial phytase and different level of incorporation of coarse limestone particles along the small intestine of laying hens.

AD (%)[1]	0		300		Pooled SEM	*P*-value		
	FL	MIX	FL	MIX		Phytase × LmPS	Phytase	LmPS
Phosphorus[2]								
Duodenum	2.9	6.6	0.1	5.3	2.7	0.854	0.694	0.421
Jejunum	35.3	29.3	17.7	29.0	3.3	0.303	0.169	0.745
Ileum	6.6	4.9	4.3	8.7	1.6	0.800	0.858	0.732
Calcium[3]								
Duodenum	18.8	9.8	20.2	15.7	4.6	0.872	0.665	0.452
Jejunum	48.8	65.6	47.9	52.3	4.8	0.583	0.468	0.257
Ileum	6.7	3.4	2.9	11.1	1.8	0.452	0.883	0.561

[1]FL, fine limestone (< 0.5 mm); MIX, mix of 25 % fine limestone and 75 % coarse limestone (2−4 mm); 0, diet without microbial phytase and 0.34 % NPP; 300, diet with 300 FTU/kg microbial phytase and 0.18 % NPP; LmPS, limestone particle size.

[2] Mean values of 10, 10, 9 and 8 replicates of 1 hen for the treatment FL0, MIX0, FL300 and MIX300, respectively.

[3] Mean values of 9, 8, 12 and 6 replicates of 1 hen for the treatment FL0, MIX0, FL300 and MIX300, respectively.

$^{a-b}$: Means within a column with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$), based on Tukey HSD means separation.

Tableau 27 : Parameter estimates characterizing absorption kinetics of P and Ca in the small intestine of laying hens fed experimental diets containing different level of microbial phytase and different level of incorporation of coarse limestone particles.[1,2]

	Experimental diets			
	FL0	**MIX0**	**FL300**	**MIX300**
Calcium				
Digestible Ca (g/kg)	22.9	27.7	25.4	29.5
k (min^{-1})	0.102	0.048	0.081	0.065
t½ (min)	7	15	9	11
V_i (g/min/kg diet)	2.3	1.3	2.1	1.9
Phosphorus				
Digestible P (g/kg)	2.7	2.3	1.1	1.6
k (min^{-1})	0.039	0.036	0.014	0.027
t½ (min)	18	20	50	26
V_i (g/min/kg diet)	0.105	0.083	0.015	0.043

[1]FL, fine limestone (< 0.5 mm); MIX, mix of 25 % fine limestone and 75 % coarse limestone (2−4 mm); 0, diet without microbial phytase and 0.34 % NPP; 300, diet with 300 FTU/kg microbial phytase and 0.18 % NPP; LmPS, limestone particle size.

[2]Digestible Ca or P represent the maximal digestible P or Ca (g/kg of diet); k (min^{-1}) is the fractional rate constant; t½ (min) is the time when half of digestible Ca or P is reached; V*i* (g/min^{-1}) is the initial velocity of P or Ca absorption, calculated by multiplying digestible Ca or P by k.

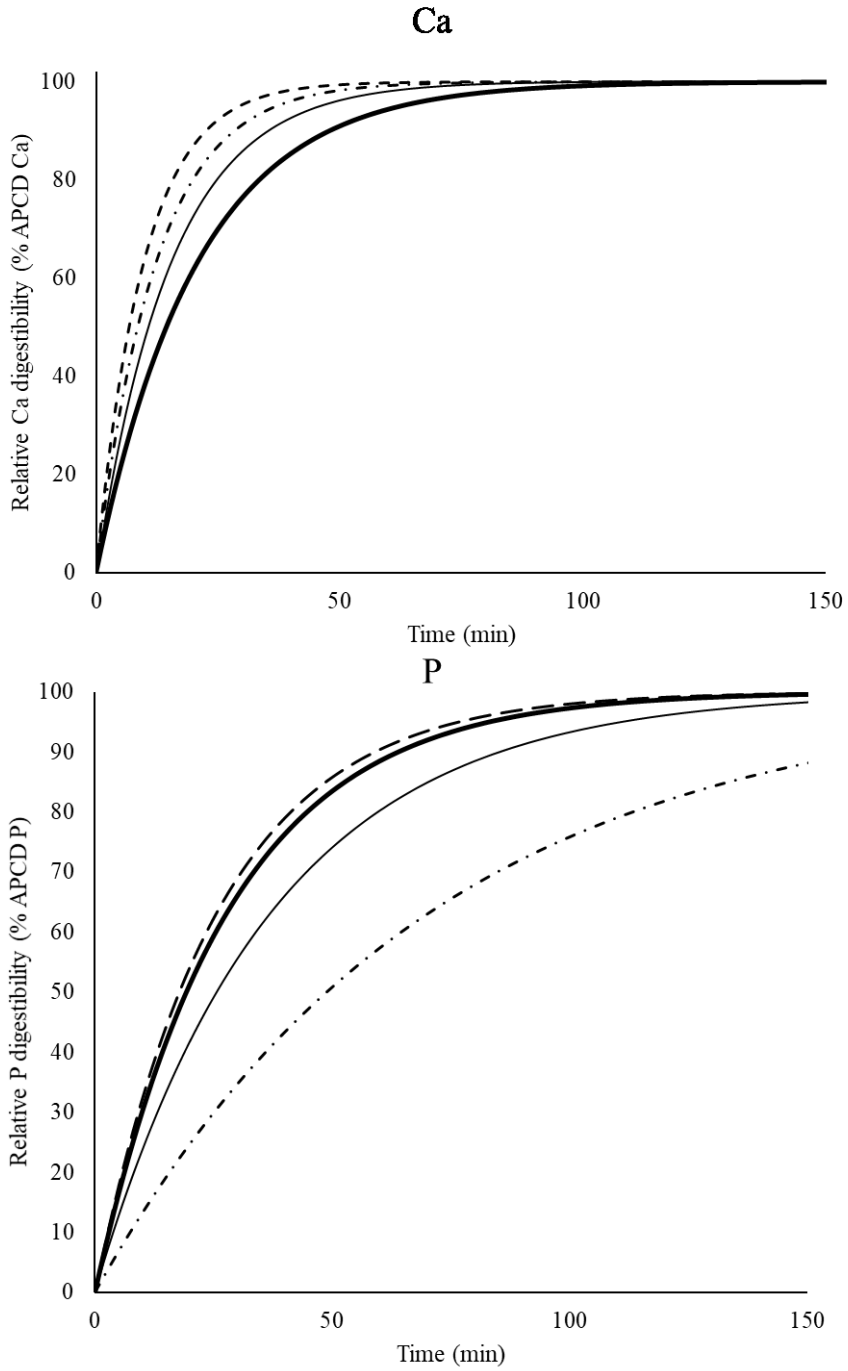


Figure 47 : Relative digestibility kinetics curves of calcium (Ca) and phosphorus (P) in the small intestine of laying hens.

Laying hens were fed experimental diets containing fine limestone particles (< 0.5 mm), 0.34 % NPP without microbial phytase (FL0; large dotted line); a mix of 75 % of coarse limestone particles (2−4 mm) and 25 % fine limestone particles, 0.34 % NPP without microbial phytase (MIX0; large full line); fine limestone particles, 0.18 % NPP with 300 FTU/kg (FL300; thin dotted line); or a mix of 75 % of coarse limestone particles (2−4 mm) and 25 % fine limestone particles, 0.18 % NPP with 300 FTU/kg (MIX300; thin full line).

CHAPITRE 4

Développement d'un modèle mécaniste décrivant le devenir du calcium et du phosphore le long du tractus gastro-intestinal de la poule pondeuse

1

Introduction

Optimiser les apports de P aux poules pondeuses est un objectif majeur de la production en vue notamment de réduire les rejets dans l'environnement. Cette réduction ne doit évidemment pas se faire au détriment des performances de production ni même du bien-être animal. Il apparait donc primordial de définir le besoin de la poule pondeuse en P et de déterminer les facteurs principaux qui influencent l'utilisation digestive de ce minéral. Les différents travaux réalisés au cours de ce doctorat ont permis de quantifier l'effet de la phytase microbienne dans une stratégie de réduction de l'apport de P chez la poule, plus particulièrement en fonction de la taille des particules de carbonate de Ca. L'étude *in vivo* a en effet montré l'intérêt du carbonate de Ca particulaire pour limiter la formation des complexes de phytate de Ca (*cf*. Chapitre 2). Une meilleure compréhension des mécanismes guidant l'utilisation digestive de P en lien avec les constituants de la ration, notamment le Ca, est un prérequis à la mise en place de stratégies de maîtrise des apports et des rejets de P.

Afin d'affiner nos connaissances sur l'utilisation digestive du P et du Ca, *i.e.*, l'ensemble des processus de solubilisation, d'insolubilisation, d'hydrolyse et d'absorption se déroulant tout au long du TGI, et plus précisément des interactions entre ces minéraux, une approche de modélisation compartimentale mécaniste et déterministe (France et Thornley, 1984) a été réalisée. Ce type de modèle dynamique permet de considérer différents compartiments anatomiques ainsi que les relations métaboliques les reliant (Sauvant, 1992) en fonction du temps après l'oviposition. À notre connaissance, ce type de modèle intégrant les facteurs de modulation de l'utilisation digestive de P et Ca a été développé uniquement chez le porc en croissance (Létourneau-Montminy et al., 2011) et le poulet de chair (Létourneau-Montminy, 2009). Cette approche n'a jamais été réalisée chez la poule pondeuse (peu importe le nutriment considéré). L'export massif et quotidien de Ca pour la formation de la coquille amène un niveau de complexité supplémentaire par rapport aux animaux en croissance et induit une dynamique d'utilisation du Ca et P variable à l'échelle de la journée. De plus, aux vues des données présentes dans la littérature et acquises au cours de ce doctorat, il apparait clairement que la source de Ca et de P, ainsi que leur forme de présentation influent fortement sur leur utilisation digestive et donc sur leur devenir métabolique. L'objectif du présent travail était de développer un modèle compartimental mécaniste et déterministe décrivant le devenir du Ca et du P le long du tractus gastro-intestinal de la poule pondeuse, jusqu'à leur absorption intégrant les principaux facteurs de modulation au cours de la journée, tout en considérant le cycle de calcification de la coquille.

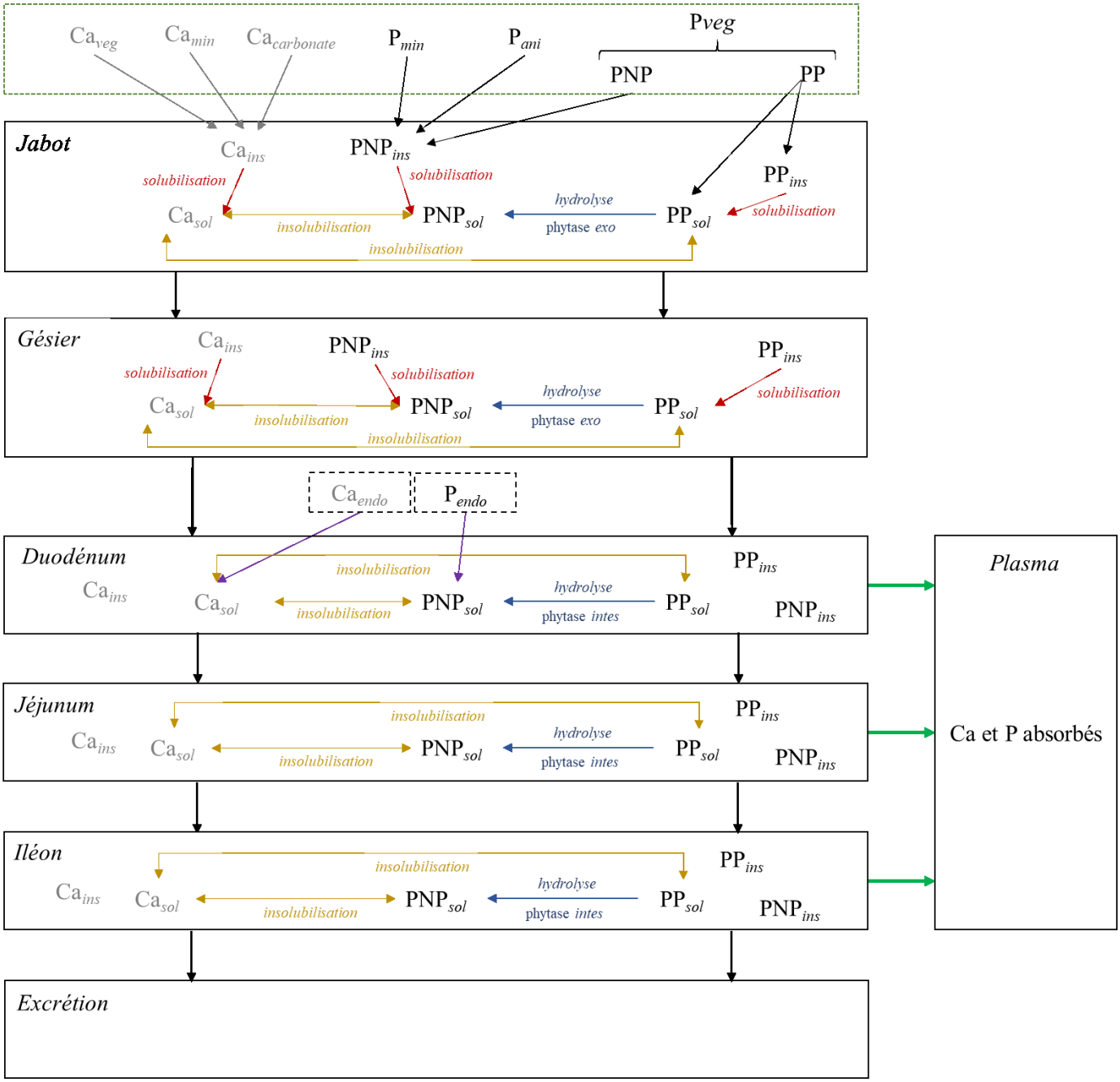


Figure 48 : Représentation schématique du modèle compartimental de l'utilisation digestive de Ca et de P chez la poule pondeuse.

Ca_{veg} et P_{veg}, Ca et P des matières premières d'origine végétale ; PP, P phytique ; PNP, P non-phytique ; Ca_{ani} et P_{ani}, Ca et P des matières premières d'origine animale ; Ca_{min} et P_{min}, Ca et P des phosphates ; $Ca_{carbonate}$, Ca du carbonate ; P_{endo} et Ca_{endo}, sécrétions endogènes ; phytase *exo*, phytases microbienne et végétale ; phytase *intes*, phytase intestinale. Les suffixes « *sol* » et « *ins* », soluble ou insoluble, respectivement.

1 Matériel et méthodes

1.1 Système considéré, entrées et sorties du modèle

1.1.1 Description du système

Ce modèle digestif (Figure 48) considère une poule pondeuse en production de 34 semaines d'âge pesant 1,7 kg, *i.e.*, une poule au pic de ponte et ayant terminé sa croissance. Ce modèle a été paramétré à l'aide du logiciel Vensim version 9.3.5 (Venata System, 2022). Les paramètres et équations utilisés sont présentés en annexes 1 et 2 de ce chapitre.

Les compartiments considérés correspondent aux segments anatomiques du TGI : le jabot, le gésier, le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Étant donné que le digesta transite rapidement dans le proventricule et qu'aucune réaction n'y est décrite (Svihus, 2011), ce segment n'est pas dissocié du gésier. Pour la suite du document, la phase pré-intestinale correspond à l'ensemble anatomique constitué par le jabot et le gésier. C'est dans cette phase que se déroule la majeure partie des processus de solubilisation et d'insolubilisation des minéraux. Cette partie est également le site d'action des phytases microbienne et végétale. La phase intestinale, quant à elle, correspond à l'intestin grêle. C'est dans la partie intestinale que se déroule l'absorption des minéraux ainsi que l'hydrolyse du PP par la phytase intestinale.

1.1.2 Les entrées du modèle

1.1.2.1 Sources alimentaires de calcium et de phosphore

Du fait des différentes sources de Ca et P alimentaires, nous distinguons les minéraux contenus dans les matières premières d'origine végétale (P_{veg} et Ca_{veg}), minérale (P_{min} et Ca_{min}) et animale (P_{ani} et Ca_{ani}). Le P_{veg} est constitué par deux fractions : le P non-phytique (PNP_{veg}) facilement disponible pour l'animal et le PP peu disponible pour l'animal. Le Ca d'origine minérale est également constitué par deux fractions : le Ca apporté par les phosphates de Ca (Ca_{min}) et le Ca apporté par les carbonates de Ca ($Ca_{carbonate}$). Le carbonate de Ca peut être caractérisé selon le niveau d'incorporation de fines (< 0,8 mm) ou de larges particules (≥ 0,8 mm) et la taille respective de ces particules (mm). Pour ce modèle, la caractérisation des matières premières végétales, minérales et animales, en termes de concentration en Ca et P (g/kg) et d'activité phytasique (FTU/kg), est basée sur les données disponibles dans les tables INRA-CIRAD-AFZ (2017). Ce modèle permet également de paramétrer le niveau d'incorporation de phytase microbienne (FTU/kg) en entrée.

Les minéraux sont ingérés sous forme insoluble : $Ca_{carbonate, ins}$, $Ca_{min, ins}$, $Ca_{veg, ins}$, $Ca_{ani, ins}$, $P_{min, ins}$, $PNP_{veg, ins}$ et $P_{ani, ins}$. Selon Lott et al. (2000), une partie du PP (~20 %) est présente

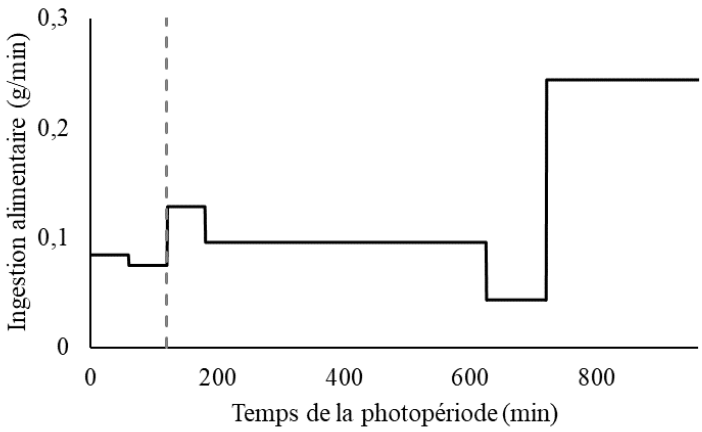


Figure 49 : Cinétique d'ingestion simulée au cours de la photopériode (g/min).
La droite pointillée grise représente l'heure de ponte.

sous forme soluble dans l'aliment. Aussi, le PP entre à la fois sous forme soluble et insoluble au niveau du jabot : PP_{sol} et PP_{ins}, respectivement.

1.1.2.2 Comportement d'ingestion

Selon la littérature, la photopériode influe fortement sur le comportement d'ingestion (Ballard et Biellier, 1975 ; Bhatti et Morris, 1978). Dans le modèle, la durée de la photopériode a ainsi été paramétrée en définissant l'heure d'allumage (t_{ON}) et l'heure d'extinction (t_{OFF}). L'ingestion alimentaire est ensuite modélisée suivant une courbe théorique décrite par Keshavarz (1998). Ainsi, un jour où la poule produit un œuf, l'ingestion d'un nutriment A est modélisée comme suit (eq. 1) :

$$\frac{Ingestion_A}{dt} = \begin{cases} \dfrac{\left(\dfrac{0{,}4 \times Iq}{\left(\frac{\Phi}{2}\right)}\right) \times [A]}{1000} & si\ t_{ON} \leq t\ \leq t_{65} \\ \dfrac{\left(\dfrac{0{,}6\ \times Iq}{\left(\frac{\Phi}{4}\right)} \times 0{,}15\right) \times [A]}{1000} & si\ t_{65} < t\ < t_{75} \\ \dfrac{\left(\dfrac{0{,}6\ \times Iq}{\left(\frac{\Phi}{4}\right)} \times 0{,}85\right) \times [A]}{1000} & si\ t_{75} \leq t\ \leq t_{OFF} \end{cases} \quad (1)$$

Où, Iq représente l'ingéré alimentaire quotidien (g), Φ la durée de la photopériode (min) et [A] la concentration en nutriment A dans l'aliment (g/kg). Les paramètres t_{ON} et t_{OFF} représentent l'heure d'allumage et d'extinction (min), respectivement, et les paramètres t_{65} et t_{75}, le temps correspondant à 65 et 75 % de la photopériode (min), respectivement.

Le comportement de ponte est également un facteur de modulation important de l'ingestion (Mongin et Sauveur, 1974). Par exemple, Choi et al. (2004) ont remarqué que les poules augmentaient leur consommation alimentaire de 12 % les jours où elles produisent un œuf. De plus, selon Duncan et Hughes (1975), la consommation alimentaire diminue fortement 2 heures avant la ponte, principalement dû au fait que la poule est au nid et n'a pas accès à l'aliment, puis augmente rapidement après la ponte (Figure 49). Afin de prendre en compte ces éléments de variation sur la prise alimentaire, il est possible de paramétrer le fait que la poule ponde ou non sur la photopériode ainsi que l'heure de ponte (t_{ponte}).

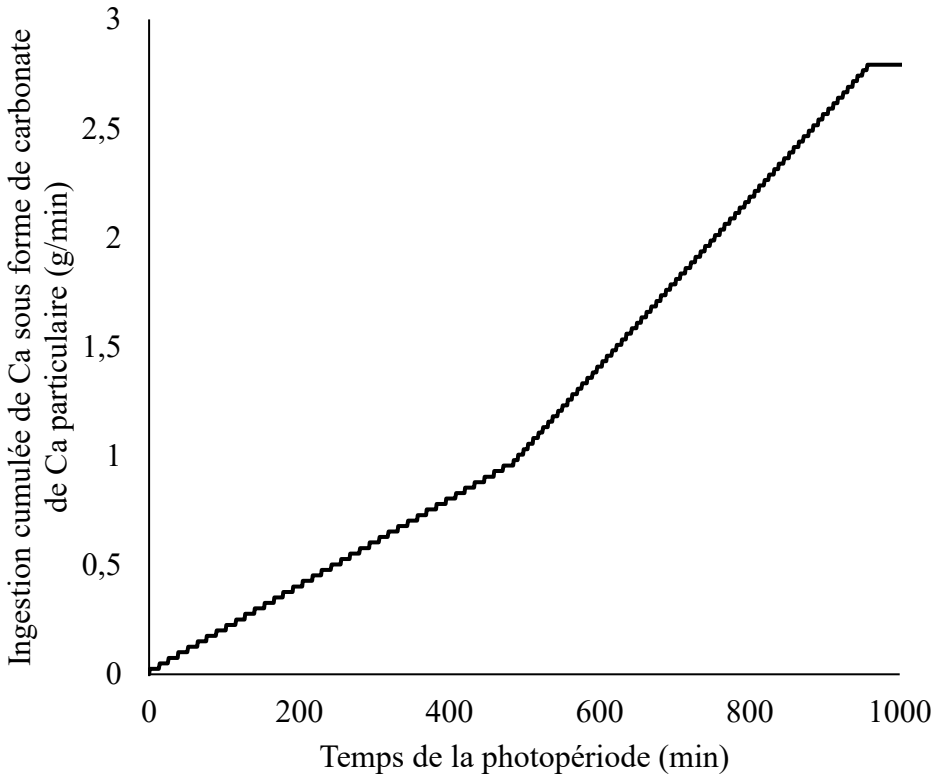


Figure 50 : Cinétique d'ingestion cumulée de Ca apporté sous forme de carbonate particulaire au cours de la photopériode (g/min).

Le carbonate de Ca particulaire ne suit pas le même schéma d'ingestion que les autres formes de Ca ou P. En effet, en considérant le carbonate de Ca particulaire comme une sphère (Sun et al., 2010), nous pouvons calculer la masse (M_n) d'une particule en fonction de son rayon, r (eq. 2) :

$$M_n\,(g) = \rho \times \left(\frac{4}{3} \times \Pi \times r^3\right) \quad 2$$

Où, ρ représente la masse volumique du carbonate de Ca (g/cm^3). Dans le cas de l'étude présentée aux Chapitres 2 et 3, les particules de rayon moyen, r = 0,14 cm présentaient une masse moyenne de 0,031 g. Ainsi, l'ingestion de particules de carbonate de Ca au cours de la journée a été modélisée. Le flux entrant de Ca *via* le carbonate particulaire est calculé comme suit (eq. 3) :

$$Ca_{carbonate,ingéré}(g/min) = N \times M_n \times \%Ca_{carbonate} \quad 3$$

Où, N est le nombre de particules de carbonate de Ca ingérées en fonction du temps et $\%Ca_{carbonate}$ représente le taux de Ca dans le carbonate de Ca. Au final, l'ingestion de carbonate de Ca particulaire au cours de la journée est modélisée sous forme de pulses (Figure 50).

1.1.2.3 Sécrétions endogènes de calcium et de phosphore

Les sécrétions endogènes représentent les quantités de Ca et P sécrétées dans l'intestin *via* les sucs pancréatiques, la bile ou encore le turn-over des cellules de l'épithélium intestinal (*cf.* Synthèse bibliographique). La quantification de ces sécrétions chez la poule pondeuse est rendue difficile du fait d'un manque de données dans la littérature. Selon Diana et al. (2021), les pertes endogènes totales de Ca, qui combinent à la fois les pertes endogènes digestives et les pertes métaboliques (*via* l'urine), pour des poules recevant un aliment à base de maïs et tourteau de soja, seraient de 790 mg/kg de MSI. Manangi et al. (2018) ont mesuré les pertes urinaires en Ca sur des poules reproductrices colostomisées : elles représentent 9 % des pertes totales. Les pertes endogènes iléales en Ca ont ainsi été estimées à 719 mg/kg de MSI ($k_{Ca,\ endogène}$). Pour le P, basé sur les données de Rodehutscord et al. (2002), qui ont mesuré le flux de P au niveau iléal chez des poules recevant des doses croissantes de P, les pertes endogènes iléales ont été estimées par régression linéaire : $k_{P,\ endogène}$ = 50 mg/kg MSI. Dans ce modèle, les sécrétions endogènes sont considérées continues sur la durée de la photopériode (eq. 4) :

$$Pertes\ endogènes = \frac{k_{endogène} \times MSI}{\Phi} \quad 4$$

Tableau 28 : Valeurs de pH et de temps moyen de rétention (TMR) du calcium (fin et particulaire) et du phosphore caractérisant les différents segments gastro-intestinaux chez la poule pondeuse.[1]

		TMR (min)		
	pH	**Ca fin[2]**	**Ca particulaire**	**P**
Jabot	5,2	39	83	60
Gésier	4,2	34	268 – 855[3]	53
Duodénum	6,2	4	4	4
Jéjunum	6,3	32	32	32
Iléon	7,3	54	54	54

[1]Les données présentées proviennent de l'expérimentation *in vivo* conduite au cours de ce doctorat, dont les résultats sont présentés au Chapitre 3.
[2]Le Ca fin correspond au Ca issu des matières premières végétales et animales, des phosphates et du carbonate de Ca fin.
[3]Intervalle de TMR du Ca particulaire dans le gésier pour des particules comprises entre 0,8 et 4,0 mm.

Où MSI représente la quantité de matière sèche ingérée (g), Φ la durée de la photopériode (min) et $k_{endogène}$ les sécrétions endogènes en Ca ou P, exprimées en g/jour/kg MSI. Nous considérons que Ca et P endogènes sont déversés dans le pool de Ca et P solubles (Fernandez, 1995) au niveau du duodénum et sont donc absorbables au même titre que les minéraux d'origine alimentaire.

1.1.3 Les sorties du modèle

Les sorties du modèle sont les minéraux absorbés au niveau intestinal, qui peuvent provenir des aliments ou des sécrétions endogènes, et l'excrétion fécale, constituée des minéraux non-absorbés d'origine alimentaire ou endogène. Chacune des sorties précédentes est également rapportée à la quantité de minéraux ingérée (en g/jour) et exprimée en %. De ce fait, le modèle renseigne la digestibilité pré-cæcale apparente ou réelle.

1.2 Caractérisation des différents segments gastro-intestinaux

Comme précédemment décrit dans la synthèse bibliographique, chaque segment est caractérisé par un pH et une vitesse de transit spécifique, modélisée à partir du temps moyen de rétention (TMR). Les valeurs de pH et de TMR des différents segments (Tableau 28) proviennent de l'expérimentation *in vivo* réalisée au cours de ce doctorat et sont présentées au Chapitre 3. Notons cependant que le TMR des différents segments du TGI ne prend pas en compte le transit différentiel des phases liquide et solide (Chen, 2017). Il ne prend pas non plus en compte l'effet de certains facteurs alimentaires connus pour moduler cette vitesse de transit, telle que la teneur en fibres (van Krimpen et al., 2011). Le pH des différents segments gastro-intestinaux, à l'exception du gésier, est fixe et ne prend pas en compte d'éventuels effets de la composition alimentaire, dont les mécanismes restent trop peu objectivés dans la littérature.

1.2.1 Caractérisation des segments pré-intestinaux

1.2.1.1 Modélisation du cycle du pH

Le pH est décrit comme le principal facteur modulant la solubilisation des minéraux (de Witt et al., 2006). Dans le jabot, le pH est considéré constant et fixé à 5,2, en accord avec de précédentes observations (Mongin, 1976). Chez le poulet de chair, le pH du gésier varie au cours de la journée entre 1,5 et 5,0 (Lee et al., 2017). Ces variations sont en partie dues à l'arrivée de l'aliment dans le gésier où l'effet tampon de l'aliment induit une hausse rapide du pH (Gomez et Corniaux, 2009). L'effet de l'aliment sur le pH du gésier est pris en compte dans ce modèle, basé sur les données de Lawlor et al. (2005). Ainsi, selon sa composition, une valeur moyenne de pH est attribuée à l'aliment. Selon Mongin (1976), le pH du gésier varie au cours

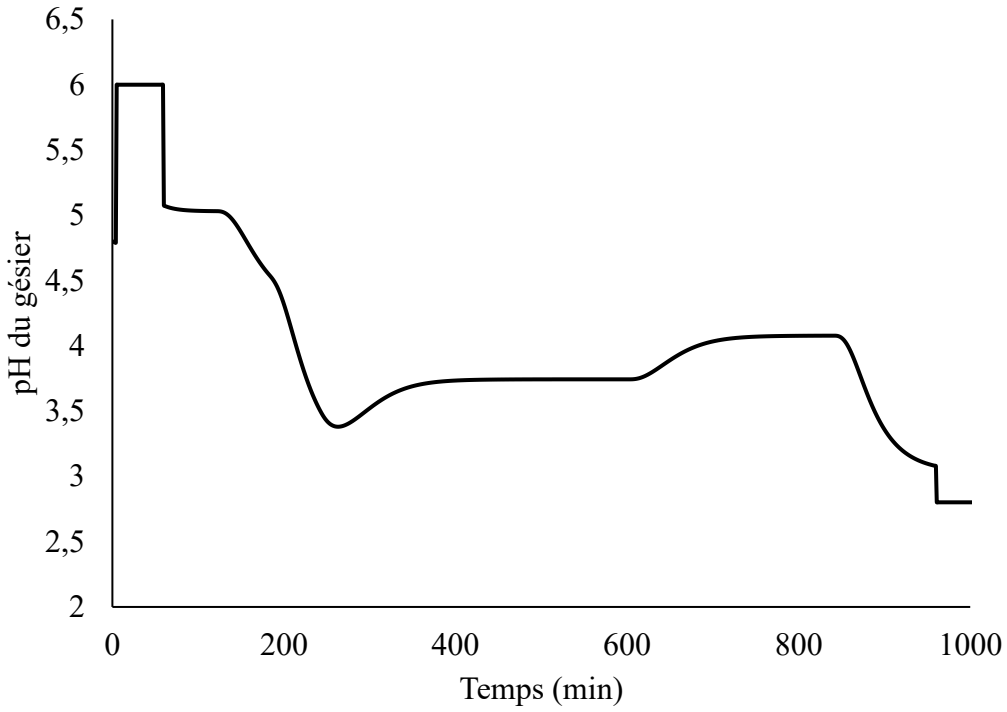


Figure 51 : Simulation de la variation du pH du gésier au cours de la journée chez la poule pondeuse.

du cycle de formation de la coquille. Cette idée a été validée par Guinotte et al. (1992) qui ont montré l'existence d'une relation entre la quantité de MS dans le jabot et le flux de H^+ sécrété par le proventricule. Basé sur les données de ces auteurs, le flux de sécrétion des H^+ au cours de la journée est modélisé suivant une fonction logistique (éq. 5) :

$$Flux_{sécrétion\ H+,gésier} = \frac{k_{sécrétion\ MAX}}{\left(1 + e^{\left(k_{sécrétion\ MIN} \times (MS_{jabot} - k_s)\right)}\right)} \quad 5$$

Où, $k_{sécrétion\ MAX}$ et $k_{sécrétion\ MIN}$ représentent, respectivement, les flux maximal et minimal (mol/l) de sécrétions de H^+ par le proventricule. La variable MS_{jabot} représente la quantité de matière sèche dans le jabot (g) et le paramètre k_s représente la quantité de matière sèche nécessaire pour atteindre 50 % de $k_{sécrétion\ MAX}$ (g). Les variations du pH au cours de la journée sont présentées à la Figure 51.

1.2.1.2 Transit des minéraux

Les articles de la littérature rapportant les valeurs de TMR sont basés sur le postulat que tous les nutriments suivent le même schéma de transit que la MS (Svihus et Itani, 2019). Néanmoins, au vu des résultats présentés au Chapitre 3, il apparait que les flux de Ca et de P le long du TGI ne suivent pas les mêmes schémas. De ce fait, des temps de transit spécifiques au P et au Ca (fin et particulaire) ont été considérés dans le jabot et le gésier. La quantité de minéraux se déversant du jabot dans le gésier et du gésier dans le duodénum est supposée suivre une loi de décroissance exponentielle (Wilfart et al., 2007). La vidange du jabot et du gésier est alors définie par une loi d'action de masse, comme dans les modèles digestifs chez le porc proposés par Létourneau-Montminy et al. (2011) et Bastianelli et al. (1996). Le taux fractionnaire de vidange des minéraux du jabot et du gésier est noté $k_{Ca\ jabot}$ ou $k_{P,\ jabot}$ et $k_{Ca\ gésier}$ ou $k_{P,\ gésier}$ (min^{-1}), respectivement et est estimé à partir du TMR du minéral dans le segment d'intérêt (France et al., 1985), de telle sorte que $k_{segment} = 1/TMR_{segment}$. Suite à l'expression de l'appétit calcique spécifique en fin de photopériode, la vitesse de transit du digesta dans le jabot diminue fortement (Roland et Harms, 1973). Au cours de ce doctorat, en recueillant le digesta de poules 4 et 12 heures post-oviposition, nous avons montré que le TMR de la MS dans le jabot augmentait de 29 à 60 minutes, respectivement ($P < 0,05$). Le TMR des minéraux dans le jabot a ainsi été augmenté de 110 %, correspondant à l'augmentation observée au cours de nos travaux.

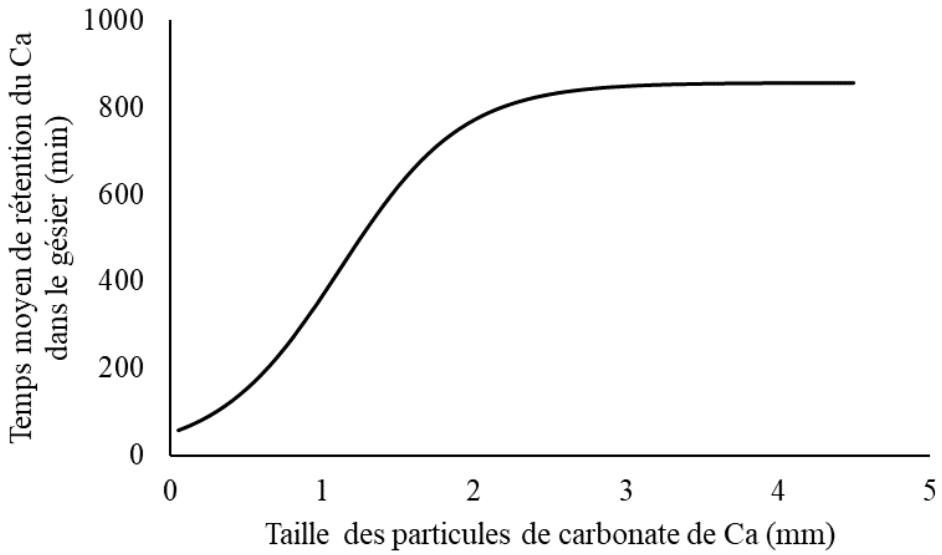


Figure 52 : Simulation du temps moyen de rétention du Ca dans le gésier (min) en fonction de la taille des particules de carbonate de Ca (mm).

L'incorporation de carbonate de Ca particulaire induit une augmentation du TMR du Ca dans la phase pré-intestinale (Saunders-Blades et al., 2009). Selon Rao et al. (1992) l'incorporation de carbonate de Ca particulaire ne présenterait pas d'influence sur la vitesse de transit du Ca dans le jabot. Cependant, d'après les travaux réalisés au cours de ce doctorat, il apparait que le TMR du carbonate de Ca augmente en présence de larges particules (*cf.* Chapitre 3). La sortie d'une particule de carbonate de Ca du jabot vers le gésier a été modélisée selon une loi binomiale de probabilité $k_{Ca,\ jabot}$, avec $k_{Ca,\ jabot} = 1/TMR_{Ca,\ jabot}$ (min^{-1}). Le flux de Ca du jabot vers le gésier (g/min) est ensuite obtenu en multipliant le nombre de particules transitant à l'instant *t* par la masse de Ca d'une particule (g). La vidange du carbonate de Ca particulaire du gésier vers le duodénum, du fait des processus de dissolution et donc de la réduction de la taille de la particule (Ahlbeck et al., 1993), est supposée suivre une loi de décroissance exponentielle. Basé sur les données de Rao et al. (1992), le TMR du carbonate de Ca dans le gésier a été définit en fonction de la taille des particules (mm) suivant une fonction logistique (éq. 6 ; Figure 52) :

$$TMR_{Ca\ particulaire,gésier} = \frac{TMR_{Ca\ particulaire\ MAX}}{\left(1 + e^{\left(TMR_{Ca\ particulaire\ MIN} \times (Taille - k_{Ca\ particulaire})\right)}\right)} \qquad 6$$

Où, $k_{Ca\ particulaire\ MAX}$ et $k_{Ca\ particulaire\ MIN}$ représentent les TMR maximal et minimal (min), respectivement, « *Taille* » représente la taille des particules de carbonate de Ca (mm) et $k_{Ca\ particulaire}$ représente la taille de particule nécessaire pour atteindre 50 % de $k_{Ca\ particulaire\ MAX}$ (mm). Le Ca particulaire présentant une taille trop importante pour passer le pylore dès son arrivée dans le gésier, un délai de sortie du Ca a été considéré.

1.2.2 Caractérisation des segments intestinaux

Dans ce modèle, l'intestin grêle est subdivisé en trois segments : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Cette division de l'intestin nous semble nécessaire afin de prendre en compte les capacités différentes des segments à absorber le Ca et le P (Hurwitz et al., 1968 ; Liu et al., 2016). La hausse du pH le long de l'intestin en s'éloignant du pylore (de 6,2 à 7,3 ± 0,33 ; Table 1) favorise la précipitation du Ca et du P, conduisant à une diminution de l'absorption dans les segments les plus distaux. Les TMR de chacun des segments présentés dans le Tableau 28 ont permis de définir les taux fractionnaires de vidange des minéraux d'un segment à l'autre. Le gésier est supposé broyer les particules alimentaires de façon homogène (Moore, 1999), conduisant à prendre en compte des TMR de Ca et P identiques dans les segments intestinaux. Les segments intestinaux sont également caractérisés par leur longueur, basés sur

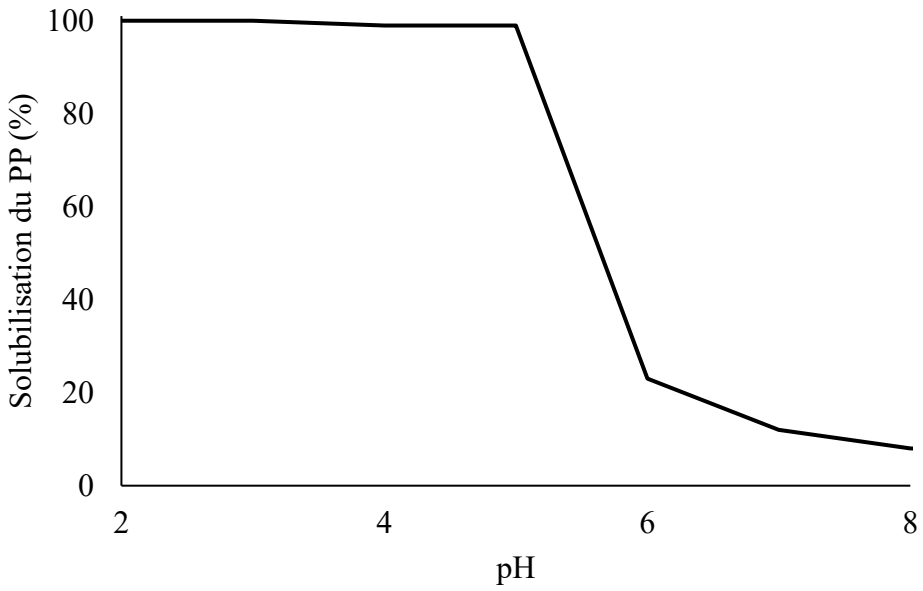


Figure 53 : Solubilisation du phosphore phytique (PP) de l'aliment en fonction du pH. Données tirées de Cheryan et al. (1983).

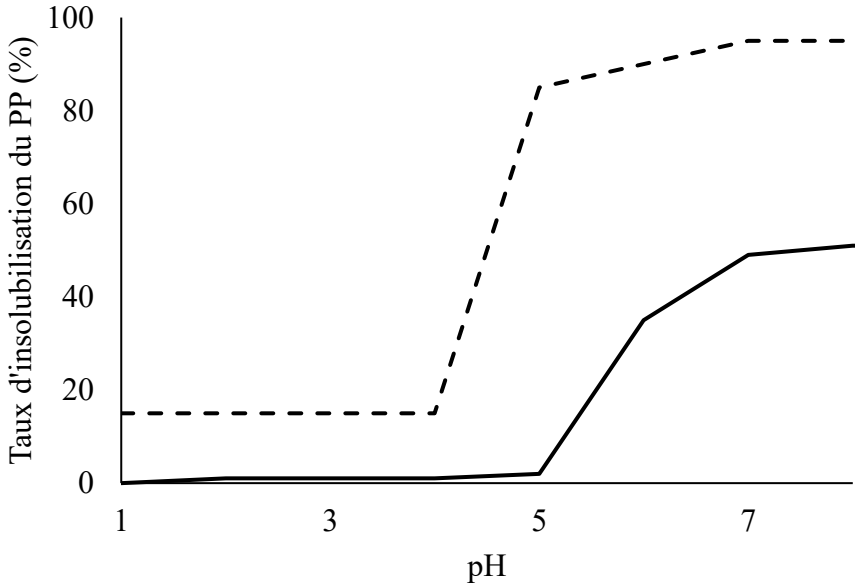


Figure 54 : Insolubilisation du phosphore phytique (PP) en fonction du pH et du ratio molaire Ca/acide phytique.
La courbe pleine représente l'insolubilisation du PP pour un ratio molaire de 3. La courbe pointillée représente l'insolubilisation du PP pour un ratio de 13. Données tirées de Grynspan et Cheryan (1983).

les travaux de Ding et al. (2018) : 16, 30 et 35 cm/kg de PV pour le duodénum, le jéjunum et l'iléon, respectivement.

Chez le poulet de chair, il existe un flux rétrograde de la MS du duodénum vers le gésier (Svihus et al., 2002 ; van der Klis et al., 1990). Ce mouvement rétrograde permettrait de palier les courts TMR de la MS dans les segments gastriques et d'améliorer l'efficience alimentaire (Clench and Mathias, 1995). Roche et Decerprit (1977) ont montré que la plus forte activité motrice du gésier décrite chez la poule pondeuse par rapport au poulet de chair limiterait fortement le reflux duodénal. De ce fait, la vidange gastrique est considérée unidirectionnelle sans mouvements rétrogrades.

1.3 Modélisation des processus chimiques intervenant au cours de la phase gastrique

1.3.1 Hydrolyse du phosphore phytique par la phytase au cours de la phase pré-intestinale

1.3.1.1 Solubilisation et insolubilisation du phosphore phytique

Avant de pouvoir être hydrolysé par la phytase, le PP_{ins} doit être solubilisé en PP_{sol}. Selon Kemme et al. (2006), la solubilisation du PP serait l'étape limitante à l'efficacité de la phytase. Selon Evans et Pierce (1982), le PP de l'aliment demeure insoluble du fait qu'il est complexé à d'autres minéraux tels que le magnésium. La solubilisation du PP contenu dans ces complexes dépend principalement du pH et suit une fonction logistique, comme décrit par Cheryan et al. (1983) (Figure 53).

Le PP_{sol} peut ensuite être ré-insolubilisé en formant des complexes avec le Ca_{sol} (Selle et al., 2009 ; Figure 17, *page 58*), rendant inaccessibles les sites d'action à la phytase (Humer et al., 2015). L'étape d'insolubilisation de l'acide phytique est fortement dépendante du pH, comme le montrent les travaux de Nolan et Duffin (1987). De plus, selon Grynspan et Cheryan (1983), le ratio molaire Ca/acide phytique est un autre facteur influençant l'insolubilisation du PP, de telle sorte que, pour une même unité de pH, l'insolubilisation du PP augmente quand le ratio Ca/acide phytique augmente (Figure 54). Cet effet du ratio Ca_{sol}/acide phytique est la conséquence directe d'un plus grand nombre de complexes potentiellement formés lorsque la concentration en Ca soluble augmente. L'insolubilisation du PP dans le $i^{ème}$ segment par la formation de complexes Ca–acide phytique est décrit par deux variables auxiliaires dépendantes du pH ($PP_{Ca\ insolubilisation,\ pH,\ i}$) et du ratio molaire Ca_{sol}/acide phytique ($PP_{Ca\ insolubilisation,\ ratio,\ i}$) suivant une fonction logistique et asymptotique, respectivement. Les paramètres de ces

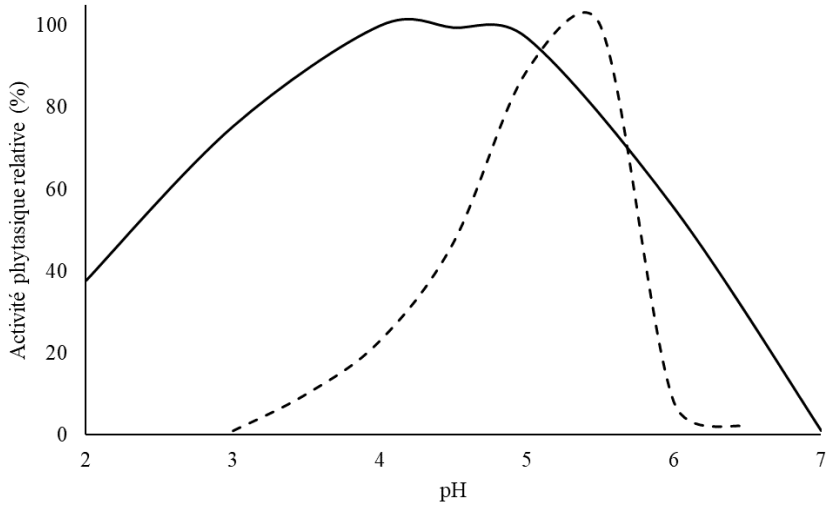


Figure 55 : Efficacité relative des phytases microbienne et végétale en fonction du pH.
La courbe pleine représente une phytase microbienne (Lautrou et al., 2021). La courbe pointillée représente une phytase végétale (Brejnhlot et al., 2011).

fonctions ont été estimés selon les données *in vitro* de Grynspan et Cheryan (1983). Suivant les conditions de pH, une partie des complexes Ca−acide phytique formés *de novo* peut de nouveau être solubilisée. Ainsi, dans le jabot et le gésier, les complexes se forment et se séparent dépendamment du pH et du temps de transit des minéraux. Le pH acide du gésier favorise principalement la solubilisation de ces complexes alors que le pH élevé du jabot favorise leur formation.

1.3.1.2 Hydrolyse du phosphore phytique par la phytase

Le PP_{sol} peut être hydrolysé en PNP_{sol} sous l'action des phytases végétale et microbienne. Dans ce modèle, l'action de ces phytases est supposée additive, conformément à ce qui a été proposé par Létourneau-Montminy et al. (2009). L'hydrolyse du PP_{sol} en PNP_{sol} (g/min) se déroule dans le jabot et le gésier et est modélisée selon une équation de cinétique enzymatique de type Michaelis-Menten. L'action de la phytase étant dépendante du pH (Lautrou et al., 2021 ; Figure 55), un facteur d'efficacité a été ajouté à l'équation de Michaelis-Menten (éq. 7) :

$$Hydrolyse\ PP_i\ (g/min) = \frac{\left(PP_i \times V_{max,PhyMic} \times k_{eff,PhyMic}\right)}{\left(PP_i + K_{M,PhyMic}\right)} + \frac{\left(PP_i \times V_{max,PhyVeg} \times k_{eff,PhyVeg}\right)}{\left(PP_i + K_{M,PhyVeg}\right)} \quad 7$$

Où, PP_i représente la quantité de PP dans le $i^{ème}$ segment (g). Les paramètres $V_{max,\ PhyMic}$ et $V_{max,\ PhyVeg}$ représentent les vitesses maximales d'hydrolyse du PP en PNP (g PNP/min/FTU) par les phytases microbienne et végétale, respectivement. Les paramètres $K_{M,\ PhyMic}$ et $K_{M,\ PhyVeg}$ sont les constantes de Michaelis (g de PP) des phytases microbienne et végétale, respectivement. La constante de Michaelis correspond à la quantité de substrat nécessaire pour atteindre une vitesse de réaction équivalente à la moitié de la V_{max}. Les paramètres V_{max} et K_M de la phytase microbienne ont été déterminés à partir des travaux de Menezes-Blackburn et al. (2015) et ceux de la phytase végétale à partir des données de cinétique d'une phytase de blé (Dionisio et al., 2011). Les paramètres $k_{eff,\ PhyMic}$ et $k_{eff,\ PhyVeg}$ représentent les taux d'efficacité, en fonction du pH (%), de la phytase microbienne et végétale, respectivement. Ces paramètres ont été caractérisés à partir des données résumées par Lautrou et al. (2021) et de Brejnholt et al. (2011) pour les phytases microbiennes de nouvelles générations et la phytase végétale.

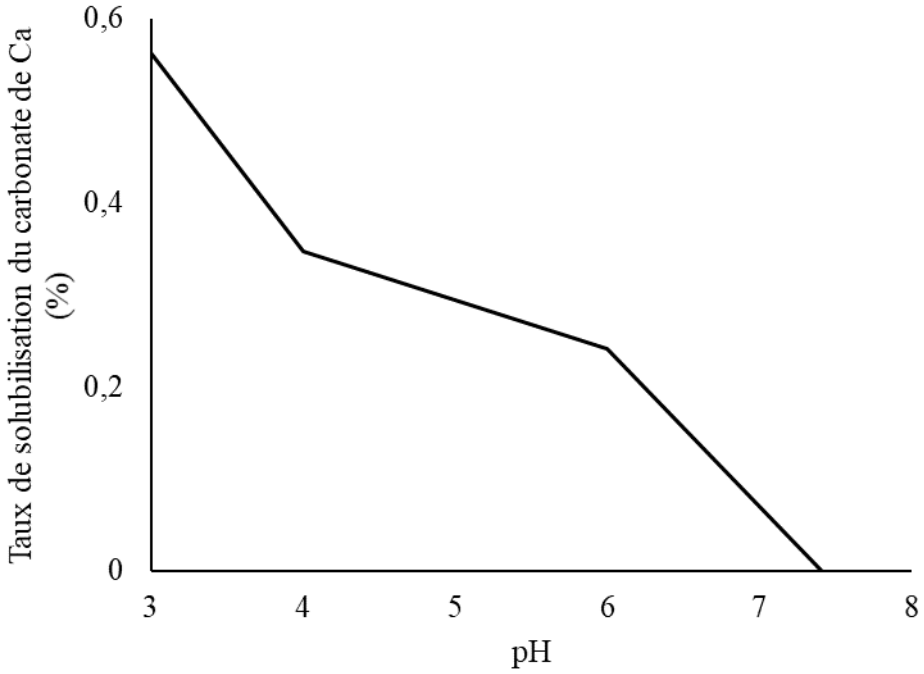


Figure 56 : Solubilisation *in vitro* du carbonate de Ca en fonction du pH.
Données tirées de Bo-Linn et al. (1984).

1.3.2 Devenir du carbonate de calcium au cours de la phase pré-intestinale

Le carbonate de Ca représente la principale source de Ca pour la poule pondeuse. Dans une ration formulée pour apporter 35 g de Ca par kg d'aliment, environ 90 % du Ca est apporté par le carbonate de Ca. Celui-ci peut être caractérisé par sa teneur en Ca, sa capacité de solubilisation ou encore son contenu en autres minéraux (Gilani et al., 2022) ; ces derniers n'étant pas considérés dans le modèle. Comme mentionné précédemment, le carbonate de Ca est également défini par la taille de particules (mm) et leur niveau d'incorporation (%).

La solubilisation des particules de carbonate de Ca dépend de différents facteurs, en particulier du pH (Chan et Rochelle, 1982), et est simulée par l'équation suivante (eq. 8) :

$$CaCO_3 + 2H^+ \rightarrow Ca^{2+} + H_2O + CO_2 \qquad 8$$

La solubilisation du Ca augmente lorsque la concentration en H^+ augmente (Figure 56) et suit une régression logistique (Bo-Linn et al., 1984). La solubilisation du Ca diminue lorsque le niveau de Ca alimentaire augmente (Rao et Roland, 1990), pouvant traduire une limite de capacité du gésier à retenir et solubiliser le Ca au-delà d'une certaine concentration (Zhang et Coon, 1997). L'effet du niveau alimentaire de Ca sur sa solubilisation a été paramétré suivant les données de Rao et Roland (1989).

Le temps de résidence du carbonate de Ca particulaire plus élevé par rapport au carbonate de Ca fin dans le gésier induit un processus de solubilisation particulier (eq. 6). Du fait de la complexité de cette forme de Ca et de l'importance de disposer d'un pH acide, aucun processus de solubilisation du Ca particulaire n'est décrit dans le jabot. Dans le gésier, seule la surface des larges particules est accessible aux acides. De ce fait, leur comportement de solubilisation n'est pas immédiat et dépend d'un autre facteur, la constante de dissolution (k_{dis}) (Carletti et al., 2015). Cette constante traduit le fait que les larges particules diminuent en taille au fur et à mesure de leur dissolution, libérant progressivement le Ca soluble. La constante k_{dis} a été estimée à 0,04 $minute^{-1}$, basé sur les travaux de Shih et al. (2000). Pour résumer, le TMR du carbonate de Ca est un paramètre synthétique, regroupant à la fois les informations relatives à son temps de résidence dans le gésier et sa dissolution par les acides. Dans le cas des FP, étant donné leur très rapide solubilisation, nous ne considérons pas de k_{dis}.

Du fait de la formation de complexes avec le PP, une partie du $Ca_{carbonate,\ sol}$ peut être insolubilisée (Figure 48). Le flux d'insolubilisation du Ca dans le $i^{ème}$ segment est modélisé en fonction du flux d'insolubilisation du PP_{sol} en PP_{ins} (eq. 9) :

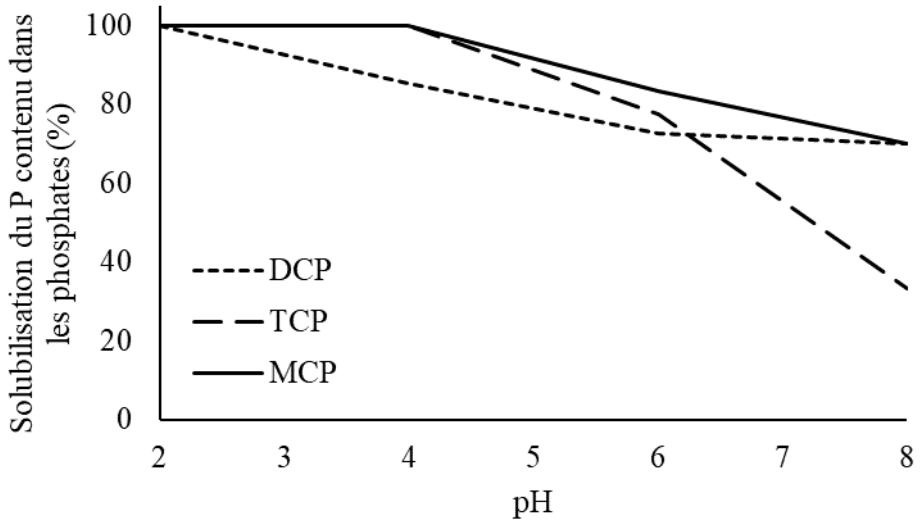


Figure 57 : Solubilisation relative du P porté par les phosphates en fonction du pH.
La courbe pleine représente le phosphate monocalcique (MCP), la courbe en pointillés courts représente le phosphate bicalcique (DCP) et la courbe en pointillés longs représente le phosphate tricalcique (TCP). Données adaptées de Chow (2001).

$$Insolubilisation_{Ca\ sol,i}(g/min) = Insolubilisation_{PP\ sol,i} \times ratio_{Ca:AP} \times 0{,}72 \quad 9$$

Où, $Insolubilisation_{PP\ sol,\ i}$ représente le flux d'insolubilisation du PP dans le $i^{ème}$ segment (g/min) et le paramètre $ratio_{Ca:AP}$ représente le ratio molaire entre le Ca et l'acide phytique dans les complexes. Comme proposé par Marini et al. (1985), ce rapport est fixé à 3, en considérant qu'une molécule d'acide phytique estérifiée par 6 groupements phosphates peut porter jusqu'à 3 molécules de Ca. Le facteur 0,72 représente la proportion de PP dans la molécule d'acide phytique. Cette équation d'insolubilisation du Ca sera reprise pour toutes les autres formes de Ca ($Ca_{min,\ sol}$, $Ca_{veg,\ sol}$ et $Ca_{ani,\ sol}$).

Une partie du Ca soluble peut se complexer avec les PO_4 lorsque le pH est supérieur à 5,0 (Selle et al., 2009), selon la relation suivante (éq. 10) :

$$3Ca + 2PO_4 \rightarrow Ca_3(PO_4)_2 \quad 10$$

Cette réaction est caractérisée par une constante de dissociation, k_d. Pour toute réaction de forme $nA + mB \rightarrow A_nB_m$, la constante de dissociation est définie comme suit (éq. 11) :

$$K_d = \frac{A^n \times B^m}{A_nB_m} \quad 11$$

Où, A, B et A_nB_m sont les quantités (g) en substrat A, B et en produit A_nB_m, respectivement. Selon les travaux de Gosselin et Coghlan (1953), la constante de dissociation du phosphate monocalcique vaut 0,014 min^{-1}. L'insolubilisation du P par précipitation avec le Ca lorsque le pH est supérieur à 5,0 est défini par l'équation suivante (éq. 12) :

$$Insolubilisation\ Ca_{phosphate,i}(g/min) = \frac{{Ca_{sol,i}}^3 \times {P_{sol,i}}^2}{K_d} \times Ca_{phosphate,i} \quad 12$$

Où, $Ca_{sol,\ i}$ et $P_{sol,\ i}$ représentent les quantités de Ca et P soluble, en g, dans le $i^{ème}$ segment, respectivement.

1.3.3 Devenir des phosphates au cours de la phase pré-intestinale

Les phosphates de Ca sont une source non négligeable de P et de Ca facilement utilisable par l'animal (Sauvant et al., 2004). Dans ce modèle, trois types de phosphates sont considérés : le phosphate monocalcique (PMC), le phosphate dicalcique (PDC) et le phosphate tricalcique (PTC). Ces sources sont parmi les plus utilisées pour la nutrition des poules pondeuses. La solubilisation des phosphates se déroule dans le jabot et le gésier. Elle dépend du type de phosphate considéré et du pH (Figure 57 ; Macha et al., 2015), suivant une fonction logistique

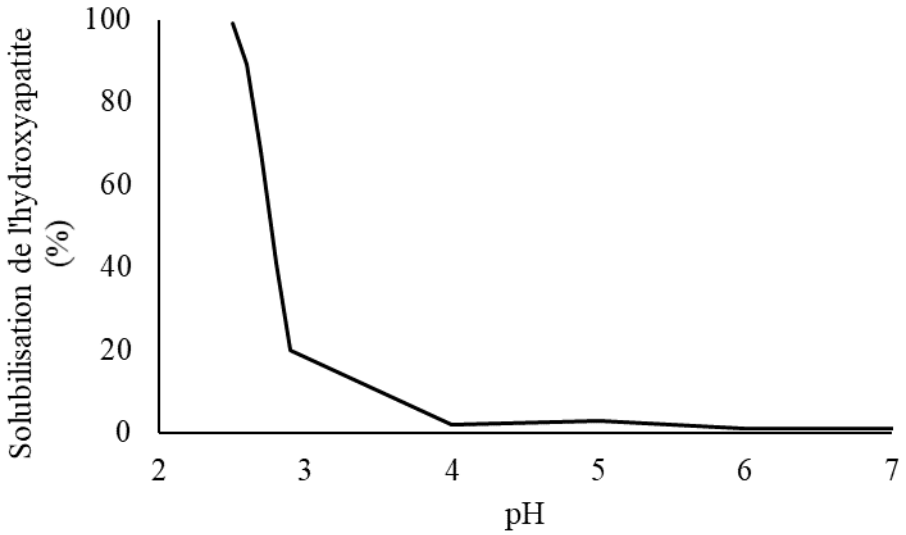


Figure 58 : Solubilisation des cristaux d'hydroxyapatite en fonction du pH.
Données tirées de Len et al. (2019).

(Chow, 2001). Aussi, trois variables auxiliaires ont été paramétrées pour le P : $PMC_{P\ solubilisation,\ i}$, $PDC_{P\ solubilisation,\ i}$, $PTC_{P\ solubilisation,\ i}$; et trois variables auxiliaires pour le Ca : $PMC_{Ca\ solubilisation,\ i}$, $PDC_{Ca\ solubilisation,\ i}$, $PTC_{Ca\ solubilisation,\ i}$. Selon Rao et al. (1995), la solubilisation des phosphates dépend également du ratio molaire entre le Ca et P dans le segment d'intérêt. Afin de considérer cet effet, nous avons défini une variable auxiliaire, $k_{phosphate\ solubilisation}$.

Comme mentionné précédemment, lorsque le pH est supérieur à 5,0, une partie des phosphates peut être insolubilisée en formant des complexes avec le Ca (Selle et al., 2009), selon la relation suivante (éq. 12) :

$$Insolubilisation\ P_{phosphate,i}(g/min) = \frac{{Ca_{sol,i}}^3 \times {P_{sol,i}}^2}{K_d} \times P_{phosphate,i} \qquad 12$$

Où, $Ca_{sol,\ i}$ et $P_{sol,\ i}$ représentent les quantités de Ca et P soluble, en g, dans le $i^{ème}$ segment, respectivement.

1.3.4 Devenir des autres formes minérales au cours de la phase pré-intestinale

Dans ce modèle, le Ca des matières premières végétales est considéré entièrement lié à l'acide phytique (Kornegay, 1996). La solubilisation du Ca végétal est considérée comme uniquement dépendante du pH (Grynspan et Cheryan, 1983) et se déroule dans le jabot et le gésier. Une fois solubilisé, le Ca peut former *de novo* des complexes insolubles avec le PP_{sol} ou bien avec le PNP_{sol}, selon les équations 9 et 12, respectivement.

Bien qu'interdites en Europe, les matières premières d'origine animale sont autorisées dans d'autres régions du monde telles que l'Amérique et ont la particularité d'être riches en P. Elles peuvent donc être considérées comme une source majeure de P dans l'aliment. Dans ce modèle, une seule source de Ca et P d'origine animale est considérée, la farine de viande et d'os. Comme peu de données sont disponibles quant à la solubilisation des minéraux issus de cette source, nous avons considéré que le Ca et P étaient apportés par les cristaux d'hydroxyapatite contenu dans les os. De ce fait, la solubilisation des cristaux d'hydroxyapatite a été modélisée dans le jabot et le gésier en fonction du pH selon les données de Len et al. (2019 ; Figure 58).

1.4 Modélisation du devenir du calcium et du phosphore au cours de la phase intestinale

1.4.1 Hydrolyse du phosphore phytique par la phytase intestinale

La phytase intestinale présente le long de l'intestin grêle est supposée être particulièrement active chez la volaille (Marounek et al., 2010). Chez la poule pondeuse, selon les études, la phytase intestinale peut hydrolyser entre 10 et 40 % du PP dans un régime sans phytase microbienne (Carlos et al., 1998 ; Marounek et al., 2010). De plus, au cours de l'expérimentation *in vivo* réalisée au cours de ce doctorat, 50 % du PP a été hydrolysé au niveau iléal chez les poules ne recevant pas de phytase microbienne. Des études récentes semblent indiquer que, chez la poule pondeuse, la phytase intestinale ne serait pas affectée par les niveaux de PNP alimentaires (Sommerfeld et al., 2020). Néanmoins, ces auteurs ont montré que l'activité de la phytase intestinale était diminuée par une hausse du niveau de Ca alimentaire.

Dans ce modèle, l'activité de la phytase intestinale est supposée équivalente dans les différents segments intestinaux, contrairement à ce que suggèrent Maenz et Classen (1998). De la même façon que pour les phytases microbiennes et végétales, l'hydrolyse du PP_{sol} par la phytase intestinale est supposée suivre une cinétique enzymatique de Michaelis-Menten. Les paramètres cinétiques de l'enzyme ont été déterminés à partir des travaux de Maenz et Classen (1998).

1.4.2 Insolubilisation du calcium et du phosphore dans l'intestin

L'augmentation du pH le long de l'intestin grêle favorise la précipitation du Ca et du PO_4 (Hurwitz et Bar, 1971 ; Walk et al., 2012). Cette insolubilisation se déroule selon les mêmes processus que ceux décrits dans la phase pré-intestinale par les équations 10 à 12. Ces flux d'insolubilisation sont représentés dans tous les segments intestinaux du modèle, en accord avec les observations d'Hurwitz et Bar (1968 ; 1971).

Dans ce modèle, nous considérons que dans tous les segments intestinaux, la hausse du pH favorise la formation de complexes Ca–acide phytique. Ce processus d'insolubilisation du PP et du Ca suit le même schéma que celui précédemment décrit dans la phase pré-intestinale (*cf.* éq. 9). Néanmoins, contrairement à ce qui peut être observé dans la phase pré-intestinale, aucun processus de solubilisation des complexes Ca–acide phytique n'est décrit dans les segments intestinaux, en considérant que le pH est trop élevé pour permettre ce genre de réaction.

1.4.3 Absorption du calcium

Comme décrit dans les chapitres précédents, l'absorption du Ca se déroule dans les trois segments intestinaux. Bien que l'absorption du Ca suive à la fois un mécanisme actif et passif (Gloux et al., 2020*a*), dans cette première version du modèle, seule la voie active est modélisée suivant une cinétique enzymatique de Michaelis-Menten. Cependant, la capacité d'absorption du Ca diffère en fonction du segment considéré (Hurwitz et Bar, 1965 ; 1968). Pour prendre en compte cet effet, les vitesses maximales d'absorption (V_{max}) et les constantes de Michaelis (K_M) sont définies pour chaque segment intestinal, selon les travaux d'Hurwitz et Bar (1969). De plus, la capacité d'absorption de la poule augmente lors de la phase active de calcification de la coquille (Hurwitz et al., 1973). Afin de prendre en considération cet effet, un facteur ($k_{abs,\ coquille,\ i}$) a été paramétré pour chaque segment intestinal *i*. Au final, l'absorption du Ca dans le $i^{ème}$ segment est définit comme suit (éq. 13) :

$$Absorption_{Ca,i}\ (g/min) = \frac{(Ca_i\ \times V_{max,i})}{(Ca_i\ \times K_{M,i})} \times k_{abs,coquille,i} \qquad 13$$

1.4.4 Absorption du phosphore

De la même façon que pour le Ca, l'absorption du P prend place dans les trois segments intestinaux, et chaque segment présente une capacité propre à absorber le P (Cross et al., 1990 ; Hurwitz et Bar, 1969). Basé sur les travaux de Liu et al. (2016) chez le poulet de chair, l'absorption du P a été modélisée selon un processus passif uniquement. L'absorption du P dans le $i^{ème}$ segment intestinal est défini comme suit (éq. 14) :

$$Absorption_{P,i}\ (g/min) = P_i \times k_{passive,P,i} \qquad 14$$

1.5 Validation du modèle

La validation du modèle a été réalisée en trois étapes : l'analyse de la sensibilité, c'est-à-dire la réponse de certains résultats/sorties du modèle face à la variation de ses paramètres ; la vérification du comportement du modèle et l'évaluation de la capacité de prédiction du modèle par comparaison avec des données externes.

Dans le cas présent, une analyse univariée des paramètres influençant le devenir du Ca et du P le long du TGI a été réalisée. Les plages de variations des paramètres testées correspondent à ±1,5 écart-type (ET) et ont été définies en accord avec la littérature. Ainsi, l'étendue de la variabilité du pH du jabot et des paramètres utilisés pour modéliser le pH gastrique a été déterminée à partir de l'étude *in vivo* présentée au Chapitre 3 et des travaux de Lee et al. (2018), respectivement. Les données présentées par Brejnholt et al. (2011), Menezes-Blackburn et al.

(2015) et Maenz et Classen (1998) ont été utilisées pour définir l'étendue de la variabilité des paramètres cinétiques (V_{max} et K_M) de la phytase végétale, microbienne et intestinale. Les plages de variabilité des paramètres cinétiques (V_{max} et K_M) décrivant l'absorption du Ca ont été définies à partir des données tirées de l'étude réalisée au cours de ce doctorat (*cf.* Chapitre 3) et celles décrivant l'absorption du P ont été déterminées à partir des données de Liu et al. (2016) chez le poulet de chair. La plage de variation des données relatives aux taux fractionnaire de vidange du Ca et du P dans les différents segments du TGI a été définie selon les données de la littérature (Hurwitz et Bar, 1969 ; Shires et al., 1987 ; van der Klis et al., 1990 ; van Krimpen et al., 2011). Enfin, faute de données concernant la plage de variabilité de la constante de dissolution du carbonate de Ca particulaire (k_{dis}) et des paramètres décrivant l'effet du carbonate de Ca particulaire sur l'efficacité de la phytase, nous avons estimé que ces valeurs variaient de ±25 %. À partir des différentes analyses, les indices de sensibilité proposés par Bauer et Hamby (1991) ont été calculés comme suit (éq. 15) :

$$Indice\ de\ sensibilité = \frac{\left(R_{ana,p} - R_{ref,p}\right)}{R_{ref,p}} \times 100 \qquad 15$$

Où, $R_{ana,\,p}$ représente la réponse du modèle suite à la variation du paramètre p et $R_{ref,\,p}$ représente la réponse du modèle avec la valeur originelle du paramètre p. Pour cette analyse, le scénario de référence suivant a été utilisé : une poule de 34 semaines d'âge avec un PV de 1,7 kg et recevant un aliment apportant 35 g Ca/kg d'aliment avec 75 % de carbonate particulaire (2,8 mm) et 25 % de carbonate fin (0,2 mm), 3,9 g P*t*/kg d'aliment dont 1,8 g PNP/kg d'aliment, supplémenté avec de la phytase microbienne incorporée à 300 FTU/kg. Dans ce scénario, la photopériode est fixée à 16 heures (960 minutes) avec un allumage à t = 0 minute. Enfin, nous considérons une heure de ponte à t = 60 minutes. Cette analyse a été conduite pour la phase pré-intestinale en évaluant le taux de solubilisation du Ca et P (%) en sortie de gésier, puis dans la phase intestinale en évaluant la taux d'absorption du Ca et P (%) au niveau iléal. Le taux d'hydrolyse du PP (%) a été évalué sur l'ensemble des phases pré-intestinale et intestinale, compte tenu de l'intervention des phytase végétales et microbiennes et de la phytase intestinale.

Le comportement du modèle a été évalué de deux façons. Premièrement, les scénarios expérimentaux présentés aux Chapitres 2 et 3 ont été simulés afin de comparer les valeurs prédites par le modèle avec les résultats obtenus au cours de ce doctorat (*i.e.*, la cinétique d'ingestion, les TMR des minéraux dans le jabot et le gésier et l'hydrolyse du PP). Deuxièmement, les effets des paramètres alimentaires d'intérêts (*i.e.*, Ca et PNP alimentaire, phytase microbienne et incorporation de carbonate de Ca particulaire) ont été testé de façon

conjointe afin d'étudier certaines interactions. Cette seconde analyse a été réalisée pour les paramètres où nous disposions de peu de données : solubilisation et absorption des minéraux.

L'évaluation externe du modèle a été réalisée à partir de deux bases de données. La première a été constituée pour réaliser la méta-analyse de la réponse de la poule pondeuse à la phytase microbienne (*cf*. Chapitre 1). Cette base de données contient 58 observations de DPCA du P et du Ca tirées de 12 publications. La seconde base de données constituée contient des données permettant d'évaluer l'hydrolyse du PP en réponse à la phytase microbienne. Cette base de données contient 37 observations issues de 5 publications. Afin de prendre en compte l'effet expérimentation, les données observées ont été corrigées par cet effet, comme précédemment proposé par Strathe et al. (2007). Pour ce faire, l'effet expérimentation a été considéré comme un effet aléatoire dans une procédure de régression linéaire mixte à l'aide du modèle suivant :

$$Y_{ij} = B_0 + S_i + B_i X_{ij} + b_i X_{ij} + e_{ij} \qquad 16$$

Où, Y_{ij} repésente la variable dépendante du $j^{ème}$ traitement de la $i^{ème}$ étude, B_0 l'intercept global de l'ensemble des études, X_{ij} la variable indépendante du $j^{ème}$ traitement de la $i^{ème}$ étude, S_i l'effet aléatoire de l'étude sur l'intercept, B_i le coefficient de régression global de Y sur X pour l'ensemble des études, b_i l'effet aléatoire de l'étude sur le coefficient de régression, et e_{ij} l'erreur résiduelle non expliquée par le modèle. La qualité de la prédiction du modèle a été évaluée à l'aide de deux paramètres. Premièrement, en déterminant la droite de régression des valeurs observées en fonction des valeurs prédites et en évaluant son écart moyen par rapport à la droite de régression Y = X (Saint-Pierre et al., 2001). À l'aide de cette droite de régression, sont déterminés le coefficient de détermination de Pearson (R^2) et l'écart type résiduel (ETR). Deuxièmement, à l'aide de l'erreur quadratique moyenne de prédiction (MSPE) qui décrit la qualité de prédiction du modèle (Bibby et Toutenburg, 1977). Hallas et al. (2004) proposent la MSPE relative (relMSPE) qui désigne la proportion de la racine carrée de la MSPE par rapport à la moyenne des valeurs observées. La MSPE peut être divisée en trois termes : l'erreur centrale (ECT), l'erreur de régression (ER) et l'erreur liée au bruit de fond (ED) (Theil, 1961). L'erreur centrale représente le biais moyen, *i.e.*, la différence entre les valeurs observées et prédites (ECT = 0 quand la prédiction est parfaite). L'erreur de régression représente l'écart entre la droite de régression et la droite d'équation Y =X. Et l'erreur liée au bruit de fond représente l'erreur résiduelle, *i.e.*, non expliquée par le modèle.

Tableau 29: Résultats de l'analyse de sensibilité du modèle réalisée en phase pré-intestinale.[1, 2]

	Taux de solubilisation en sortie de gésier (%)													
	Ca							P						
Variation, % (± ET)	−1,5	−1	−0,5	0	0,5	1	1,5	−1,5	−1	−0,5	0	0,5	1	1,5
Paramètres de pH														
Jabot	4,3	2,5	0,3	0	−0,1	−0,4	−1,4	1,1	0,7	0,2	0	−0,3	−0,3	−2,7
Gésier[2]														
$k_{H+ max}$	−2,2	−1,2	−0,6	0	0,4	0,7	0,9	−0,3	−0,2	−0,1	0	0,1	0,2	0,2
k_s	−0,6	−0,3	−0,2	0	0,1	0,3	0,4	−0,1	0	0	0	0	0,1	0,1
Paramètres cinétiques														
Carbonate de Ca particulaire[3]														
$k_{jabot\ LP}$ (jour)	−1,4	−0,2	−0,1	0	−0,1	−0,2	−0,4	−0,1	−0,1	−0,1	0	0	0	0
$k_{jabot\ LP}$ (nuit)	−22,1	−8,1	−3,1	0	1,6	2,9	3,3	0,2	0,1	0	0	0	−0,1	−0,1
Paramètre MAX	−4,9	−2,9	−1,3	0	1,1	2,0	2,8	0	0	0	0	0	0	0
Paramètre MIN	−0,1	−0,1	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0
Point d'inflexion	−14,1	−3,3	−0,6	0	0,1	0,2	0,2	0,1	0	0	0	0	0	0
k_{dis}	−34,3	−19,3	−8,3	0	6,3	11,3	15,2	0,3	0,2	0,1	0	−0,1	−0,1	−0,1
Calcium														
$k_{jabot\ Ca}$ (jour)	−0,4	−0,1	−0,1	0	0,1	0,2	0,2	−1,5	−0,7	−0,3	0	0,2	0,3	0,4
$k_{jabot\ Ca}$ (nuit)	−0,3	−0,2	−0,1	0	0,1	0,1	0,2	−0,4	−0,3	−0,1	0	0,1	0,2	0,3
$k_{gésier\ Ca}$	2,6	1,9	0,9	0	−0,9	−1,8	−2,6	−1,1	−0,5	−0,2	0	0,1	0,2	0,3
Phosphore														
$k_{jabot\ P}$ (jour)	0,4	0,2	0,1	0	−0,1	−0,1	−0,1	−1,2	−0,2	0	0	−0,1	−0,2	−0,2
$k_{jabot\ P}$ (nuit)	0,1	0,1	0	0	0,1	0,2	0,3	−65,4	−25,1	−7,7	0	3,5	5,1	5,9
$k_{gésier\ P}$	0	0	0	0	0	0	0	−7,2	−1,1	0	0	−0,4	−1,1	−1,8

[1]Les résultats correspondent au pourcentage de variation de solubilisation du Ca ou du P suite à la variation d'un paramètre du modèle à ± 1,5 ET.
[2]$k_{H+ max}$, paramètre décrivant la sécrétion maximale de H^+ dans le gésier ; k_s, paramètre de sécrétion de H^+, *i.e.*, quantité de MS pour laquelle la sécrétion de H^+ vaut 50% de la sécrétion maximale ; k, taux fractionnaire de passage. Paramètre décrivant le passage du minéral au travers du TGI ; k = 1/TMR. Au niveau du jabot, suite à l'expression de l'appétit Ca spécifique le TMR est fortement ralentit, d'où la distinction entre k_{jabot} (jour) et k_{jabot} (nuit) ; Paramètre MAX, Paramètre MIN et Point d'inflexion sont les paramètres de la fonction logistique décrivant le TMR du carbonate de Ca en fonction de la taille des particules (mm) ; k_{dis}, constante de dissolution du carbonate de Ca particulaire (min^{-1}).
[3]Carbonate de Ca particulaire ≥ 0,8mm, par opposition au Ca fin (*i.e.*, toutes les autres formes de Ca).

2 Résultats et discussion

2.1 Analyse de la sensibilité

2.1.1 Calcium et phosphore solubilisés en sortie de gésier

L'analyse de sensibilité révèle que le pH du jabot est peu influent sur la solubilisation du Ca et du P (Tableau 29). Bien que le pH soit décrit comme un facteur majeur affectant la solubilisation des minéraux (Bo-Linn et al., 1984 ; Chow, 2001), s'ils ne sont pas solubilisés dans le jabot, ils pourront l'être dans le gésier où l'acidité est plus importante (Gordon et Roland, 1997). Néanmoins, il apparait que l'augmentation du pH dans le jabot de +1,5 ET diminue la solubilisation du P et du Ca de 2,7 et 1,4 %, respectivement. Cela s'explique par la formation de complexes entre P et Ca ou entre le PP et Ca (Selle et al., 2009) lesquels sont reconnus pour altérer l'utilisation du P par l'animal (Kim et al. 2018). L'effet plus marqué sur le P par rapport au Ca pourrait être le résultat d'une plus faible concentration de P par rapport au Ca. La variation des paramètres de l'équation gouvernant le pH gastrique n'influe que très peu sur la solubilisation du Ca et du P. La variation des paramètres de l'équation de +1,5 ET induit une variation du pH de 18 % (3,3 à 3,9). Ce pH demeure acide et inférieur au seuil nécessaire (pH ≥ 5,0) pour la formation des complexes Ca−P ou Ca−PP.

La solubilisation du Ca est particulièrement sensible au TMR du carbonate de Ca particulaire dans le gésier, passant de −14,1 à +0,2 % pour les plages de variation testées. Une baisse de la valeur du point d'inflexion se traduisant par une baisse du TMR du Ca particulaire dans le gésier, il n'est pas surprenant que la diminution de ce paramètre diminue le taux de solubilisation du Ca. La constante de dissolution du Ca se révèle très influente puisqu'une variation de ce paramètre de ±1,5 ET modifie la solubilisation du Ca de −34,3 à +15,2 %. Ce paramètre a été estimé à partir des travaux de Shih et al. (2000) sur la solubilisation du $CaCO_3$. Au vu de son influence sur le modèle et de l'importance du Ca particulaire pour la poule pondeuse, il apparait essentiel d'affiner ce paramètre, par la mise en place d'expérimentation *in vitro* décrivant le comportement du Ca particulaire en milieu acide par exemple.

Le TMR du Ca et du P en fin de photopériode se révèle très influent sur le taux de solubilisation du Ca et du P en sortie de gésier. Par exemple, la variation du taux fractionnaire de vidange du Ca particulaire, du Ca fin et du P la nuit de −1,5 à +1,5 ET induit une modification de la solubilisation de −22,1 à +3,3 %, de +2,6 à −2,6 % et de −65,4 à +5,9 %, respectivement. Diminuer le TMR du Ca (*i.e.*, augmenter le taux fractionnaire de vidange) induit une baisse de la solubilisation du Ca fin. Ces observations sont en accord avec Bo-Linn et al. (1984) qui

Tableau 30 : Résultats de l'analyse de sensibilité du taux d'hydrolyse du PP au niveau iléal réalisée dans les phases pré-intestinale et intestinale.[1, 2]

	Hydrolyse du PP (%)						
Variation, % (± ET)	−1,5	−1	−0,5	0	0,5	1	1,5
Paramètres du pH							
Jabot	11,1	13,3	11,6	0	−20,9	−38,3	−40,3
Gésier[2]							
$k_{H+\ max}$	2,7	1,5	0,6	0	−0,4	−0,7	−0,9
k_s	0,6	0,4	0,2	0	−0,2	−0,3	−0,4
Paramètres cinétiques							
Phosphore							
$k_{jabot\ P}$ (jour)	16,2	8,4	3,3	0	−2,2	−3,8	−4,9
$k_{jabot\ P}$ (nuit)	13,6	8,2	3,8	0	−3,4	−6,4	−8,3
$k_{gésier\ P}$	11,3	5,5	2,2	0	−1,6	−2,8	−3,8
Carbonate de Ca particulaire[3]							
$k_{jabot\ LP}$ (jour)	0,4	0,2	0	0	0	−0,1	−0,1
$k_{jabot\ LP}$ (nuit)	0,3	0,2	0,1	0	0	−0,1	−0,1
Paramètre MIN	−2,5	−1,6	−0,8	0	0,7	1,4	2,0
Paramètre MAX	−2,4	−1,5	−0,7	0	0,7	1,3	1,9
Point d'inflexion	−2,2	−1,4	−0,7	0	0,6	1,2	1,7
Calcium							
$k_{jabot\ Ca}$ (jour)	−11,9	−5,4	−1,9	0	1,1	1,9	2,4
$k_{jabot\ Ca}$ (nuit)	−5,4	−3,6	−1,5	0	1,1	1,9	2,5
$k_{gésier\ Ca}$	−1,6	−0,9	−0,4	0	0,3	0,6	0,9
Paramètres des phytases							
Phytase végétale							
K_M	0,8	0,5	0,2	0	−0,2	−0,4	−0,6
V_{max}	−0,9	−0,6	−0,3	0	0,3	0,5	0,8
Phytase microbienne							
$K_{M,\ jabot}$	7,3	3,9	1,6	0	−1,2	−2,2	−3,0
$K_{M,\ gésier}$	5,9	3,2	1,3	0	−1,0	−1,8	−2,4
$V_{max,\ jabot}$	−2,9	−1,8	−0,9	0	0,8	1,4	2,0
$V_{max,\ gésier}$	−3,1	−2,0	−0,9	0	0,9	1,7	2,5
Phytase intestinale							
K_M	2,8	1,7	0,8	0	−,7	−1,3	−1,8
V_{max}	−1,4	−,09	−,05	0	0,5	0,9	1,3

[1]Les résultats correspondent au pourcentage de variation de solubilisation du Ca ou du P suite à la variation d'un paramètre du modèle à ±1,5 ET.

[2]$k_{H+\ max}$, paramètre décrivant la sécrétion maximale de H^+ dans le gésier ; k_s, paramètre de sécrétion de H^+, *i.e.*, quantité de MS pour laquelle la sécrétion de H^+ vaut 50 % de la sécrétion maximale ; k, taux fractionnaire de vidange. Paramètre décrivant le vidange du minéral au travers du TGI ; k = 1/TMR. Au niveau du jabot, le TMR est fortement ralentit en fin de photopériode suite à l'expression de l'appétit Ca spécifique, d'où la distinction entre k_{jabot} (jour) et k_{jabot} (nuit) ; Paramètre MAX, Paramètre MIN et Point d'inflexion, paramètres de la fonction logistique du TMR du Ca particulaire ; V_{max}, vitesse maximale de l'enzyme, *i.e.*, vitesse de l'enzyme alors qu'elle est saturée par le substrat ; K_M, concentration en substrat pour laquelle l'enzyme atteint 50 % de sa V_{max}.

[3]Carbonate de Ca particulaire ≥ 0,8 mm, par opposition au Ca fin (*i.e.*, toutes les autres formes de Ca).

décrivent une hausse de la solubilisation du Ca avec l'augmentation du temps de contact avec l'acide. À l'inverse, pour le P et le Ca particulaire augmenter le taux fractionnaire de vidange du jabot induit une hausse de la solubilisation. Concernant le P, cela traduit le fait que le TMR soit très influent sur la formation de complexes avec le Ca ; donc réduire le temps de résidence du P dans le jabot limite la formation de ces complexes, ce qui favorise la solubilisation du P. Pour le Ca particulaire, étant donné que ce modèle ne considère pas de solubilisation de cette forme de Ca dans le jabot, augmenter le TMR dans ce compartiment ralentit le passage du Ca vers son lieu de solubilisation (*i.e.*, le gésier). Cette analyse montre l'importance du TMR sur la solubilisation des minéraux dans la phase pré-intestinale. Au vu des données présentes dans la littérature, le TMR dans les différents segments du TGI est un paramètre très variable : 62,2 ± 32,2 minutes dans le jabot et 26,8 ± 13,2 minutes dans le gésier. De plus, en nous appuyant sur les résultats obtenus au cours de ce doctorat, il semblerait que le TMR de la MS ne soit pas un bon indicateur du TMR des minéraux dans les différents segments du TGI, notamment dans le jabot et le gésier. Il apparait légitime de prévoir une re-paramétrisation de ces paramètres basée sur une expérimentation *in vivo* comme celle présentée par Rao et al. (1992). Brièvement, ces auteurs ont intubé une quantité X de minéral à t = 0, puis ils ont dosé le minéral dans les différents segments du TGI à différents temps post-intubation.

2.1.2 Hydrolyse du phosphore phytique le long du tractus gastro-intestinal de la poule pondeuse

Le TMR du P apparait comme un facteur modulant fortement l'activité de la phytase en phase pré−intestinale (Tableau 30). Ainsi, la variation du taux fractionnaire de vidange du P dans le jabot et le gésier de −1,5 à +1,5 ET induit une variation de l'hydrolyse du PP de +16,2 à −4,9 % et de +11,3 à −3,8 %, respectivement. Ce résultat traduit le fait que le TMR du P dans le compartiment agisse comme un régulateur du temps de contact entre l'enzyme et son substrat. De la même façon, la variation du taux fractionnaire de vidange du Ca dans le jabot de ±1,5 ET modifie l'hydrolyse du PP de −11,9 à +2,4 %. Ceci indique que plus le Ca réside longtemps dans le jabot, plus il peut former des complexes avec le PP, limitant ainsi l'action de la phytase microbienne (Selle et al., 2009). Cette observation n'est pas confirmée en présence de Ca particulaire, indiquant la plus faible capacité du Ca particulaire à se complexer au P (Manangi et Coon, 2007). Une fois encore, le TMR du P dans le jabot et le gésier ressort comme un facteur très influent sur le comportement du modèle et la libération de PNP_{sol} par la phytase.

Cette analyse montre également le fort effet du pH du jabot sur l'hydrolyse du PP : +11,1 et −40,3 % pour une variation du pH de ±1,5 ET. Cette observation traduit l'effet du pH

Tableau 31 : Résultats de l'analyse de sensibilité de la digestibilité pré-caecale apparente du Ca et du P réalisée dans les phases pré-intestinale et intestinale.[1]

	Digestibilité pré-caecale apparente (%)													
	Ca							P						
Variation, % (± ET)	−1,5	−1	−0,5	0	0,5	1	1,5	−1,5	−1	−0,5	0	0,5	1	1,5
Paramètres du pH[2]														
Jabot	5,3	3,9	1,6	0	−2,0	−2,8	−3,9	5,8	4,2	4,2	0	−8,1	−14,5	−14,7
Gésier														
$k_{H+\,max}$	−1,7	−1,0	−0,4	0	0,3	0,5	0,7	1,8	0,9	0,4	0	−0,3	−0,5	−0,7
k_s	−0,4	−0,3	−0,1	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,2	0,1	0	−0,1	−0,2	−0,3
Paramètres cinétiques														
Carbonate de Ca particulaire[3]														
$k_{jabot\,LP}$ (jour)	0,7	0,4	0,3	0	−0,4	−0,7	−0,9	3,6	2,3	0	0	−0,8	−1,4	−2,1
$k_{jabot\,LP}$ (nuit)	−23,7	−8,7	−3,3	0	1,8	3,2	3,6	1,6	0,9	0,4	0	−0,2	−0,4	−0,6
Point d'inflexion	−14,8	−3,5	−0,7	0	0,1	0,2	0,2	2,1	0,4	0,1	0	0	0	0
k_{dis}	−35,6	−19,9	−8,5	0	6,4	11,3	15,2	7,0	4,5	2,1	0	−1,6	−3,0	−4,2
Calcium														
$k_{jabot\,Ca}$ (jour)	−0,3	−0,2	−0,1	0	0,1	0,2	0,3	−2,9	−1,3	−0,5	0	0,3	0,4	0,5
$k_{jabot\,Ca}$ (nuit)	−0,8	−0,5	−0,2	0	0,2	0,3	0,4	−1,8	−1,2	−0,5	0	0,4	0,7	0,9
$k_{gésier\,Ca}$	3,2	2,2	1,1	0	−0,9	−1,9	−2,7	−0,6	−0,5	−0,3	0	0,4	0,7	1,1
Phosphore														
$k_{jabot\,P}$ (jour)	1,4	0,9	0,4	0	−0,2	−0,4	−0,5	3,4	1,9	0,9	0	−0,6	−1,1	−1,4
$k_{jabot\,P}$ (nuit)	3,6	1,9	0,8	0	−0,6	−0,9	−1,0	3,2	2,3	1,2	0	−1,0	−1,9	−2,6
$k_{gésier\,P}$	1,2	0,5	0,1	0	−0,1	−0,1	−0,1	1,8	1,7	0,9	0	−0,8	−1,5	−2,1
Digesta														
$k_{duodénum\,digesta}$	−0,3	−0,2	−0,1	0	0	0,1	0,1	−9,4	−5,7	−2,6	0	2,2	4,1	5,7
$k_{jéjunum\,digesta}$	2,0	1,3	0,7	0	−0,6	−1,3	−1,9	−1,9	−1,3	−0,6	0	0,6	1,1	1,6
$k_{iléon\,digesta}$	0,1	0,1	0	0	0	−0,1	−0,1	0	0	0	0	0	0	0

[1]Les résultats correspondent au pourcentage de variation d'hydrolyse du PP suite à la variation d'un paramètre du modèle à ± 1,5 ET.

[2]$k_{H+\,max}$, sécrétion maximale de H^+ dans le gésier ; k_s, quantité de MS pour laquelle la sécrétion de H^+ vaut 50% de la sécrétion maximale ; k, taux fractionnaire de passage. Paramètre décrivant le passage du minéral au travers du TGI ; k = 1/TMR. Au niveau du jabot, le TMR est fortement ralentit en fin de photopériode suite à l'expression de l'appétit Ca spécifique, d'où la distinction entre k_{jabot} (jour) et k_{jabot} (nuit) ; Point d'inflexion, paramètre de la fonction logistique du TMR du Ca particulaire.

[3]Carbonate de Ca particulaire ≥ 0,8mm, par opposition au Ca fin (*i.e.*, toutes les autres formes de Ca).

Tableau 31 (suite)

	Digestibilité pré-caecale apparente (%)													
	Ca							P						
Variation, % (± ET)[1,2]	−1,5	−1	−0,5	0	0,5	1	1,5	−1,5	−1	−0,5	0	0,5	1	1,5
Paramètres d'absorption du Ca														
$V_{max,\ Ca\ absorption,\ duodénum}$	−11,5	−7,3	−3,5	0	3,1	6,0	8,6	−0,4	−0,3	−0,2	0	0,2	0,3	0,5
$K_{M,\ Ca\ absorption,\ duodénum}$	12,8	7,0	3,0	0	−2,3	−4,2	−5,7	1,4	0,4	0,2	0	−0,1	−0,2	−0,3
$V_{max,\ Ca\ absorption,\ jéjunum}$	−18,5	−11,6	−5,4	0	4,8	8,9	12,6	−0,7	−0,5	−0,3	0	0,3	0,6	1,3
$K_{M,\ Ca\ absorption,\ jéjunum}$	12,0	7,5	3,6	0	−3,2	−6,1	−8,7	1,9	0,6	0,3	0	−0,2	−0,4	−0,5
$V_{max,\ Ca\ absorption,\ iléon}$	−1,2	−0,8	−0,4	0	0,4	0,8	1,2	0	0	0	0	0	0	0
$K_{M,\ Ca\ absorption,\ iléon}$	1,4	0,7	0,3	0	−0,2	−0,4	−0,5	0	0	0	0	0	0	0
Paramètres de calcification de la coquille														
$k_{Ca\ absorption\ coquille,\ duodénum}$	−12,4	−7,6	−3,5	0	3,0	5,7	7,9	−0,2	−0,1	−0,1	0	0,1	0,1	0,3
$k_{Ca\ absorption\ coquille,\ jéjunum}$	−21,5	−13,1	−5,9	0	4,8	8,8	11,9	−0,3	−0,2	−0,1	0	0,1	0,6	1,8
$k_{Ca\ absorption\ coquille,\ iléon}$	−0,4	−0,3	−0,1	0	0,1	0,3	0,4	0	0	0	0	0	0	0
Paramètres d'absorption du P														
Paramètre $V_{max,\ P\ absorption,\ duodénum}$	0	0	0	0	0	0	0	−5,8	−3,7	−1,8	0	1,6	3,2	4,6
$K_{M,\ P\ absorption,\ duodénum}$	0	0	0	0	0	0	0	10,3	6,3	2,9	0	−2,5	−4,8	−6,8
Paramètre $V_{max,\ P\ absorption,\ jéjunum}$	0	0	0	0	0	0	0	−5,8	−3,7	−1,7	0	1,6	3,0	4,4
$K_{M,\ P\ absorption,\ jéjunum}$	0	0	0	0	0	0	0	9,0	7,6	3,1	0	−2,3	−4,1	−5,5
Paramètre $V_{max,\ P\ absorption,\ iléon}$	0	0	0	0	0	0	0	−0,2	−0,1	−0,1	0	0,1	0,1	0,1
$K_{M,\ P\ absorption,\ iléon}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[1]Les résultats correspondent au pourcentage de variation d'hydrolyse du PP suite à la variation d'un paramètre du modèle à ± 1,5 ET.

[2]V_{max}, vitesse maximale d'absorption, *i.e.*, vitesse lorsque les transporteurs sont saturés par le substrat ; K_M, concentration en substrat pour laquelle l'absorption atteint 50% de sa V_{max} ; $k_{Ca,\ absorption,\ coquille}$, paramètre simulant les adaptations physiologiques pour répondre aux fortes demandes en Ca pour la coquille.

[3]Carbonate de Ca particulaire ≥ 0,8mm, par opposition au Ca fin (*i.e.*, toutes les autres formes de Ca).

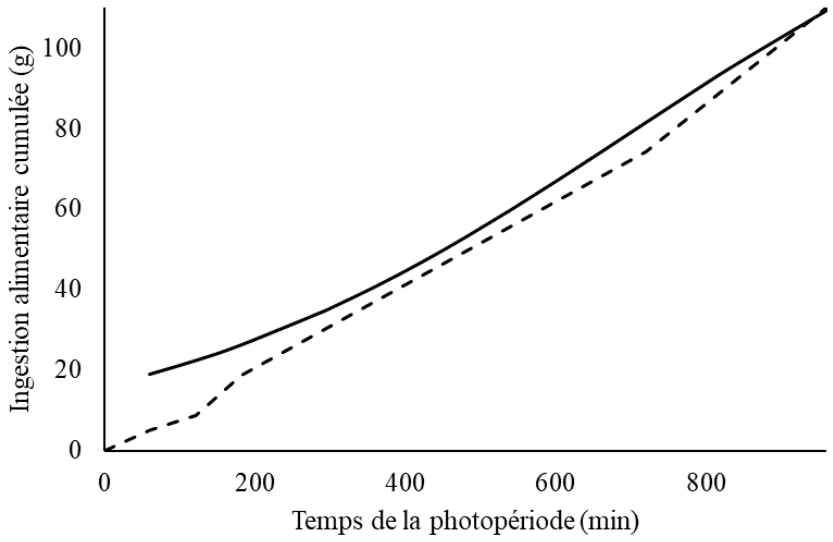


Figure 59 : Courbe d'ingestion alimentaire cumulée observée (ligne pleine) et prédite par le modèle (ligne pointillée).
La simulation du modèle mime les données expérimentales, la photopériode dure 16 heures (soit 960 minutes), débutant à t = 0. L'heure de ponte moyenne des poules lors de l'essai a été considérée : 2h56 après l'allumage, soit t = 176 minutes.

sur l'efficacité de la phytase microbienne (Dersjant-Li et al., 2015). Cela indique le rôle clé du jabot dans l'hydrolyse du PP par la phytase microbienne (Gao et al., 2013) et appui l'effet délétère de la formation de complexes Ca−acide phytique sur l'efficacité de cette enzyme (Manangi et Coon, 2007). La variation des paramètres cinétiques de la phytase végétale et intestinale se révèle peu influente sur le taux d'hydrolyse du PP. Ces résultats pourraient traduire la moindre importance de ces enzymes pour l'utilisation du PP par la poule pondeuse. Cependant, notons que l'analyse de la sensibilité a été conduite avec un régime contenant 300 FTU/kg. Afin d'évaluer la sensibilité du modèle aux variations des paramètres de la phytase intestinale, nous avons réalisé une analyse de la sensibilité pour ces paramètres dans un scénario sans phytase microbienne. Alors, la variation du K_M et de la V_{max} de la phytase intestinale de ±1,5 ET induit une variation de l'hydrolyse du PP de +8,6 à −5,9 % et de −4,8 à +4,1 %, respectivement.

2.1.3 Taux d'absorption du calcium et du phosphore dans les segments intestinaux

Les paramètres les plus influents sur la DPCA du Ca et du P sont le pH et le temps de résidence des minéraux dans la phase pré-intestinale (Tableau 31). Par exemple, la variation de la constante de dissolution du carbonate de Ca particulaire de −1,5 à +1,5 ET modifie la DPCA du Ca de −35,6 à +15,2 %. Ces éléments montrent que la solubilisation des minéraux semble être l'étape limitante de l'utilisation digestive du Ca et du P. Le temps de résidence des minéraux dans les différents segments de l'intestin influence peu le taux d'absorption des minéraux, pouvant indiquer le fait que les systèmes d'absorption soient saturés et traduisant la nécessité de paramétrer l'absorption du Ca par la voie passive. La variation des paramètres cinétiques d'absorption du Ca et du P se révèle très influente sur l'absorption des minéraux, excepté au niveau de l'iléon, en accord avec une faible capacité de ce segment à absorber le Ca et le P (Hurwitz et Bar, 1965). Cet effet est renforcé par la formation de complexes Ca−PO_4, dû au pH élevé de ce segment (Hurwitz et Bar, 1971 ; Selle et al., 2009). Le fait que l'absorption du Ca et du P soit sensible aux paramètres de l'équation d'absorption indique que de plus amples études sont nécessaires. Enfin, la variation du coefficient d'absorption du Ca en fonction de la calcification de la coquille de ±1,5 ET modifie l'absorption du Ca de −12,4 à +7,9 % dans le duodénum, de −21,5 à + 11,9 % dans le jéjunum et de −0,4 à +0,4 % dans l'iléon. Étant donné que ce paramètre a été estimé à partir d'une seule publication (Hurwitz et al., 1973) et au vu de son influence sur l'absorption du Ca, des études supplémentaires seraient nécessaires pour sa validation.

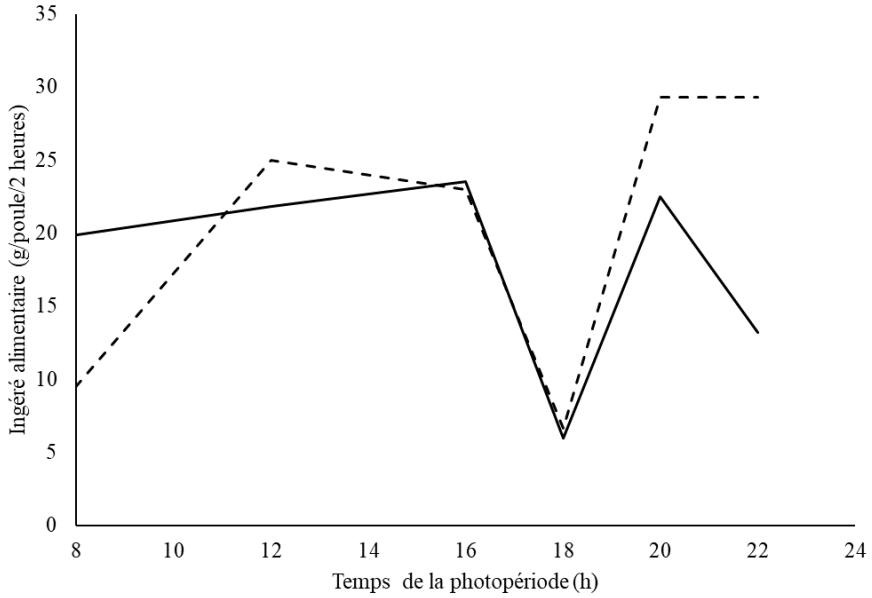


Figure 60 : Cinétique d'ingestion alimentaire de la poule pondeuse à l'échelle de la photopériode observée (courbe pleine) et simulée par le modèle (courbe pointillée).
La simulation du modèle mime les données expérimentales, la photopériode dure 16 heures, débutant à t = 0. L'heure de ponte moyenne des poules lors de l'essai a été considérée : 2h56 après l'allumage, soit t = 176 minutes.

Tableau 32 : Comparaison des valeurs de recouvrement du P et du Ca dans le jabot et le gésier observées lors l'expérimentation *in vivo* réalisée au cours de ce doctorat et prédites par le modèle.

Recouvrement (g/kg MSI)[1]	FP[2]		MIX	
	Valeur observée	Valeur prédite	Valeur observée	Valeur prédite
Quantité de MS				
Jabot	6,97	5,43	5,32	5,43
Gésier	4,18	4,31	7,03	4,31
Recouvrement du P				
Jabot	4,80	4,68	4,26	5,09
Gésier	6,45	6,63	5,28	6,76
Recouvrement du Ca				
Jabot	37,93	36,12	113,97	68,39
Gésier	41,97	40,41	689,34	111,68

[1]Recouvrement du Ca ou du P dans le jabot ou le gésier présenté au Chapitre 3 et calculé comme suit : $Recouvrement\ A\ (g/kg\ de\ MSI) = A_i \times (\frac{[Ti_{aliment}]}{[Ti_i]})$, avec A_i la concentration en Ca ou P dans le $i^{ème}$ segment (g/kg de MS) et $[Ti_{aliment}]$ et $[Ti_i]$ la concentration en marqueur indigestible (g/kg de MS) dans l'aliment et le $i^{ème}$ segment, respectivement.
[2]FP, régime où le carbonate de Ca est apporté sous forme de fines particules (≈ 0,21mm) ; MIX, régime où le carbonate de Ca est apporté sous forme de larges particules (≈ 2,8mm) à 75 % et sous forme de fines particules à 25 %.

2.2 Comportement du modèle

2.2.1 Ingestion

L'ingestion représente la seule voie d'entrée pour les différentes formes de Ca et de P. Il apparait essentiel de s'assurer que sa modélisation suive un comportement cohérent avec les profils d'ingestion observés. Dans le cadre de l'expérimentation *in vivo* (*cf*. Chapitre 2), nous avons mesuré la cinétique d'ingestion des poules pondeuses. Brièvement, trois fois au cours des quatre semaines expérimentales, nous avons prélevés les refus alimentaires de deux poules par traitement, toutes les deux heures. Afin de ne pas perturber le comportement alimentaire, les poules prélevées à chaque temps étaient différentes. À partir de ces données, nous avons établi la cinétique d'ingestion alimentaire cumulée au cours de la journée. Puisqu'aucune différence entre traitement n'a été reportée en termes d'ingestion, l'ensemble de ces données a été compilé et comparé au schéma d'ingestion alimentaire prédit par le modèle. Le modèle prédit une cinétique d'ingestion cumulée cohérente avec ce qui est observé (Figure 59, 60).

2.2.2 Transit des minéraux à travers le tractus gastro-intestinal

Le transit du digesta au travers du TGI, notamment au niveau du jabot et du gésier, est un élément majeur dans le schéma de l'utilisation digestive du Ca et du P chez la poule pondeuse. La caractérisation du TMR des minéraux dans les différents compartiments du TGI est basée sur le fait que le passage du digesta est homogène entre ses différents constituants. L'étude présentée au Chapitre 3 semble néanmoins indiquer un transit différent de la MS, du Ca et du P au travers du jabot et du gésier. Cette conclusion, basée sur les données de recouvrement des minéraux par rapport à la MS (g/kg de MSI), nous a conduit à définir un taux fractionnaire de vidange différent pour le P, le Ca fin et le Ca particulaire (Tableau 28). Par ailleurs, considérant que le digesta est broyé de façon homogène dans le gésier (Moore, 1999), un taux fractionnaire de vidange identique a été paramétré pour le Ca et le P à travers les différents segments de l'intestin. Afin de valider l'utilisation de ces différents taux fractionnaires de vidange à travers le jabot et le gésier, nous avons comparé les valeurs de recouvrement prédites par le modèle à la moyenne de celles observées dans l'expérimentation *in vivo* présentée au Chapitre 3 (Tableau 32). Pour cette analyse, nous avons simplement considéré l'effet de la taille des particules de Ca. Aussi, les résultats présentés sont la moyenne des régimes avec et sans phytase. Cette analyse semble confirmer l'hypothèse de l'utilisation de différents taux fractionnaire de vidange pour le Ca et le P. En effet, pour les régimes avec fines particules de Ca, aucune différence n'est observée entre les valeurs observées et prédites pour le recouvrement du Ca et du P dans le jabot ou le gésier. Pour les régimes contenant du Ca

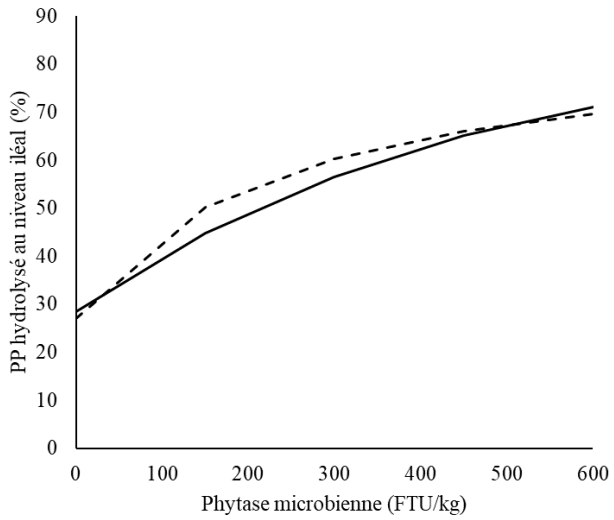


Figure 61 : Hydrolyse du PP par la phytase microbienne.
La courbe pleine désigne les données observées (tirées de la méta-analyse présentée au Chapitre 1) et la courbe pointillée représente les données simulées par le modèle.

Tableau 33 : Réponse du taux d'absorption du Ca prédit aux variations de Ca et PNP alimentaires, d'incorporation de phytase microbienne et de carbonate de Ca particulaire.

Paramètre	Coefficient	P-value
Intercept	68,21	< 0,001
Ca de l'aliment	-0,57	< 0,001
Taille des particules de Ca	1,22	< 0,001
Taux d'incorporation des LP[1]	4,69	< 0,001
R^2		0,875
RMSE		2,711

[1]LP, larges particules.

Tableau 34 : Réponse du taux d'absorption du P prédit aux variations de Ca et PNP alimentaires, d'incorporation de phytase microbienne et de carbonate de Ca particulaire.

Paramètre[1]	Coefficient	*P-value*
Intercept	60,13	< 0,001
Ca alimentaire	-0,18	< 0,001
PNP alimentaire	0,55	0,038
Taux d'incorporation de LP	7,73	< 0,001
Phytase	$2{,}53 \times 10^{-2}$	< 0,001
Phytase²	$-1{,}01 \times 10^{-5}$	< 0,001
PNP alimentaire × Phytase	$-2{,}18 \times 10^{-3}$	< 0,001
R^2		0,845
RMSE		1,817

[1]PNP, P non-phytique ; LP, larges particules.

particulaire cependant, cette analyse révèle que les valeurs de recouvrement de Ca et de P dans le jabot et le gésier prédites par le modèle sont différentes de celles observées. Ce résultat suggère que le modèle ne prend pas en compte l'effet du Ca particulaire sur la stimulation motrice du gésier et son effet sur le transit des nutriments.

2.2.3 Hydrolyse du phosphore phytique

En accord avec les résultats obtenus lors de ce doctorat, le modèle prédit que la formation de complexes entre Ca et acide phytique est plus importante en présence de fines particules de carbonate de Ca qu'en présence de larges particules. Cela diminue la capacité de la phytase à hydrolyser le PP. Par exemple, en simulant les régimes FL300 et MIX300 présentés au Chapitre 2, le modèle prédit que l'incorporation de larges particules améliore l'hydrolyse du PP de 41 % contre 35 % dans notre essai. L'écart observé entre ces deux valeurs pourrait s'expliquer par la difficulté à modéliser la formation de complexes Ca/acide phytique et leur conséquence sur l'activité de la phytase dû au manque de données existantes dans la littérature.

Ce modèle avait pour objectif de décrire l'hydrolyse du PP par la phytase. En accord avec la littérature (Gao et al., 2013 ; Couture et al., 2019), ce modèle décrit un effet quadratique de la phytase microbienne sur l'hydrolyse du PP (Figure 61) qui dépend principalement du niveau de PNP. Ces résultats sont en accord avec les observations de van der Klis et al. (1997) qui ont montré que l'incorporation de phytase microbienne (250 FTU/kg) augmente l'hydrolyse du PP de 42 et 33 points de pourcentage dans des régimes contenant 0,8 et 2,1 g de PNP/kg d'aliment, respectivement.

2.2.4 Absorption du calcium et du phosphore

La DPCA du Ca est la résultante des processus de solubilisation et insolubilisation de la phase pré-intestinale et des processus d'absorption au cours de la phase intestinale. Ce paramètre est mesuré en pratique afin de déterminer la valeur nutritionnelle d'un aliment. Néanmoins, les données de DPCA du Ca sont rares chez la poule pondeuse. La littérature renseigne principalement sur les données de rétention du Ca qui confond l'utilisation digestive et métabolique de ce minéral. Le modèle digestif développé au cours de ce doctorat indique que DPCA du Ca diminue lorsque le Ca alimentaire augmente et augmente lorsque la taille des particules augmente, en accord avec les observations réalisées au cours de ce doctorat (*cf*. Chapitre 2 ; Tableau 33). Ce modèle indique également que la DPCA du Ca augmente avec le niveau d'incorporation de carbonate de Ca particulaire. Il n'existe pas de données permettant

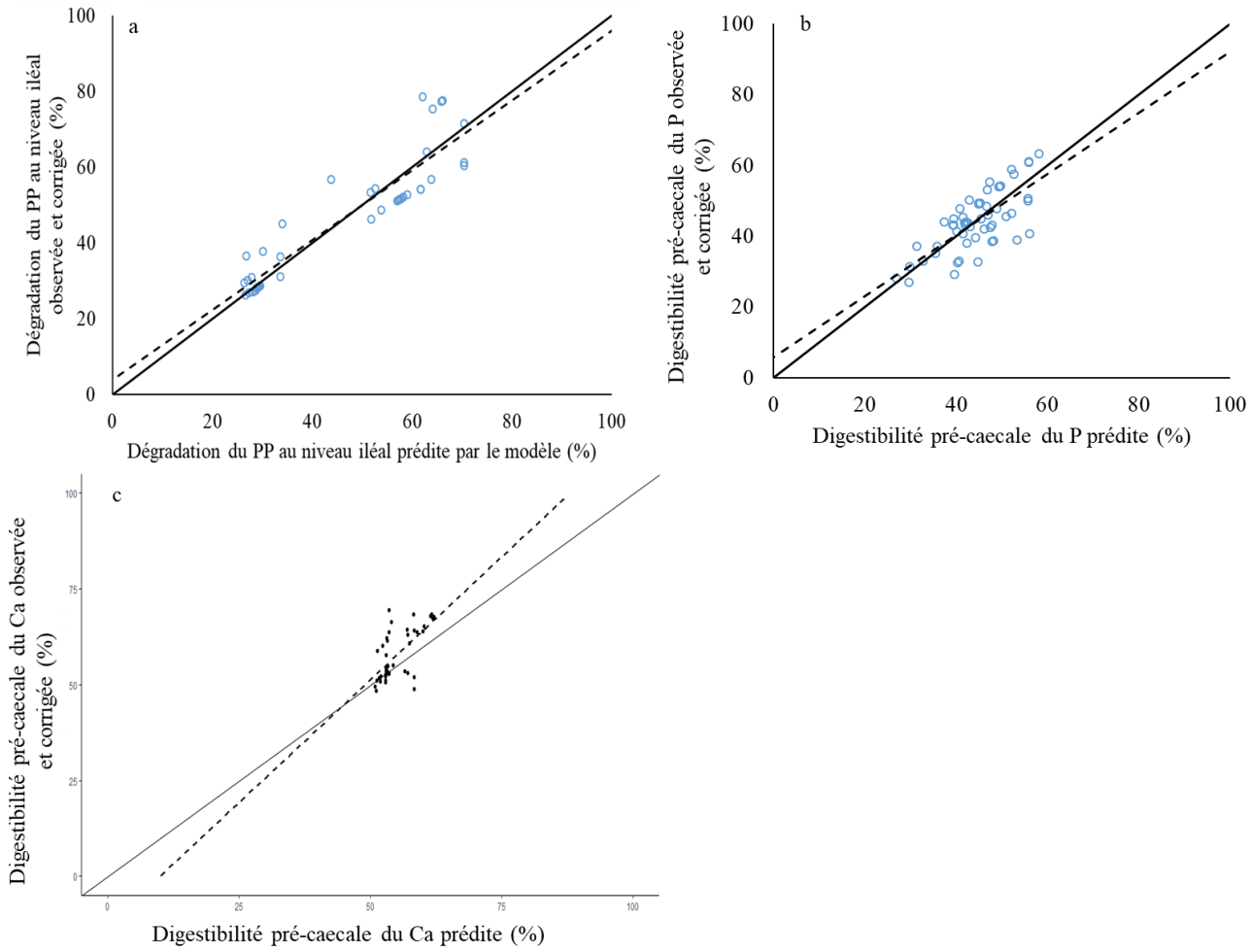


Figure 62 : Résultats de l'évaluation de la capacité de prédiction du modèle.
Figure 62*a* : Relation entre le taux d'hydrolyse de PP au niveau iléal observé et corrigé par l'effet expérimentation et prédit par le modèle : $Y_{observée*} = 2,95 + 0,93 \times Y_{prédite}$ ($R^2 = 0,87$; ETR = 5,81).
Figure 62*b* : Relation entre la digestibilité pré-cæcale apparente du P observée et corrigée par l'effet expérimentation et prédite par le modèle : $Y_{observée*} = 5,76 + 0,86 \times Y_{prédite}$ ($R^2 = 0,53$; ETR = 5,86).
Figure 62*c* : Relation entre la digestibilité pré-cæcale apparente du Ca observée et corrigée par l'effet expérimentation et prédite par le modèle : $Y_{observée*} = -12,823 + 1,28 \times Y_{prédite}$ ($R^2 = 0,46$; ETR = 8,33).

de valider ou non ce dernier point. Néanmoins, certains auteurs indiquent que la minéralisation osseuse répond de façon quadratique à ce paramètre avec un optimum situé aux alentours de 65 % d'incorporation de Ca particulaire (de Oliveira et al. 2013 ; Molnar et al., 2018). Cet effet pourrait être dû à un temps de rétention trop long du Ca particulaire dans le gésier, ne fournissant pas de Ca rapidement utilisable.

Selon le modèle, la DPCA du P dépend du niveau de PNP et du niveau d'incorporation de la phytase microbienne (Tableau 34). Ces observations sont en accord avec les résultats de la méta-analyse conduite au cours de ce doctorat (*cf.* Chapitre 1). Cependant, il apparaît que le modèle surestime la digestibilité pré-cæcale apparente du P en l'absence de phytase microbienne. Cet effet pourrait être dû au fait que les paramètres cinétiques d'absorption du P de ce modèle aient été paramétrés à partir de données mesurées chez le poulet de chair. Il apparait essentiel d'affiner la quantification de ces paramètres chez la poule pondeuse. Ce modèle indique que l'augmentation du niveau de Ca alimentaire altère la digestibilité pré-cæcale du P, cette observation est en accord avec des observations réalisées chez le poulet de chair (Rousseau et al., 2016).

2.3 Évaluation externe du modèle

2.3.1 Taux d'hydrolyse du phosphore phytique au niveau iléal

Le graphique illustré en Figure 62 représente les valeurs observées et corrigées par l'effet expérimentation en fonction des données prédites par le modèle pour la dégradation du PP au niveau iléal (62*a*), la DPCA du P (62*b*) et la DPCA du Ca (62*c*). Il indique une bonne capacité du modèle à prédire l'hydrolyse du PP au niveau iléal. L'équation de la droite de régression est $Y_{observée*} = 2,95 + 0,93 \times Y_{prédite}$ ($R^2 = 0,87$; ETR = 5,81 ; Figure 62*a*). L'ordonnée à l'origine et la pente ne diffèrent pas significativement de 0 et 1, respectivement. La relMSEP est de 13,3 % et la majeure partie de cette erreur provient de l'erreur liée au bruit de fond (86,8 %). L'ensemble des données permettant de juger de la qualité de prédiction du modèle sont présentées au Tableau 35 (*au verso*).

2.3.2 Digestibilité pré-cæcale du phosphore

L'équation de la droite de régression des valeurs observées en fonction des valeurs prédites par le modèle pour la DPCA du P est $Y_{observée*} = 5,76 + 0,86 \times Y_{prédite}$ ($R^2 = 0,53$; ETR = 5,86), où l'ordonnée à l'origine et la pente ne diffèrent pas significativement de 0 et 1, respectivement (Figure 62*b* ; $P > 0,05$). La relMSEP est de 14,4 % et la majeure partie de cette erreur provient de l'erreur liée au bruit de fond (82,5 %).

Tableau 35 : Synthèse des principaux résultats de l'évaluation externe du modèle

		Digestibilité pré-cæcale apparente (%)	
	Hydrolyse du PP (%)	P	Ca
Moyenne			
Observée	46,24	44,28	56,99
Prédite	46,72	44,58	55,87
d[1]	−0,48	−0,30	1,12
Données			
$N_{expérimentation}$	7	11	11
$N_{observation}$	39	55	54
Modèle[2]			
Ordonnée à l'origine	2,95	5,76	-12,83
P-value	NS	NS	< 0,05
Coefficient de régression	0,93	0,86	1,28
P-value	NS	NS	< 0,05
ETR	5,81	5,86	8,33
R^2	0,87	0,53	0,46
Erreur de prédiction, %[3]			
MSPE	13,31	14,42	14,82
ECT	0,6	0,23	1,78
ER	12,57	17,23	3,25
ED	86,83	82,54	94,97

[1]*d*, déviation de la moyenne par rapport à la droite d'équation Y = X.
[2]Les *p-values* correspondent aux résultats d'un test de Student afin de vérifier si l'ordonnée à l'origine et le coefficient de régression sont significativement différents de 0 et 1, respectivement. ETR, erreur-type résiduelle ; R^2, coefficient de détermination de Pearson.
[3]MSEP, *Mean Squared Prediction Error*, erreur quadratique moyenne de prédiction. Les termes EC, ER et EF correspondent à la décomposition de l'erreur de prédiction (Theil, 1961). ECT, erreur centrale ; ER, erreur de régression ; ED, erreur liée au bruit fond.

2.3.3 Digestibilité pré-cæcale du calcium

Le modèle ne prédit pas la DPCA du Ca de façon adéquate (Figure 62*c*). L'ordonnée à l'origine et la pente sont significativement différentes de 0 et 1, respectivement : $Y_{observée*} = -12{,}823 + 1{,}28 \times Y_{prédite}$ ($R^2 = 0{,}46$; ETR = 8,33). Ces résultats démontrent que le modèle sous-estime ce paramètre et ne prend pas en compte l'étendue des facteurs modulant l'absorption du Ca au niveau intestinal. La relMSEP est de 14,8 % et la majeure partie de cette erreur provient de l'erreur liée au bruit de fond (95,0 %).

2.4 Originalités du modèle

Le modèle métabolique de l'utilisation du Ca et du P chez la poule pondeuse proposé par Kebreab et al. (2009) simule le fait que le métabolisme phosphocalcique de cet animal soit entièrement tourné vers la production de l'œuf et plus particulièrement vers la calcification de la coquille, en décrivant notamment le lien fort entre le cycle d'accrétion/résorption de l'os médullaire et le cycle de production de la coquille. Ce modèle simule le fait que le métabolisme phosphocalcique est régulé à l'échelle de la journée, voire même de l'heure, en accord avec les observations de la littérature (Etches, 1987 ; Gloux et al., 2020*b* ; Hurwitz, 1989). Tout comme l'utilisation métabolique du Ca et du P est régulée à l'échelle de l'heure au cours de la journée, l'utilisation digestive de ces minéraux l'est également (Hurwitz et Bar, 1969). Pourtant, ce point n'est pas considéré par le modèle de Kebreab et al. (2009), où les mécanismes ne sont pas décrits et l'absorption est définie par une constante, *i.e.*, $k_P = 1$ et $k_{Ca} = 0{,}7$ en phase de production de la coquille et 0,4 en phase de repos.

Le modèle développé au cours de ce doctorat considère le stade physiologique de l'animal comme force motrice de l'utilisation digestive du Ca et P. En effet, le stade physiologique est reconnu pour modifier le comportement d'ingestion de l'animal (Wilkinson et al., 2011), l'activité sécrétrice (Mongin, 1980) et motrice (Roche et Decerprit, 1977) du proventricule-gésier et la capacité d'absorption des minéraux (Hurwitz et Bar, 1969). Pour ce faire, le modèle de cinétique de formation des constituants de l'œuf, proposé par Johnston et Gous (2007), a été reproduit et intégré au modèle digestif. Ainsi, il nous a été possible de synchroniser les variations de fonctions digestives au cours de la journée en fonction du cycle de calcification de la coquille. De plus, en intégrant dans le modèle des paramètres tels que l'allumage et l'extinction de la lumière, il nous est possible de décrire le comportement digestif selon différents scénarios.

La dynamique d'utilisation du Ca est un point fondamental, influençant directement le niveau de mobilisation osseuse pour produire la coquille. Ce modèle présente l'originalité de décrire le comportement du carbonate de Ca particulaire au cours de la phase pré-intestinale en simulant un plus long temps de rétention du Ca particulaire dans le gésier ainsi qu'une solubilisation progressive, comparativement aux fines particules, comme décrit dans la littérature (Roland et al., 1972 ; Zhang et Coon, 1997). Compte tenu que les rares données de la littérature ayant servi à paramétrer les équations de ce modèle, il nous est difficile de valider entièrement cette paramétrisation. Néanmoins, au vu des observations réalisées au cours de ce doctorat et présentées au Chapitre 3, il est possible que le temps moyen de rétention du Ca particulaire dans le gésier soit sous-estimé. Des études complémentaires seraient nécessaires afin d'affiner les paramètres caractérisant le devenir du Ca particulaire. L'incorporation de carbonate de Ca particulaire module également l'utilisation digestive du P, en lien avec la diminution de la formation de complexes Ca−acide phytique (Bradburry et al., 2016 ; Kim et al., 2019). Le modèle décrit effectivement une diminution de l'activité de la phytase en présence de fines particules de Ca en accord avec les observations réalisées au cours de ce doctorat.

3 Conclusion

L'objectif de ce travail était de développer un modèle mécaniste à même de prédire l'utilisation digestive du Ca et du P chez la poule pondeuse à l'échelle de la journée, tout en considérant les facteurs nutritionnels, physiologiques et environnementaux capables de moduler la réponse de l'animal. Ce modèle rend compte de la complexité de l'utilisation digestive du Ca et P chez la poule pondeuse et l'intrication forte entre la sphère digestive et la sphère métabolique et constitue une première étape vers l'élaboration de stratégies nutritionnelles de précision. La suite de ce travail consistera à affiner le paramétrage de l'absorption et de lier ce modèle avec un modèle métabolique s'inspirant par exemple de celui de Kebreab et al. (2009) afin de rendre compte des régulations fines régissant l'absorption du Ca et du P au cours de la journée.

ANNEXE 1 – *Paramètres utilisés pour le modèle*

Paramètre	Valeur	Unité
Données de pH		
pH aliment	6,0	
pH jabot	5,2	
Paramètres du pH du gésier		
k_s	2,49	g
$k_{H+\ min}$	0,13	mol/l
$k_{H+\ max}$	$5{,}73 \times 10^{-5}$	mol/l
$k_{H+\ basal}$	$1{,}59 \times 10^{-5}$	mol/minute
pH duodénum	6,2	
pH jéjunum	6,3	
pH iléon	7,3	
Taux fractionnaire de vidange		
$k_{jabot\ MS}$ (jour)	0,022	$minute^{-1}$
$k_{jabot\ MS}$ (nuit)	0,010	$minute^{-1}$
$k_{jabot\ P}$ (jour)	0,019	$minute^{-1}$
$k_{jabot\ P}$ (nuit)	0,008	$minute^{-1}$
$k_{jabot\ Ca}$ (jour)	0,025	$minute^{-1}$
$k_{jabot\ Ca}$ (nuit)	0,011	$minute^{-1}$
$k_{jabot\ LP}$ (jour)	0,012	$minute^{-1}$
$k_{jabot\ LP}$ (nuit)	0,005	$minute^{-1}$
$k_{gésier\ MS}$	0,029	$minute^{-1}$
$k_{gésier\ P}$	0,022	$minute^{-1}$
$k_{gésier\ Ca}$	0,029	$minute^{-1}$
Paramètre du TMR du carbonate de Ca particulaire		
TMR max	856	minute
TMR min	50	minute
TMR inflexion	2,49	mm
$k_{duodénum\ digesta}$	0,250	$minute^{-1}$
$k_{jéjunum\ digesta}$	0,025	$minute^{-1}$
$k_{iléon\ digesta}$	0,015	$minute^{-1}$
Paramètres cinétiques des phytases		
$V_{max,\ PhyM,\ jabot}$	0,0025	g/minute/FTU
$K_{M,\ PhyM,\ jabot}$	29,38	g
$V_{max,\ PhyM,\ gésier}$	0,0017	g/minute/FTU
$K_{M,\ PhyM,\ gésier}$	38,39	g
$V_{max,\ PHYV}$	0,0006	g/minute/FTU
$K_{M,\ PhyV}$	39,21	g
$V_{max,\ PhyE}$	0,047	g/minute
$K_{M,\ PhyE}$	0,136	g
Sécrétions endogènes		
$k_{P\ endogène}$	0,150	g/kg MSI
$k_{Ca\ endogène}$	0,719	g/kg MSI

Paramètres de solubilisation		
Solubilisation FP (Ca alimentaire)		
pente inflexion	0,669	
asymptote	1,061	
constante de solubilisation	5,006	
Solubilisation LP (Ca alimentaire)		
pente inflexion	0,062	
asymptote	2,339	
constante de solubilisation	-4,519	
$k_{dissolution}$	0,04	$minute^{-1}$
Solubilisation FP (pH)		
V_{max}	1,820	
valeur initiale	0,211	
taux de croissance		
K_M	18,28	
a	-22,55	
b		
Solubilisation LP (pH)		
V_{max}		
valeur initiale	1,820	
taux de croissance	0,211	
K_M		
a	17,92	
b	-24,18	
Solubilisation Ca MCP		
pente inflexion	3,134	
asymptote	1,020	
constante de solubilisation	10,130	
Solubilisation Ca DCP		
pente inflexion	0,445	
asymptote	2,164	
constante de solubilisation	1,430	
Solubilisation Ca TCP		
pente inflexion	6,696	
asymptote	1,008	
constante de solubilisation	7,191	
Solubilisation Ca végétal		
pente inflexion	17,813	
valeur minimale	0,566	
asymptote	1	
constante de solubilisation	4,406	
Solubilisation Ca animal		
pente inflexion	10,296	
asymptote	1	
constante de solubilisation	2,756	
Solubilisation P MCP		
pente inflexion	3,769	
asymptote	1,014	

constante de solubilisation	9,868	
Solubilisation P DCP		
pente inflexion	1,459	
asymptote	1,083	
constante de solubilisation	11,500	
Solubilisation P TCP		
pente inflexion	1,501	
asymptote	1,696	
constante de solubilisation	9,426	
Solubilisation P animal		
pente inflexion	10,296	
asymptote	1	
constante de solubilisation	2,756	
Solubilisation PP (ratio Ca:acide phytique)		
a	0,688	
b	-0,131	
Solubilisation PP (pH)		
pente inflexion	2,109	
asymptote	0,892	
constante de solubilisation	4,806	
Solubilisation PP Mg		
pente inflexion	8,598	
asymptote	0,942	
constante de solubilisation	7,387	
Paramètres d'insolubilisation		
$K_{d,\ Ca\ Pi}$	0,0139	
Insolubilisation PP (ratio Ca:acide phytique)		
pente inflexion	-0,036	
asymptote	0,968	
constante d'insolubilisation	0,019	
Insolubilisation PP (pH)		
pente inflexion	-2,313	
asymptote	0,931	
constante d'insolubilisation	4,573	
Paramètres cinétiques d'absorption		
$V_{max,\ Ca\ absorption,\ duodénum}$	0,002438	g/minute
$K_{M,\ Ca\ absorption,\ duodénum}$	0,037	g
$V_{max,\ Ca\ absorption,\ jéjunum}$	0,001481	g/minute
$K_{M,\ Ca\ absorption,\ jéjunum}$	0,243	g
$V_{max,\ Ca\ absorption,\ iléon}$	0,000090	g/minute
$K_{M,\ Ca\ absorption,\ iléon}$	0,040	g
$k_{Ca\ absorption\ coquille,\ duodénum}$	1,35	
$k_{Ca\ absorption\ coquille,\ jéjunum}$	2,56	
$k_{Ca\ absorption\ coquille,\ iléon}$	1,41	
$K_{M,\ P\ absorption,\ duodénum}$	0,00171	g
$K_{M,\ P\ absorption,\ jéjunum}$	0,01231	g
$K_{M,\ P\ absorption,\ iléon}$	0,01231	g
$Paramètre_{Vmax,\ P\ absorption,\ duodénum}$	0,000030	g/minute/cm

$Paramètre_{Vmax,\ P\ absorption,\ jéjunum}$	0,000107	g/minute/cm
$Paramètre_{Vmax,\ P\ absorption,\ iléon}$	0,000121	g/minute/cm
Paramètres de formation de la coquille		
$k_{dépôt\ coquille}$		
A	1,11	
B	0,308	
C	8,5	
temps de la calcification (τ)		minute
Autres paramètres		
MM Ca	40,078	g/mol
MM P	94,97	g/mol
MM acide phytique	660,04	g/mol

ANNEXE 2 – *Équations utilisées pour le modèle*

Equation	Description	Unité
Entrées du modèle		
t_{ON}	Début de la photopériode	minute
t_{OFF}	Fin de la photopériode	minute
t_{ponte}	Temps de ponte	minute
$type\ de\ jour = \begin{cases} 1\ si\ la\ poule\ produit\ un\ oeuf \\ 0\ si\ la\ poule\ ne\ produit\ pas\ d'oeuf \end{cases}$		
Iq	Ingéré quotidien	g
$\Phi = t_{OFF} - t_{ON}$	Durée de la photopériode	minute
$Ingestion\ (jour\ de\ production\ d'un\ oeuf) = \begin{cases} \frac{0{,}4\ \times Iq}{\left(\frac{\Phi}{2}\right)}\ si\ t_{ON} \le t\ \le t_{65} \\ \frac{0{,}6\ \times Iq}{\left(\frac{\Phi}{4}\right)} \times 0{,}15\ si\ t_{65} < t\ < t_{75} \\ \frac{0{,}6\ \times Iq}{\left(\frac{\Phi}{4}\right)} \times 0{,}85\ si\ t_{75} \le t\ \le t_{OFF} \end{cases}$	Ingestion d'aliment au cours de la journée, les jours où la poule produit un œuf	g/minute
$Ingestion\ (jour\ sans\ production\ d'oeuf) = \begin{cases} \frac{0{,}4\ \times Iq}{(\frac{\Phi}{2})} si\ t_{ON} \le t\ \le t_{65} \\ \frac{0{,}6\ \times Iq}{(\frac{\Phi}{2})}\ si\ t_{65} < t\ \le t_{OFF} \end{cases}$	Ingestion d'aliment au cours de la journée, les jours où la poule ne produit pas d'œuf	g/minute
$Ingestion\ (effet\ de\ la\ ponte) = \begin{cases} ingestion\ \times 0{,}82\ si\ t_{ponte} - 120\ \le t\ \le t_{ponte} - 60 \\ ingestion\ \times 0{,}58\ si\ t_{ponte} - 60\ < t\ \le t_{ponte} \\ ingestion \times 1{,}60\ si\ t_{ponte} < t\ \le t_{ponte} + 60 \end{cases}$	Expression de l'appétit calcique spécifique les jours où la poule produit un œuf	g/minute
MS	Quantité de matière sèche de l'aliment	g/kg
PNP	Quantité de P non-phytique de l'aliment	g/kg
PP	Quantité de P phytique de l'aliment	g/kg
P_{min}	Quantité de P minéral (phosphate) de l'aliment	g/kg

P_{ani}	Quantité de P animal de l'aliment	g/kg
$Ca_{carbonate}$	Quantité de Ca apporté par le carbonate de Ca de l'aliment	g/kg
Taille FP	Taille des larges particules de carbonate de Ca (≥ 0,8 mm)	mm
Taille LP	Taille des fines particules de carbonate de Ca (< 0,8 mm)	mm
Proportion LP	Proportion de larges particules de carbonate de Ca	%
$Proportion\ FP = 100 - proportion\ LP$	Proportion de fines particules de carbonate de Ca	%
ρ	Masse molaire du carbonate de Ca	g/mol
$\%Ca_{CaCO3}$	Taux de Ca du carbonate de Ca	%
$M_i = \frac{4}{3} \times \Pi \times \left(\frac{Taille\ LP}{100}\right) \times \rho$	Masse d'une large particule de $CaCO_3$	g
Ca_{min}	Quantité de Ca minéral (phosphate) de l'aliment	g/kg
Ca_{veg}	Quantité de Ca végétal de l'aliment	g/kg
Ca_{ani}	Quantité de Ca animal de l'aliment	g/kg
$MSI = MS \times ingestion$	Entrée de MS dans le jabot	g/minute
$ingestion\ PNP = \frac{PNP \times ingestion}{1000}$	Entrée de PNP dans le jabot	g/minute
$ingestion\ PP = \frac{PP \times ingestion}{1000}$	Entrée de PP dans le jabot	g/minute
$ingestion\ P_{min} = \frac{P_{min} \times ingestion}{1000}$	Entrée de P_{min} dans le jabot	g/minute

$ingestion\ P_{ani} = \frac{P_{ani} \times ingestion}{1000}$	Entrée de P_{ani} dans le jabot	g/minute
$ingestion\ Ca_{carbonate,FP} = \frac{Ca_{carbonate,FP} \times ingestion}{1000}$	Entrée de $Ca_{carbonate,\ FP}$ dans le jabot	g/minute
$N = \frac{\left[\frac{\left(\frac{Proportion\ LP\ \times Ca_{carbonate}}{Iq}\right)}{1000}\right]}{M_i}$	Nombre de larges particules ingérées	
$ingestion\ Ca_{carbonate,FP} = N\ \times M_i \times \%Ca_{CaCO3}$	Entrée de $Ca_{carbonate,\ CP}$ dans le jabot	g/minute
$ingestion\ Ca_{min} = \frac{Ca_{min} \times ingestion}{1000}$	Entrée de Ca_{min} dans le jabot	g/minute
$ingestion\ Ca_{veg} = \frac{Ca_{veg} \times ingestion}{1000}$	Entrée de Ca_{veg} dans le jabot	g/minute
$ingestion\ Ca_{ani} = \frac{Ca_{ani} \times ingestion}{1000}$	Entrée de Ca_{ani} dans le jabot	g/minute
$Pertes\ endogènes\ P = \frac{k_{P\ endogène} \times MSI}{\Phi}$	Sécrétions endogènes de P dans le duodénum	g/minute
$Pertes\ endogènes\ Ca = \frac{k_{Ca\ endogène} \times MSI}{\Phi}$	Sécrétions endogènes de Ca dans le duodénum	g/minute
Jabot		
FLUX DE PHOSPHORE		
$Solubilisation\ PP_{ins,jabot}\ (complexes\ PP/Mg) = \left(\frac{asymptote}{\left(1+ e^{inflexion \times \left(pH_{jabot} - constante\ solubilsiation\right)}\right)}\right) \times PP_{ins,jabot}$	Solubilisation du PP_{ins} complexé au magnésium (dans les matières premières) dans le jabot	g/minute
$Solubilisation\ PP_{ins,jabot}(complexe\ Ca/AP) = Solubilisation\ PP\ (pH) \times Solubilisation\ PP\ \left(ratio\ \frac{Ca}{AP}\right) \times PP_{ins,jabot}$	Solubilisation du PP_{ins} complexé au Ca dans le jabot	g/minute
$Solubilisation\ PP_{ins,jabot}\ (pH) = \left(\frac{asymptote}{\left(1+ e^{inflexion \times \left(pH_{jabot} - constante\ solubilsiation\right)}\right)}\right)$	Solubilisation du PP_{ins} complexé au Ca en fonction du pH	%
$Solubilisation\ PP_{ins,jabot}\ \left(ratio\ \frac{Ca}{AP}\right) = (a + b \times \log(ratio\ Ca/AP))$	Solubilisation du PP_{ins} complexé au Ca en fonction du ratio Ca/acide phytique	%

$Insolubilisation\ PP_{sol,jabot}\ (complexe\ Ca/AP) = Insolubilisation\ PP\ (pH) \times Insolubilisation\ PP\ \left(ratio\ \frac{Ca}{AP}\right) \times PP_{sol,jabot}$	Insolubilisation du PP_{sol} par formation de complexes Ca/acide phytique dans le jabot	g/minute
$Insolubilisation\ PP_{sol,jabot}\ (pH) = \left(\frac{asymptote}{\left(1+ e^{inflexion \times \left(pH_{jabot} - constante\ insolubilsiation\right)}\right)}\right)$	Insolubilisation du PP_{sol} par formation de complexes Ca/acide phytique en fonction du pH	%
$Insolubilisation\ PP_{sol,jabot}\ (ratio\ Ca/AP) = \left(\frac{asymptote}{\left(1+ e^{inflexion \times \left(ratio\ Ca/AP_{jabot} - constante\ insolubilsiation\right)}\right)}\right)$	Insolubilisation du PP_{sol} par formation de complexes Ca/acide phytique en fonction du ratio Ca/acide phytique	%
$Hydrolyse\ PP_{sol,jabot} = \frac{\left(V_{max,PhyMic} \times PP_{sol,jabot} \times k_{eff,PhyMic}\right)}{\left(K_{M,PhyMic} + PP_{sol,jabot}\right)} + \frac{\left(V_{max,PhyVeg} \times PP_{sol,jabot} \times k_{eff,PhyVeg}\right)}{\left(K_{M,PhyVeg} + PP_{sol,jabot}\right)}$	Hydrolyse du PP_{sol} par les phytases microbienne et végétale dans le jabot	g/minute
$Solubilisation\ P_{min,ins,jabot} = \left(\frac{asymptote}{\left(1+ e^{inflexion \times \left(pH_{jabot} - constante\ solubilsiation\right)}\right)}\right) \times P_{min,ins,jabot}$	Solubilisation du $P_{min,ins}$ dans le jabot	g/minute
$Insolubilisation\ P_{min,sol,jabot} = \left(\frac{Ca_{sol,jabot}{}^{3} \times P_{sol,jabot}{}^{2}}{K_d}\right) \times P_{min,sol,jabot}$	Insolubilisation du $P_{min,sol}$ par formation de complexes avec le Ca dans le jabot	g/minute
$Solubilisation\ P_{ani,ins,jabot} = \left(\frac{asymptote}{\left(1+ e^{inflexion \times \left(pH_{jabot} - constante\ solubilsiation\right)}\right)}\right) \times P_{ani,ins,jabot}$	Solubilisation du $P_{ani,ins}$ dans le jabot	g/minute
$Insolubilisation\ P_{ani,sol,jabot} = \left(\frac{Ca_{sol,jabot}{}^{3} \times P_{sol,jabot}{}^{2}}{K_d}\right) \times P_{ani,sol,jabot}$	Insolubilisation du $P_{ani,sol}$ par formation de complexes avec le Ca dans le jabot	g/minute
$Flux\ jabot, gésier\ PNP_{sol} = PNP_{sol,jabot} \times k_{jabot\ MS}$	Sortie du PNP_{sol} du jabot vers le gésier	g/minute
$Flux\ jabot, gésier\ PP_{sol} = PP_{sol,jabot} \times k_{jabot\ MS}$	Sortie du PP_{sol} du jabot vers le gésier	g/minute

$Flux\ jabot, gésier\ PP_{ins} = PP_{ins,jabot} \times k_{jabot\ MS}$	Sortie du PP_{ins} du jabot vers le gésier	g/minute
$Flux\ jabot, gésier\ P_{min,sol,jabot} = P_{min,sol,jabot} \times k_{jabot\ MS}$	Sortie du $P_{min,sol}$ du jabot vers le gésier	g/minute
$Flux\ jabot, gésier\ P_{min,ins,jabot} = P_{min,ins,jabot} \times k_{jabot\ MS}$	Sortie du $P_{min,ins}$ du jabot vers le gésier	g/minute
$Flux\ jabot, gésier\ P_{ani,sol,jabot} = P_{ani,sol,jabot} \times k_{jabot\ MS}$	Sortie du $P_{ani,sol}$ du jabot vers le gésier	g/minute
$Flux\ jabot, gésier\ P_{ani,ins,jabot} = P_{ani,ins,jabot} \times k_{jabot\ MS}$	Sortie du $P_{ani,ins}$ du jabot vers le gésier	g/minute
FLUX DE CALCIUM		
$Solubilisation\ Ca_{carbonate,FP,ins,jabot} = Solubilisation\ Ca_{carbonate,FP,ins,jabot}(Ca\ alimentaire) \times Solubilisation\ Ca_{carbonate,FP,ins,jabot}(pH) \times Ca_{carbonate,FP,ins,jabot}$	Solubilisation du $Ca_{carbonate,FP,ins}$ dans le jabot	g/minute
$Solubilisation\ Ca_{carbonate,FP,ins,jabot}(pH) = \frac{V_{max} \times \frac{1}{k_{jabot\ MS}}}{K_M + \frac{1}{k_{jabot\ MS}}}$	Solubilisation du $Ca_{carbonate,FP,ins}$ en fonction du pH	%
$Solubilisation\ Ca_{carbonate,FP,ins,jabot}(Ca\ alimentaire) = \left(\frac{asymptote}{\left(1 + e^{inflexion \times (Ca_{aliment} - constante\ solubilsiation)}\right)}\right)$	Solubilisation du $Ca_{carbonate,FP,ins}$ en fonction du Ca de l'aliment	%
$Solubilisation\ Ca_{carbonate,LP,ins,jabot} = Solubilisation\ Ca_{carbonate,LP,ins,jabot}(Ca\ alimentaire) \times Solubilisation\ Ca_{carbonate,LP,ins,jabot}(pH) \times k_{dissolution} \times Ca_{carbonate,LP,ins,jabot}$	Solubilisation du $Ca_{carbonate,LP,ins}$ dans le jabot	g/minute
$Solubilisation\ Ca_{carbonate,LP,ins,jabot}(pH) = \frac{V_{max} \times \frac{1}{k_{jabot\ MS}}}{K_M + \frac{1}{k_{jabot\ MS}}}$	Solubilisation du $Ca_{carbonate,LP,ins}$ en fonction du pH	%
$Solubilisation\ Ca_{carbonate,LP,ins,jabot}(Ca\ alimentaire) = \left(\frac{asymptote}{\left(1 + e^{inflexion \times (Ca_{aliment} - constante\ solubilsiation)}\right)}\right)$	Solubilisation du $Ca_{carbonate,LP,ins}$ en fonction du Ca de l'aliment	%
$Insolubilisation\ Ca_{carbonate,FP,jabot} = \left(Insolubilisation\ PP_{sol,jabot} \times 0{,}772 \times 3\right) + \left(\frac{Ca_{sol,jabot}^{3} \times P_{sol,jabot}^{2}}{K_d}\right) \times Ca_{carbonate,FP,jabot}$	Insolubilisation du $Ca_{carbonate,FP,sol}$ dans le jabot par formation de	g/minute

	complexes avec l'acide phytique et les PO_4	
$Solubilisation\ Ca_{min,ins,jabot} = \left(\frac{asymptote}{\left(1+ e^{inflexion \times \left(pH_{jabot} - constante\ solubilsiation\right)}\right)}\right) \times Ca_{min,ins,jabot}$	Solubilisation du $Ca_{min,ins}$ dans le jabot	g/minute
$Insolubilisation\ Ca_{min,sol,jabot} = \left(Insolubilisation\ PP_{sol,jabot} \times 0{,}772 \times 3\right) + \left(\frac{Ca_{sol,jabot}^{3} \times P_{sol,jabot}^{2}}{K_d}\right) \times Ca_{min,sol,jabot}$	Insolubilisation du $Ca_{min,sol}$ dans le jabot par formation de complexes avec l'acide phytique et les PO_4	g/minute
$Solubilisation\ Ca_{veg,ins,jabot} = \left[valeure\ miniale - \left(\frac{asymptote - valeur\ minimale}{\left(1+ e^{inflexion \times \left(pH_{jabot} - constante\ solubilsiation\right)}\right)}\right)\right] \times Ca_{veg,ins,jabot}$	Solubilisation du $Ca_{veg,ins}$ dans le jabot	g/minute
$Insolubilisation\ Ca_{veg,sol,jabot} = \left(Insolubilisation\ PP_{sol,jabot} \times 0{,}772 \times 3\ \right) + \left(\frac{Ca_{sol,jabot}^{3} \times P_{sol,jabot}^{2}}{K_d}\right) \times Ca_{veg,sol,jabot}$	Insolubilisation du $Ca_{veg,sol}$ dans le jabot par formation de complexes avec l'acide phytique et les PO_4	g/minute
$Solubilisation\ Ca_{ani,ins,jabot} = \left(\frac{asymptote}{\left(1+ e^{inflexion \times \left(pH_{jabot} - constante\ solubilsiation\right)}\right)}\right) \times Ca_{ani,ins,jabot}$	Solubilisation du $Ca_{ani,ins}$ dans le jabot	g/minute
$Insolubilisation\ Ca_{ani,sol,jabot} = \left(Insolubilisation\ PP_{sol,jabot} \times 0{,}772 \times 3\right) + \left(\frac{Ca_{sol,jabot}^{3} \times P_{sol,jabot}^{2}}{K_d}\right) \times Ca_{ani,sol,jabot}$	Insolubilisation du $Ca_{ani,sol}$ dans le jabot par formation de complexes avec l'acide phytique et les PO_4	g/minute
$Flux\ jabot, gésier\ Ca_{carbonate,FP,sol} = Ca_{carbonate,FP,sol} \times k_{jabot\ MS}$	Sortie du $Ca_{carbonate,FP,sol}$ du jabot vers le gésier	g/minute
$Flux\ jabot, gésier\ Ca_{carbonate,FP,ins} = Ca_{carbonate,FP,ins} \times k_{jabot\ MS}$	Sortie du $Ca_{carbonate,FP,ins}$ du jabot vers le gésier	g/minute
$Flux\ jabot, gésier\ Ca_{carbonate,LP,ins} = Ca_{carbonate,LP,ins} \times k_{jabot\ LP}$	Sortie du $Ca_{carbonate,LP,ins}$ du jabot vers le gésier	g/minute
$Flux\ jabot, gésier\ Ca_{min,sol,jabot} = Ca_{min,sol,jabot} \times k_{jabot\ MS}$	Sortie du $Ca_{min,sol}$ du jabot vers le gésier	g/minute

$Flux\ jabot, gésier\ \ Ca_{min,ins,jabot} = Ca_{min,ins,jabot} \times k_{jabot\ MS}$	Sortie du $Ca_{min,ins}$ du jabot vers le gésier	
$Flux\ jabot, gésier\ Ca_{veg,sol,jabot} = \ Ca_{veg,sol,jabot} \times k_{jabot\ MS}$	Sortie du $Ca_{veg,sol}$ du jabot vers le gésier	g/minute
$Flux\ jabot, gésier\ \ Ca_{veg,ins,jabot} = Ca_{veg,ins,jabot} \times k_{jabot\ MS}$	Sortie du $Ca_{veg,ins}$ du jabot vers le gésier	g/minute
$Flux\ jabot, gésier\ Ca_{ani,sol,jabot} = \ Ca_{ani,sol,jabot} \times k_{jabot\ MS}$	Sortie du $Ca_{ani,sol}$ du jabot vers le gésier	
$Flux\ jabot, gésier\ \ Ca_{ani,ins,jabot} = Ca_{ani,ins,jabot} \times k_{jabot\ MS}$	Sortie du $Ca_{ani,ins}$ du jabot vers le gésier	g/minute
Gésier		
FLUX DE PHOSPHORE		
$Solubilisation\ PP_{ins,gésier}\ (complexes\ PP/Mg) = \left(\frac{asymptote}{\left(1+ e^{inflexion \times \left(pH_{jabot} - constante\ solubilsiation\right)}\right)}\right) \times PP_{ins,gésier}$	Solubilisation du PP_{ins} complexé au magnésium (dans les matières premières) dans le gésier	g/minute
$Solubilisation\ PP_{ins,gésier}(complexe\ Ca/AP) = Solubilisation\ PP_{ins,gésier}\ (pH) \times Solubilisation\ PP_{ins,gésier}\ \left(ratio\ \frac{Ca}{AP}\right) \times \ PP_{ins,gésier}$	Solubilisation du PP_{ins} complexé au Ca dans le gésier	g/minute
$Solubilisation\ PP_{ins,gésier}\ (pH) = \left(\frac{asymptote}{\left(1+ e^{inflexion \times \left(pH_{gésier} - constante\ solubilsiation\right)}\right)}\right)$	Solubilisation du PP_{ins} complexé au Ca en fonction du pH	%
$Solubilisation\ PP_{ins,gésier}\ (ratio\ Ca/AP) = (a + b \times \log(ratio\ Ca/AP))$	Solubilisation du PP_{ins} complexé au Ca en fonction du ration Ca/acide phytique	%
$Insolubilisation\ PP_{sol,gésier}\ (complexe\ Ca/AP) = Insolubilisation\ PP\ (pH) \times Insolubilisation\ PP\ \left(ratio\ \frac{Ca}{AP}\right) \times PP_{sol,gésier}$	Insolubilisation du PP_{sol} par formation de complexes Ca/acide phytique dans le gésier	g/minute
$Insolubilisation\ PP_{sol,gésier}\ (pH) = \left(\frac{asymptote}{\left(1+ e^{inflexion \times \left(pH_{gésier} - constante\ insolubilsiation\right)}\right)}\right)$	Insolubilisation du PP_{sol} par formation de complexes Ca/acide phytique en fonction du pH	%

$Insolubilisation\ PP_{sol,gésier}\ (ratio\ Ca/AP) = \left(\frac{asymptote}{\left(1+ e^{inflexion \times \left(ratio\ Ca/AP_{gésier} - constante\ insolubilsiation\right)}\right)}\right)$	Insolubilisation du PP_{sol} par formation de complexes Ca/acide phytique en fonction du ratio Ca/acide phytique	%
$Hydrolyse\ PP_{sol,gésier} = \frac{\left(V_{max,PhyMic} \times PP_{sol,gésier} \times k_{eff,PhyMic}\right)}{\left(K_{M,PhyMic} + PP_{sol,gésier}\right)} + \frac{\left(V_{max,PhyVeg} \times PP_{sol,gésier} \times k_{eff,PhyVeg}\right)}{\left(K_{M,PhyVeg} + PP_{sol,gésier}\right)}$	Hydrolyse du PP_{sol} par les phytases microbienne et végétale dans le gésier	g/minute
$Solubilisation\ P_{min,ins,gésier} = \left(\frac{asymptote}{\left(1+ e^{inflexion \times \left(pH_{jabot} - constante\ solubilsiation\right)}\right)}\right) \times P_{min,ins,gésier}$	Solubilisation du $P_{min,ins}$ dans le gésier	g/minute
$Insolubilisation\ P_{min,sol,gésier} = \left(\frac{Ca_{sol,gésier}{}^{3} \times P_{sol,gésier}{}^{2}}{K_d}\right) \times P_{min,sol,gésier}$	Insolubilisation du $P_{min,sol}$ par formation de complexes avec le Ca dans le gésier	g/minute
$Solubilisation\ P_{ani,ins,gésier} = \left(\frac{asymptote}{\left(1+ e^{inflexion \times \left(pH_{jabot} - constante\ solubilsiation\right)}\right)}\right) \times P_{ani,ins,gésier}$	Solubilisation du $P_{ani,ins}$ dans le gésier	g/minute
$Insolubilisation\ P_{ani,sol,gésier} = \left(\frac{Ca_{\ sol,gésier}{}^{3} \times P_{sol,gésier}{}^{2}}{K_d}\right) \times P_{ani,sol,gésier}$	Insolubilisation du $P_{ani,sol}$ par formation de complexes avec le Ca dans le gésier	g/minute
$Flux\ gésier, duodénum\ PNP_{sol} = PNP_{sol,gésier} \times k_{gésierMS}$	Sortie du PNP_{sol} du gésier vers le duodénum	g/minute
$Flux\ gésier, duodénum\ PP_{sol,gésier} = PP_{sol,gésier} \times k_{gésierMS}$	Sortie du PP_{sol} du gésier vers le duodénum	g/minute
$Flux\ gésier, duodénum\ PP_{ins,gésier} = PP_{ins,gésier} \times k_{gésierMS}$	Sortie du PP_{ins} du gésier vers le duodénum	g/minute
$Flux\ gésier, duodénum\ P_{min,sol,gésier} = P_{min,sol,gésier} \times k_{gésierMS}$	Sortie du $P_{min,sol}$ du gésier vers le duodénum	g/minute
$Flux\ gésier, duodénum\ P_{min,ins,gésier} = P_{min,ins,gésier} \times k_{gésierMS}$	Sortie du $P_{min,ins}$ du gésier vers le duodénum	g/minute
$Flux\ gésier, duodénum\ P_{ani,sol,gésier} = P_{ani,sol,gésier} \times k_{gésierMS}$	Sortie du $P_{ani,sol}$ du gésier vers le duodénum	g/minute

$Flux\ gésier, duodénum\ P_{ani,ins,gésier} = P_{ani,ins,gésier} \times k_{gésierMS}$	Sortie du $P_{ani,ins}$ du gésier vers le duodénum	g/minute
FLUX DE CALCIUM		
$Solubilisation\ Ca_{carbonate,FP,ins,gésier} = Solubilisation\ Ca_{carbonate,FP,ins,gésier}(Ca\ alimentaire) \times Solubilisation\ Ca_{carbonate,FP,ins,gésier}(pH) \times Ca_{carbonate,FP,ins,gésier}$	Solubilisation du $Ca_{carbonate,FP,ins}$ dans le gésier	g/minute
$Solubilisation\ Ca_{carbonate,FP,ins,gésier}(pH) = \frac{V_{max} \times \frac{1}{k_{gésierMS}}}{K_M + \frac{1}{k_{gésierMS}}}$	Solubilisation du $Ca_{carbonate,FP,ins}$ en fonction du pH	%
$Solubilisation\ Ca_{carbonate,FP,ins,gésier}(Ca\ alimentaire) = \left(\frac{asymptote}{\left(1+e^{inflexion \times (Ca_{aliment} - constante\ solubilsiation)}\right)}\right)$	Solubilisation du $Ca_{carbonate,FP,ins}$ en fonction du Ca de l'aliment	%
$Solubilisation\ Ca_{carbonate,LP,ins,gésier} = Solubilisation\ Ca_{carbonate,LP,ins,gésier}(Ca\ alimentaire) \times Solubilisation\ Ca_{carbonate,LP,ins,gésier}(pH) \times k_{dissolution} \times Ca_{carbonate,LP,ins,gésier}$	Solubilisation du $Ca_{carbonate,LP,ins}$ dans le gésier	g/minute
$Solubilisation\ Ca_{carbonate,LP,ins,gésier}(pH) = \frac{V_{max} \times \frac{1}{k_{gésierMS}}}{K_M + \frac{1}{k_{gésierMS}}}$	Solubilisation du $Ca_{carbonate,LP,ins}$ en fonction du pH	%
$Solubilisation\ Ca_{carbonate,LP,ins,jabogésiert}(Ca\ alimentaire) = \left(\frac{asymptote}{\left(1+e^{inflexion \times (Ca_{aliment} - constante\ solubilsiation)}\right)}\right)$	Solubilisation du $Ca_{carbonate,LP,ins}$ en fonction du Ca de l'aliment	%
$Insolubilisation\ Ca_{carbonate,FP,gésier} = \left(Insolubilisation\ PP_{sol,gésier} \times 0{,}772 \times 3\right) + \left(\frac{Ca_{sol,gésier}{}^3 \times P_{sol,jabot}{}^2}{K_d}\right) \times Ca_{carbonate,FP,gésier}$	Insolubilisation du $Ca_{carbonate,FP,sol}$ dans le gésier par formation de complexes avec l'acide phytique et les PO_4	g/minute
$Solubilisation\ Ca_{min,ins,gésier} = \left(\frac{asymptote}{\left(1+e^{inflexion \times \left(pH_{gésier} - constante\ solubilsiation\right)}\right)}\right) \times Ca_{min,ins,gésier}$	Solubilisation du $Ca_{min,ins}$ dans le gésier	g/minute
$Insolubilisation\ Ca_{min,sol,gésier} = \left(Insolubilisation\ PP_{sol,gésier} \times 0{,}772 \times 3\right) + \left(\frac{Ca_{sol,gésier}{}^3 \times P_{sol,jabot}{}^2}{K_d}\right) \times Ca_{min,sol,gésier}$	Insolubilisation du $Ca_{min,sol}$ dans le gésier par formation de complexes	g/minute

	avec l'acide phytique et les PO_4	
$Solubilisation\ Ca_{veg,ins,gésier} = \left[valeure\ miniale - \left(\frac{asymptote - valeur\ minimale}{\left(1+ e^{inflexion \times \left(pH_{gésier} - constante\ solubilsiation\right)}\right)}\right)\right] \times Ca_{veg,ins,gésier}$	Solubilisation du $Ca_{veg,ins}$ dans le gésier	g/minute
$Insolubilisation\ Ca_{veg,sol,gésier} = \left(nsolubilisation\ PP_{sol,gésier} \times 0{,}772 \times 3\right) + \left(\frac{Ca_{sol,gésier}{}^{3} \times P_{sol,jabot}{}^{2}}{K_d}\right) \times Ca_{veg,sol,gésier}$	Insolubilisation du $Ca_{veg,sol}$ dans le gésier par formation de complexes avec l'acide phytique et les PO_4	g/minute
$Solubilisation\ Ca_{ani,ins,gésier} = \left(\frac{asymptote}{\left(1+ e^{inflexion \times \left(pH_{gésier} - constante\ solubilsiation\right)}\right)}\right) \times Ca_{ani,ins,gésier}$	Solubilisation du $Ca_{ani,ins}$ dans le gésier	g/minute
$Insolubilisation\ Ca_{ani,sol,gésier} = \left(Insolubilisation\ PP_{sol,gésier} \times 0{,}772 \times 3\right) + \left(\frac{Ca_{sol,gésier}{}^{3} \times P_{sol,jabot}{}^{2}}{K_d}\right) \times Ca_{ani,sol,gésier}$	Insolubilisation du $Ca_{ani,sol}$ dans le gésier par formation de complexes avec l'acide phytique et les PO_4	g/minute
$Flux\ gésier, gésier\ Ca_{carbonate,FP,sol} = Ca_{carbonate,FP,sol} \times k_{jabot\ MS}$	Sortie du $Ca_{carbonate,FP,sol}$ du gésier vers le duodénum	g/minute
$Flux\ gésier, gésier\ Ca_{carbonate,FP,ins} = Ca_{carbonate,FP,ins} \times k_{jabot\ MS}$	Sortie du $Ca_{carbonate,FP,ins}$ du gésier vers le duodénum	g/minute
$Flux\ gésier, gésier\ Ca_{carbonate,LP,ins} = Ca_{carbonate,LP,ins} \times k_{jabot\ LP}$	Sortie du $Ca_{carbonate,LP,ins}$ du gésier vers le duodénum	g/minute
$Flux\ gésier, duodénum\ Ca_{min,sol,gésier} = Ca_{min,sol,gésier} \times k_{gésierMS}$	Sortie du $Ca_{min,sol}$ du gésier vers le duodénum	g/minute
$Flux\ gésier, duodénum\ Ca_{min,ins,gésier} = Ca_{min,ins,gésier} \times k_{gésierMS}$	Sortie du $Ca_{min,ins}$ du gésier vers le duodénum	g/minute
$Flux\ gésier, duodénum\ Ca_{veg,sol,gésier} = Ca_{veg,sol,gésier} \times k_{gésierMS}$	Sortie du $Ca_{veg,sol}$ du gésier vers le duodénum	g/minute
$Flux\ gésier, duodénum\ Ca_{veg,ins,gésier} = Ca_{veg,ins,gésier} \times k_{gésierMS}$	Sortie du $Ca_{veg,ins}$ du gésier vers le duodénum	g/minute

$Flux\ gésier, duodénum\ Ca_{ani,sol,gésier} = Ca_{ani,sol,gésier} \times k_{gésierMS}$	Sortie du $Ca_{ani,sol}$ du gésier vers le duodénum	g/minute
$Flux\ gésier, duodénum\ Ca_{ani,ins,gésier} = Ca_{ani,ins,gésier} \times k_{gésierMS}$	Sortie du $Ca_{ani,ins}$ du gésier vers le duodénum	g/minute
Duodénum		
FLUX DE PHOSPHORE		
$Insolubilisation\ PP_{sol,duodénum} = Insolubilisation\ PP\ (pH) \times Insolubilisation\ PP\ \left(ratio\ \frac{Ca}{AP}\right) \times PP_{sol,duodénum}$	Insolubilisation du PP_{sol} par formation de complexes Ca/acide phytique dans le duodénum	g/minute
$Insolubilisation\ PP_{sol,duodénum}\ (pH) = \left(\frac{asymptote}{\left(1+ e^{inflexion \times (pH_{duodénum} - constante\ insolubilsiation)}\right)}\right)$	Insolubilisation du PP_{sol} par formation de complexes Ca/acide phytique en fonction du pH	%
$Insolubilisation\ PP_{sol,duodénum}\ (ratio\ Ca/AP) = \left(\frac{asymptote}{\left(1+ e^{inflexion \times (ratio\ Ca/AP_{duodénum} - constante\ insolubilsiation)}\right)}\right)$	Insolubilisation du PP_{sol} par formation de complexes Ca/acide phytique en fonction du ratio Ca/acide phytique	%
$Insolubilisation\ P_{sol,duodénum} = \left(\frac{Ca_{sol,duodénum}{}^{3} \times P_{sol,duodénum}{}^{2}}{K_d}\right) \times P_{sol,duodénum}$	Insolubilisation du P_{sol} par formation de complexes avec le Ca dans le duodénum	g/minute
$Hydrolyse\ PP_{sol,dudoénum} = \frac{(V_{max,PhyEnd} \times PP_{sol,duodénum} \times k_{eff,PhyEnd})}{(K_{M,PhyEnd} + PP_{sol,duodénum})}$	Hydrolyse du PP_{sol} par la phytase intestinale dans le duodénum	g/minute
$Absorption\ P_{sol,duodénum} = \frac{V_{max,duodénum} \times P_{sol,duodénum}}{K_{M,duodénum} + P_{sol,duodénum}}$	Absorption du P_{sol} dans le duodénum	g/minute
$Flux\ duodénum, jéjunum\ P_{sol} = P_{sol,duodénum} \times k_{duodénum\ MS}$	Sortie du P_{sol} du duodénum vers le jéjunum	g/minute
$Flux\ duodénum, jéjunum\ P_{ins} = P_{ins,duodénum} \times k_{duodénum\ MS}$	Sortie du P_{ins} du duodénum vers le jéjunum	g/minute
$Flux\ duodénum, jéjunum\ PP_{sol} = PP_{sol,duodénum} \times k_{duodénum\ MS}$	Sortie du PP_{sol} du duodénum vers le jéjunum	g/minute

$Flux\ duodénum, jéjunum\ PP_{ins} = PP_{ins,duodénum} \times k_{duodénum\ MS}$	Sortie du PP_{ins} du duodénum vers le jéjunum	g/minute
FLUX DE CALCIUM		
$Insolubilisation\ Ca_{sol,duodénum} = \left(Insolubilisation\ PP_{sol,duodénum} \times 0{,}772 \times 3\right) + \left(\frac{Ca_{sol,duodénum}{}^{3} \times P_{sol,duodénum}{}^{2}}{K_d}\right) \times Ca_{sol,duodénum}$	Insolubilisation du Ca_{sol} dans le duodénum par formation de complexes avec l'acide phytique et les PO_4	g/minute
$Absorption\ Ca_{sol,duodénum} = \frac{V_{max,duodénum} \times Ca_{sol,duodénum}}{K_{M,duodénum} + Ca_{sol,duodénum}} \times k_{coquille,duodénum}$	Absorption du Ca_{sol} dans le duodénum	g/minute
$Flux\ duodénum, jéjunum\ Ca_{sol} = Ca_{sol,duodénum} \times k_{duodénum\ MS}$	Sortie du Ca_{sol} du duodénum vers le jéjunum	g/minute
$Flux\ duodénum, jéjunum\ Ca_{ins} = Ca_{ins,duodénum} \times k_{duodénum\ MS}$	Sortie du Ca_{ins} du duodénum vers le jéjunum	g/minute
Jéjunum		
FLUX DE PHOSPHORE		
$Insolubilisation\ PP_{sol,jéjunum} = Insolubilisation\ PP\ (pH) \times Insolubilisation\ PP\ \left(ratio\ \frac{Ca}{AP}\right) \times PP_{sol,jéjunum}$	Insolubilisation du PP_{sol} par formation de complexes Ca/acide phytique dans le jéjunum	g/minute
$Insolubilisation\ PP_{sol,jéjunum}\ (pH) = \left(\frac{asymptote}{\left(1+ e^{inflexion \times \left(pH_{jéjunum} - constante\ insolubilsiation\right)}\right)}\right)$	Insolubilisation du PP_{sol} par formation de complexes Ca/acide phytique en fonction du pH	%
$Insolubilisation\ PP_{sol,jéjunum}\ (ratio\ Ca/AP) = \left(\frac{asymptote}{\left(1+ e^{inflexion \times \left(ratio\ Ca/AP_{jéjunum} - constante\ insolubilsiation\right)}\right)}\right)$	Insolubilisation du PP_{sol} par formation de complexes Ca/acide phytique en fonction du ratio Ca/acide phytique	%
$Insolubilisation\ P_{sol,jéjunum} = \left(\frac{Ca_{sol,jéjunum}{}^{3} \times P_{sol,jéjunum}{}^{2}}{K_d}\right) \times P_{sol,jéjunum}$	Insolubilisation du P_{sol} par formation de complexes avec le Ca dans le jéjunum	g/minute

$Hydrolyse\ PP_{sol,jéjunum} = \frac{(V_{max,PhyEnd} \times PP_{sol,jéjunum} \times k_{eff,PhyEnd})}{(K_{M,PhyEnd} + PP_{sol,jéjunum})}$	Hydrolyse du PP_{sol} par la phytase intestinale dans le jéjunum	g/minute
$Absorption\ P_{sol,jéjunum} = \frac{V_{max,jéjunum} \times P_{sol,jéjunum}}{K_{M,jéjunum} + P_{sol,jéjunum}}$	Absorption du P_{sol} dans le jéjunum	g/minute
$Flux\ jéjunum, iléon\ P_{sol} = P_{sol,jéjunum} \times k_{jéjunum\ MS}$	Sortie du P_{sol} du jéjunum vers l'iléon	g/minute
$Flux\ jéjunum, iléon\ P_{ins} = P_{ins,jéjunum} \times k_{jéjunum\ MS}$	Sortie du P_{ins} du jéjunum vers l'iléon	g/minute
$Flux\ jéjunum, iléon\ PP_{sol} = PP_{sol,jéjunum} \times k_{jéjunum\ MS}$	Sortie du PP_{sol} du jéjunum vers l'iléon	g/minute
$Flux\ jéjunum, iléon\ PP_{ins} = PP_{ins,jéjunum} \times k_{jéjunum\ MS}$	Sortie du PP_{ins} du jéjunum vers l'iléon	g/minute
FLUX DE CALCIUM		
$Insolubilisation\ Ca_{sol,jéjunum} = \left(Insolubilisation\ PP_{sol,jéjunum} \times 0{,}772 \times 3\right) + \left(\frac{Ca_{sol,jéjunum}{}^{3} \times P_{sol,jéjunum}{}^{2}}{K_d}\right) \times Ca_{sol,jéjunum}$	Insolubilisation du Ca_{sol} dans le jéjunum par formation de complexes avec l'acide phytique et les PO_4	g/minute
$Absorption\ Ca_{sol,jéjunum} = \frac{V_{max,jéjunum} \times Ca_{sol,jéjunum}}{K_{M,jéjunum} + Ca_{sol,jéjunum}} \times k_{coquille,jéjunum}$	Absorption du Ca_{sol} dans le jéjunum	g/minute
$Flux\ jéjunum, iélon\ Ca_{sol} = Ca_{sol,jéjunum} \times k_{jéjunum\ MS}$	Sortie du Ca_{sol} du jéjunum vers l'iléon	g/minute
$Flux\ jéjunum, iélon\ Ca_{ins} = Ca_{ins,jéjunum} \times k_{jéjunum\ MS}$	Sortie du Ca_{ins} du jéjunum vers l'iléon	g/minute
Iléon		
FLUX DE PHOSPHORE		
$Insolubilisation\ PP_{sol,iléon} = Insolubilisation\ PP\ (pH) \times Insolubilisation\ PP\ \left(ratio\ \frac{Ca}{AP}\right) \times PP_{sol,iléon}$	Insolubilisation du PP_{sol} par formation de complexes Ca/acide phytique dans l'iléon	g/minute
$Insolubilisation\ PP_{sol,iléon}\ (pH) = \left(\frac{asymptote}{\left(1 + e^{inflexion \times (pH_{iléon} - constante\ insolubilsiation)}\right)}\right)$	Insolubilisation du PP_{sol} par formation de complexes Ca/acide phytique en fonction du pH	%

$Insolubilisation\ PP_{sol,iléon}\ (ratio\ Ca/AP) = \left(\frac{asymptote}{\left(1+ e^{inflexion\ \times (ratio\ Ca/AP_{iléon} - constante\ insolubilsiation)}\right)}\right)$	Insolubilisation du PP_{sol} par formation de complexes Ca/acide phytique en fonction du ratio Ca/aide phytique	%
$Insolubilisation\ P_{sol,iléon} = \left(\frac{Ca_{sol,iléon}{}^{3} \times P_{sol,iléon}{}^{2}}{K_d}\right) \times\ P_{sol,iléon}$	Insolubilisation du P_{sol} par formation de complexes avec le Ca dans l'iléon	g/minute
$Hydrolyse\ PP_{sol,iléon} = \frac{(V_{max,PhyEnd} \times PP_{sol,iléon} \times k_{eff,PhyEnd})}{(K_{M,PhyEnd} + PP_{sol,iléon})}$	Hydrolyse du PP_{sol} par la phytase intestinale dans l'iléon	g/minute
$Absorption\ P_{sol,jéjunum} = \frac{V_{max,iléon} \times P_{sol,iléon}}{K_{M,iléon} + P_{sol,iléon}}$	Absorption du P_{sol} dans l'iléon	g/minute
$Flux\ iléon, excrétion\ P_{sol} = P_{sol,iléon} \times k_{iléon\ MS}$	Sortie du P_{sol} de l'iléon vers l'excrétion	g/minute
$Flux\ iléon, excrétion\ P_{ins} = P_{ins,iléon} \times k_{iléon\ MS}$	Sortie du P_{ins} de l'iléon vers l'excrétion	g/minute
$Flux\ iléon, excrétion\ PP_{sol} = PP_{sol,iléon} \times k_{iléon\ MS}$	Sortie du PP_{sol} de l'iléon vers l'excrétion	g/minute
$Flux\ iléon, excrétion\ PP_{ins} = PP_{ins,iléon} \times k_{iléon\ MS}$	Sortie du PP_{ins} de l'iléon vers l'excrétion	g/minute
FLUX DE CALCIUM		
$Insolubilisation\ Ca_{sol,iléon} = \left(Insolubilisation\ PP_{sol,iléon} \times 0{,}772 \times 3\right) + \left(\frac{Ca_{sol,iléon}{}^{3} \times P_{sol,iléon}{}^{2}}{K_d}\right) \times\ Ca_{sol,iléon}$	Insolubilisation du Ca_{sol} dans l'iléon par formation de complexes avec l'acide phytique et les PO_4	g/minute
$Absorption\ Ca_{sol,iléon} = \frac{V_{max,iléon} \times Ca_{sol,iléon}}{K_{M,iléon} + Ca_{sol,iléon}} \times k_{coquille,iléon}$	Absorption du Ca_{sol} dans l'iléon	g/minute
$Flux\ iléon, excrétion\ Ca_{sol} = Ca_{sol,iléon} \times k_{iléon\ MS}$	Sortie du Ca_{sol} de l'iléon vers l'excrétion	g/minute
$Flux\ iléon, excrétion\ Ca_{ins} = Ca_{ins,iléon} \times k_{iléon\ MS}$	Sortie du Ca_{ins} de l'iléon vers l'excrétion	g/minute
Flux de calcification de la coquille		
$Déposition\ de\ coquille = \frac{A \times B \times e^{(-B \times (\tau - C))}}{\left(1+ e^{(-B \times (\tau - C))}\right)^2}$	Cinétique de déposition de la coquille (Johnston et Gous, 2007)	g/minute

DICUSSION GÉNÉRALE

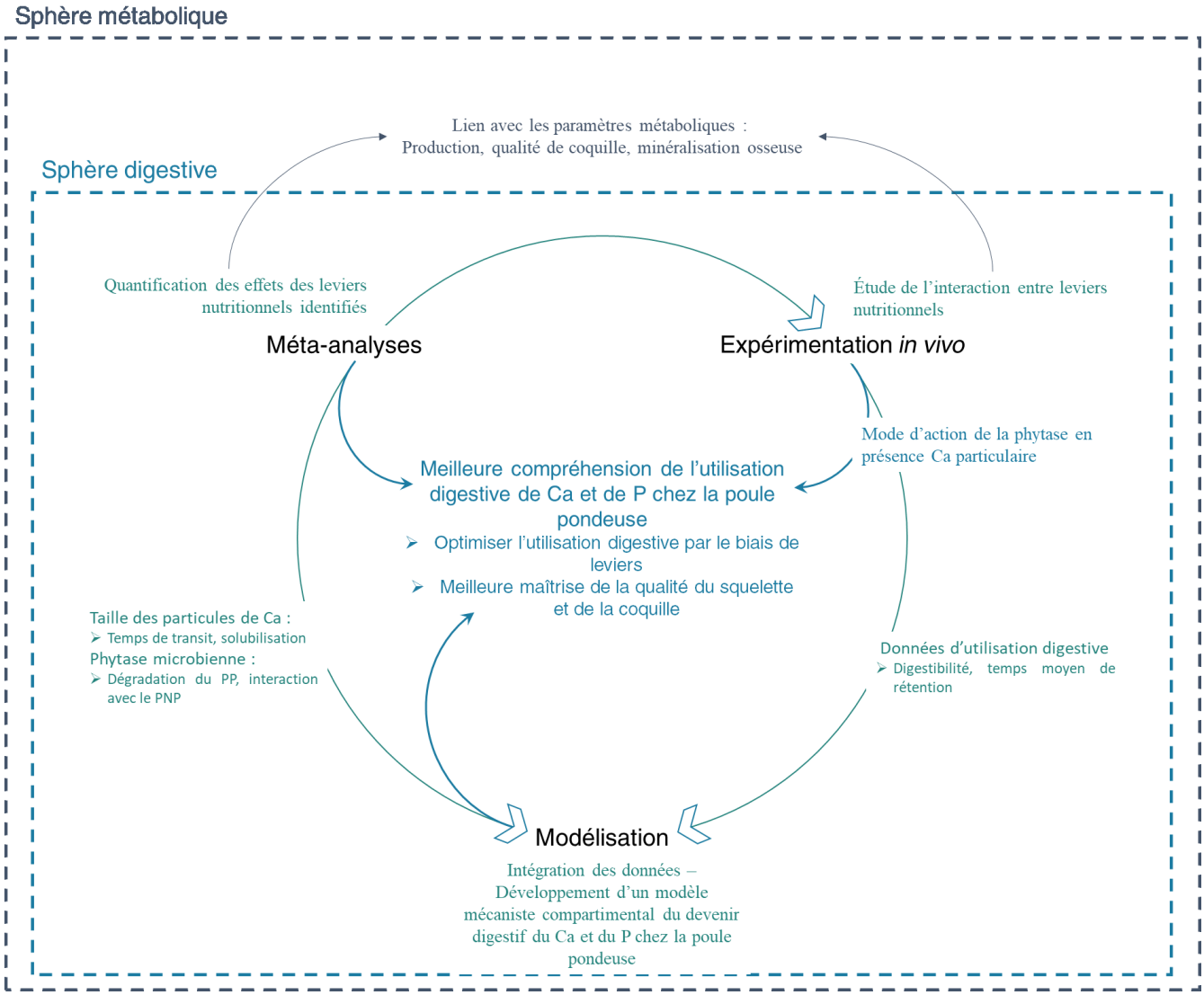


Figure 63 : Méthodologie utilisée pour répondre aux objectifs de la thèse

Afin de limiter les rejets de P dans l'environnement et d'optimiser le statut phosphocalcique tout au long de la période de ponte de la poule, et ce, en prenant en compte la cinétique de formation de la coquille, il apparait essentiel de décrire les principaux mécanismes régissant l'utilisation digestive du Ca et du P. L'objectif de ce doctorat était de caractériser les principaux leviers nutritionnels contrôlant l'utilisation digestive du Ca et du P et d'intégrer ces données à l'aide de l'outil de modélisation afin de quantifier les flux de Ca et de P existant tout au long du TGI de la poule pondeuse à l'échelle de la journée. Dans un premier temps, compte tenu des différentes approches méthodologiques utilisées dans la thèse, leur complémentarité sera discutée au regard des questions de recherche posées. Dans un second temps, les apports de ce doctorat au système d'estimation des besoins seront considérés.

1 Complémentarité des méthodes utilisées pour répondre aux questions de recherche

Au cours de ce doctorat, différents outils ont été utilisés afin de répondre à nos questions de recherche. Les travaux reposent sur des processus itératifs et complémentaires (Figure 63). Ainsi, les outils de méta-analyses et d'expérimentation *in vivo* ont été couplés à l'outil de modélisation en vue de représenter les processus biologiques sous-tendant l'utilisation digestive du Ca et du P chez la poule pondeuse.

1.1 Le calcium particulaire pour piloter l'utilisation du calcium

Le calcium particulaire est couramment utilisé dans l'alimentation des poules pondeuses (Lohmann, 2016 ; Hy-Line, 2020). La littérature scientifique recense de nombreuses études traitant de l'effet de l'incorporation de Ca particulaire sur les paramètres de qualité de coquille et de minéralisation osseuse notamment (Brister et al., 1981 ; Koutoulis et al., 2009 ; Saki et al., 2019). Néanmoins, les résultats sont variables entre les études et il n'existe pas de quantification objective de l'effet du Ca particulaire. L'utilisation de l'outil de méta-analyse apparaissait donc pertinente afin d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes d'utilisation du Ca particulaire et de quantifier ses effets sur des paramètres de production, de qualité de coquille et de minéralisation osseuse en lien avec son utilisation digestive. Ce travail a confirmé que le Ca particulaire améliorait l'utilisation métabolique du Ca par la poule pondeuse, se traduisant par une meilleure qualité de la coquille et une meilleure minéralisation osseuse. Ceci est dû à un temps de rétention dans le gésier plus long ce qui permet de réduire le décalage temporel entre la disponibilité du Ca alimentaire le jour et le besoin pour la coquille la nuit où la poule ingère peu de Ca. Enfin, cette étude a montré que l'effet bénéfique du Ca

particulaire sur la minéralisation osseuse était plus important chez la poule en fin de carrière. Cela traduit le fait que : 1) la dégradation du squelette, en lien avec la mobilisation répétée du Ca est progressive (de Witt et al., 2009), et 2) le Ca particulaire permet de limiter la mobilisation osseuse du Ca, limitant ainsi les troubles osseux liés à l'âge.

Parmi les études recensées dans la littérature, rares étaient celles ayant mesuré l'effet du Ca particulaire sur les paramètres de digestibilité pré-cæcale ne permettant pas de quantifier son effet. L'outil de méta-analyse a donc été utile pour mettre en évidence un manque d'effort de recherche. Cette observation nous a conduit à mettre en place une expérimentation *in vivo* permettant d'étudier l'effet du Ca particulaire sur des paramètres d'utilisation digestive et ce, en lien avec les phénotypes métaboliques d'intérêt, *i.e.*, qualité de coquille et minéralisation osseuse. Cette étude a montré que le Ca particulaire améliore la DPCA du Ca de 8 % et la qualité de la coquille de 4 %, en moyenne, par rapport au Ca fin. Dans cette étude, le Ca particulaire ne présente pas d'effet sur les paramètres de minéralisation osseuse en accord avec les résultats de la méta-analyse où la dégradation de l'os se produit après 38 semaines d'âge. Bien que, chez la poule en pic de ponte, aucun effet du Ca particulaire ne soit observé sur les paramètres osseux, l'incorporation de Ca particulaire dès le début de la période de ponte pourrait permettre d'amoindrir les troubles osseux liés à l'âge. D'ailleurs, Cransberg et al. (2001) indiquent que l'ostéoporose s'installe entre 16 et 31 semaines d'âge.

Les travaux réalisés au cours de ce doctorat confirment l'intérêt de l'utilisation du Ca particulaire chez la poule pondeuse pour optimiser l'utilisation de Ca. Les résultats des méta-analyses ont permis de paramétrer le modèle digestif dont le comportement a ensuite été validé à l'aide des données acquises dans l'expérimentation *in vivo*. Ainsi, le modèle digestif décrit de façon dynamique le comportement spécifique du Ca particulaire dans le TGI de la poule pondeuse.

1.2 Le calcium particulaire pour optimiser l'utilisation du phosphore

1.2.1 Utilisation de la phytase microbienne

L'incorporation de phytase microbienne dans les aliments pour monogastriques s'inscrit notamment dans un contexte de durabilité de la production. En valorisant le PP peu disponible pour l'animal, la phytase microbienne permet d'abaisser le niveau d'incorporation des phosphates. Ainsi, l'utilisation de phytase microbienne permet de : 1) limiter les rejets de P dans l'environnement ; 2) réduire le coût de la ration, les phosphates étant le troisième nutriment le plus cher de l'aliment (Boling, 2000) ; et 3) diminuer la compétition avec d'autres secteurs,

les phosphates étant une ressource épuisable (Le Noë et al., 2020). Alors, il apparaissait essentiel de quantifier les effets de l'incorporation de phytase microbienne afin de considérer ces effets dans un modèle mécaniste. La méta-analyse conduite a montré que l'incorporation de phytase microbienne permet d'améliorer l'utilisation digestive du P et que cet effet est plus important quand le niveau de PNP est bas. Par exemple, l'incorporation de 300 FTU/kg augmente la DPCA du P de 35 et 14 % dans un régime contenant respectivement 1,0 et 3,0 g de PNP/kg d'aliment, par rapport à un régime sans phytase microbienne. Les données acquises au cours de l'expérimentation *in vivo* confirme l'efficacité de la phytase microbienne dans un régime peu concentré en P. Les données acquises au cours des travaux de méta-analyses ont permis par la suite d'évaluer la capacité de prédiction du modèle.

1.2.2 Potentialisation des effets de la phytase microbienne

Des études réalisées chez le poulet de chair indiquent de fortes interactions entre le Ca et la phytase microbienne (Li et al., 2021), notamment en fonction de la taille des particules de Ca (Bradburry et al., 2016 ; Manangi et Coon, 2007). Chez la poule pondeuse, cette interaction n'a jamais été testée. Si les travaux de méta-analyses réalisés au cours de ce doctorat ont permis de quantifier les effets des deux principaux leviers alimentaires pris indépendamment, elles ne permettaient pas d'appréhender d'éventuelles interactions entre le Ca et le P.

Au vu des différences de concentrations en Ca et P entre l'aliment pour poulet de chair et poule pondeuse et de la physiologie digestive différentes entre ces deux « espèces », il apparait pertinent de s'interroger sur l'existence de cette interaction chez la poule pondeuse et de son éventuel effet sur l'utilisation des minéraux. Ainsi, l'outil d'expérimentation *in vivo* s'est révélé essentiel. Pour la première fois chez la poule pondeuse, cette étude a montré que l'incorporation de Ca particulaire limitait la formation de complexes entre le Ca et l'acide phytique permettant une meilleure efficacité de la phytase microbienne à libérer le PNP. Le Ca particulaire représente donc un levier pertinent pour optimiser l'utilisation digestive et métabolique du Ca et du P chez la poule pondeuse. Ces concepts ont permis d'enrichir le modèle par l'intégration de nouvelles connaissances pour une prédiction plus fine du devenir du Ca et du P dans le TGI de la poule pondeuse et ce, en fonction des principales caractéristiques de l'aliment.

2 Vers un nouveau système d'estimation des besoins

2.1 La nécessité de mieux caractériser l'aliment

2.1.1 Diversité des carbonates de calcium

Le Ca est un nutriment essentiel pour la poule pondeuse. Dans l'aliment, plus de 90 % du Ca est apporté par le $CaCO_3$. Le carbonate étant issu de l'extraction minière, sa composition chimique, ses caractéristiques physiques et sa taille peuvent être variables d'une source à l'autre (Mussini et al., 2019). La caractérisation du $CaCO_3$ apparait essentielle en vue de prédire son utilisation digestive par l'animal (Zhang et Coon, 1997*a*). Historiquement, le $CaCO_3$ était caractérisé par sa solubilité *in vitro*, selon une méthode proposée par Zhang et Coon (1997*b*). Brièvement, l'échantillon de $CaCO_3$ est placé pendant 10 minutes dans un milieu très acide (200 mL de HCl 0,2 N). Néanmoins, Kim et al. (2019) indiquent que cette méthode ne reflète pas les conditions physiologiques du gésier (site majoritaire de la solubilisation du Ca). Ils proposent alors de revisiter cette méthode en plaçant l'échantillon de $CaCO_3$ dans un milieu mimant le pH du gésier (*i.e.*, 3,0) pendant 15 à 30 minutes (mimant le TMR de la MS dans cet organe). S'appuyant sur cette nouvelle méthode, Gilani et al. (2022) en comparant 641 échantillons de $CaCO_3$ provenant de 40 pays à travers le monde ont montré que la solubilisation *in vitro* de fines particules (≤ 1,0 mm) variait de 70 à 90 % et celle des larges particules de 55 à 70 %. Selon Kim et al. (2019) la variabilité de la capacité du $CaCO_3$ à être solubilisé dépend majoritairement de son origine géologique.

Afin de prendre en compte la qualité du carbonate en formulation, la relation entre solubilisation *in vitro* et utilisation digestive des minéraux est cruciale à déterminer (Zhang et Coon, 1997*a*). Chez le poulet de chair, Kim et al. (2019) ont montré qu'une source de $CaCO_3$ très soluble (90 %) diminuait la DPCA du P de 60 % par rapport à une source de $CaCO_3$ peu soluble (36 %), alors qu'elle augmentait la DPCA du Ca de 135 %. Chez la poule pondeuse, de telles données ne sont pas disponibles dans la littérature. Le modèle développé au cours de ce doctorat prédit que la DPCA du P diminue de 28 % lorsque la solubilisation *in vivo* du $CaCO_3$ augmente de 36 à 90 %. À l'inverse, la DPCA du Ca augmente de 128 %. L'effet de la solubilité du Ca sur l'utilisation digestive du P est attribuable à la formation de complexes entre le Ca et le P (PNP ou PP ; Davin et al., 2020). Ces résultats traduisent la nécessité de mieux caractériser le $CaCO_3$ afin de mieux prédire l'utilisation digestive du Ca et du P. Cependant, la relation entre solubilité *in vitro* du $CaCO_3$ et utilisation digestive des minéraux n'est pas totalement élucidée (Gilani et al., 2022).

2.1.2 Le coefficient de digestibilité des minéraux comme indicateur pertinent ?

Les résultats acquis au cours de l'expérimentation *in vivo* (*cf.* Chapitre 3) montrent que la DPCA du Ca d'un régime contenant des fines et des larges particules de carbonate de Ca n'est pas un indicateur pertinent de l'utilisation du Ca. En effet, ces deux sources de Ca transitent à des vitesses différentes dans le TGI et ne suivent donc pas le Ti, utilisé comme marqueur de la phase solide du digesta. Selon Svihus et al. (2002), ce marqueur utilisé suivrait préférentiellement le transit des fines particules. De plus, la DPCA du Ca est un paramètre variable d'une publication à l'autre ; l'intervalle de données recensées dans la littérature s'étalant de 22 à 86 % (58,8 ± 14,1 %). Ce paramètre est également variable au sein d'une même publication avec 79 ± 14,4 % dans le cas de notre expérimentation *in vivo* (*cf.* Chapitre 2). L'origine de cette variabilité peut s'expliquer par différents paramètres dont la capacité propre de l'animal à assimiler les nutriments, la génétique de l'animal, la composition de la ration (notamment l'origine géologique des carbonates de Ca et des phosphates), l'âge de l'animal et enfin le moment de la prise de mesure par rapport à l'oviposition. Ce dernier point est d'ailleurs rarement mentionné dans la littérature, laissant supposer que la DPCA du Ca et du P est mesurée sur des poules non-synchronisées sur leur cycle de ponte.

L'analyse de la sensibilité du modèle digestif présentée au Chapitre 4 indique que l'étape limitante de l'utilisation digestive du Ca et du P est la phase pré-intestinale. Cette phase est le siège des principaux phénomènes de solubilisation et de complexation des minéraux. Le modèle montre que le gésier joue un rôle clé dans la dynamique d'utilisation des minéraux, en accord avec la littérautre (Rao et Roland, 1989 ; Roche et Decerprit, 1977). Au vue de la physiologie particulière de la poule pondeuse et du décalage existant entre l'apport de Ca et son besoin pour la coquille, la cinétique de libération de Ca et P solubles dans l'intestin est cruciale et apparait tout aussi, voire plus, importante que la valeur de capacité d'absorption des minéraux.

2.2 L'estimation des besoins pour répondre aux différents enjeux de la production

2.2.1 Les besoins doivent être considérés au regard de l'équilibre phosphocalcique

La nutrition animale consiste à apporter la quantité appropriée de nutriments afin de répondre aux besoins de l'animal. L'estimation des besoins est donc un enjeu fondamental pour les nutritionnistes. Chez la poule pondeuse, si le besoin en Ca semble être connu (Bar et al., 2002), les besoins en P ne sont pas clairement définis (Rodehutscord et al., 2023). Actuellement, l'estimation des besoins repose sur des approches empiriques, où le besoin est estimé au regard d'un paramètre d'intérêt. Les besoins de la poule évoluant avec l'âge, les sélectionneurs

proposent entre 3 et 5 phases de plusieurs semaines au sein desquelles les besoins en Ca et P sont fixes (Lohmann, 2020). Par exemple, Novogen (2020) recommande quatre phases de nutrition pour l'ensemble du cycle de ponte : de l'entrée en ponte à 28 semaines d'âge, de 29 à 45 semaines d'âge, de 46 à 70 semaines d'âge, et de 71 semaines d'âge à la réforme.

Le Ca est un minéral essentiel pour assurer la production de l'œuf et la qualité de la coquille. L'estimation du besoin en Ca est basée sur la quantité nécessaire pour produire un œuf, soit environ 2,2 g/jour (Narvaez-Solarte et al. 2006 ; Summers et al., 1976). Considérant son importance pour l'animal et la production, ce minéral est incorporé avec des marges de sécurité (Angel, 2011). Le fait que le Ca semble être en excès n'est pas un problème en soi : en effet, il n'y pas d'enjeux environnementaux ou économique concernant le carbonate de Ca. Néanmoins, l'apport de Ca doit être considéré également en regard du P. Comme nous l'avons montré au cours de ce doctorat, le Ca présente de fortes capacités à complexer le P, limitant ainsi l'utilisation digestive de ce dernier et engendrant une hausse de son excrétion. Selon Bar et al. (2002), une hausse de l'apport de Ca doit s'accompagner d'une hausse du P. Cette idée, basée sur le ratio Ca/P avait été proposée par le passé (Hartel, 1990 ; Roland et Harms, 1976). Cependant, les résultats acquis au cours de ce doctorat ainsi que les résultats de Kim et al. (2019) montrent que la taille de particules ou encore la solubilité *in vitro* du Ca doit être également considérée. L'intégration de l'ensemble de ces paramètres permettra de considérer l'effet d'une source de Ca sur l'utilisation du P. L'ensemble de ces éléments, fait apparaitre que l'estimation des besoins en Ca et en P doit être réalisée de façon conjointe.

2.2.2 L'estimation des besoins : une approche multicritère

En considérant que les besoins d'entretien (0,014 g/jour/kg de PV ; Kebreab et al., 2009) et le besoin pour la production de l'œuf, principalement pour le jaune (0,112 g/jour ; Nys, 2017) sont constants au cours de la journée, la principale source de variation du besoin en P chez la poule peut être attribuée à la mobilisation de l'os médullaire qui peut représenter jusqu'à 0,40 g/jour (Nys, 2017). Chez la poule, le besoin en P est majoritairement estimé à partir des performances de production (Ahmadi et Rodehutscord, 2012 ; Wei et al., 2022). Cependant, le besoin de P pourrait être estimé suivant d'autres objectifs tels que 1) le coût de production avec les phosphates dont les prix sont élevés et volatils alors qu'un apport insuffisant en P se traduit rapidement par une baisse de la production (*cf.* Chapitre 1), 2) l'environnement, l'excès de P apporté à l'animal étant excrété et pouvant dans certains contextes de production être à l'origine de problèmes d'eutrophisation et 3) le bien-être animal, une déficience en P pouvant se traduire par une baisse de la minéralisation osseuse et donc un risque accru de fractures.

Les différents éléments présentés ici semblent montrer que l'approche empirique d'estimation des besoins en Ca et en P, basée sur la réponse d'un critère unique (l'œuf pour le Ca, l'os pour le P) n'est pas adaptée. En effet, les besoins en Ca et P de la poules requièrent une approche multicritère afin de répondre aux différents enjeux auxquels sont confrontés la filière (coquille, os, environnement, bien-être animal) mais également afin de prendre en compte les interactions entre Ca et P en fonction de leur origine. Ainsi, le modèle développé au cours de ce doctorat constitue la première étape de la construction d'un outil d'intérêt capable de prédire l'utilisation des minéraux à l'échelle de l'animal, au cours de la journée. Un tel outil permettra de prédire de façon précise le besoin en Ca et en P, en considérant les principaux facteurs alimentaires *via* une approche multicritère, permettant ainsi de répondre aux différents enjeux de la filière.

2.3 L'utilisation des minéraux, une dynamique complexe

2.3.1 La fonction de reproduction comme force motrice

Chez la poule, la majeure partie des besoins en Ca et P est constituée par les besoins pour la production de l'œuf, directement ou indirectement (*via* la mobilisation osseuse). Les besoins en minéraux ne sont donc pas constants au cours de la journée. Dans ce cadre, la physiologie de la reproduction de la poule apparait comme la force motrice de l'utilisation digestive du Ca et du P. Durant les phases où la poule ne produit pas de coquille d'œuf, elle requiert du P et du Ca pour reconstituer ses réserves osseuses (Etches, 1987). Cela se produit aux cours des 6 premières heures après la ponte, donc principalement le matin (Clunies et al., 1993). Durant cette période, la poule requiert du Ca rapidement disponible, *i.e.*, suivant la même cinétique que le P afin d'assurer un dépôt conjoint suffisant au niveau de l'os médullaire. À l'inverse, lors des phases intensives de calcification, le P est apporté en excès *via* l'alimentation (ratio $Ca/P_{aliment} = 6,2$) ou bien la mobilisaiton osseuse (ratio $Ca/P_{os} = 2,2$) par rapport aux besoins pour l'œuf (ratio $Ca/P_{oeuf} = 18,3$). Cet excès de P sera excrété *via* les urines (Manangi et al., 2018 ; Nys et Leroy, 2018). Durant cette phase, les besoins en Ca sont importants (0,18 g/h) et l'apport de Ca particulaire, lentement disponible permet de limiter la mobilisation osseuse.

La quantité de P sortie de l'os médullaire dépend de l'heure de ponte (Etches, 1987 ; van de Velde et al., 1984) : plus la poule pond tard après l'allumage de la lumière, plus elle aura recours au Ca d'origine médullaire. S'appuyant sur les données tirées de l'essai expérimental (*cf*. Chapitre 2) ainsi que sur les données de Kebreab et al. (2009), nous avons calculé le bilan

Tableau 36 : Balance du P estimée pour des poules pondeuses utilisées dans l'expérimentation *in vivo* présentée aux Chapitres 2 et 3.[1]

	Heure de ponte (après allumage)[2]	P ingéré[2]	P absorbé[2]	Besoin métabolique[3]	Besoin œuf[3]	Besoin os[3]	**Balance**
FL0[4]	3h15	558	271	25	112	58	**77**
MIX0	2h47	526	240	25	112	33	**70**
FL300	2h04	405	141	25	112	-6	**20**
MIX300	3h39	388	161	25	112	79	**-55**

[1]Les valeurs présentées sont exprimées en mg/jour.
[2]Valeurs observées lors de l'expérimentation *in vivo* présentées aux Chapitre 2 et 3. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne de 18 poules/traitement.
[3]Valeurs prédites par le modèle de Kebreab et al. (2009).
[4]Régimes expérimentaux présentés au Chapitre 2 et 3. FL0 et MIX0, aliments contenant 3,4 g PNP/kg d'aliment avec 100 % de carbonate de Ca fin ou avec 75 % de carbonate de Ca particulaire + 25 % de carbonate de Ca fin, respectivement. FL300 et MIX300, aliments contenant 1,8 g PNP/kg d'aliment, supplémentés avec 300 FTU de phytase/kg d'aliment, avec 100 % de carbonate de Ca fin ou avec 75 % de carbonate de Ca particulaire + 25 % de carbonate de Ca fin, respectivement.

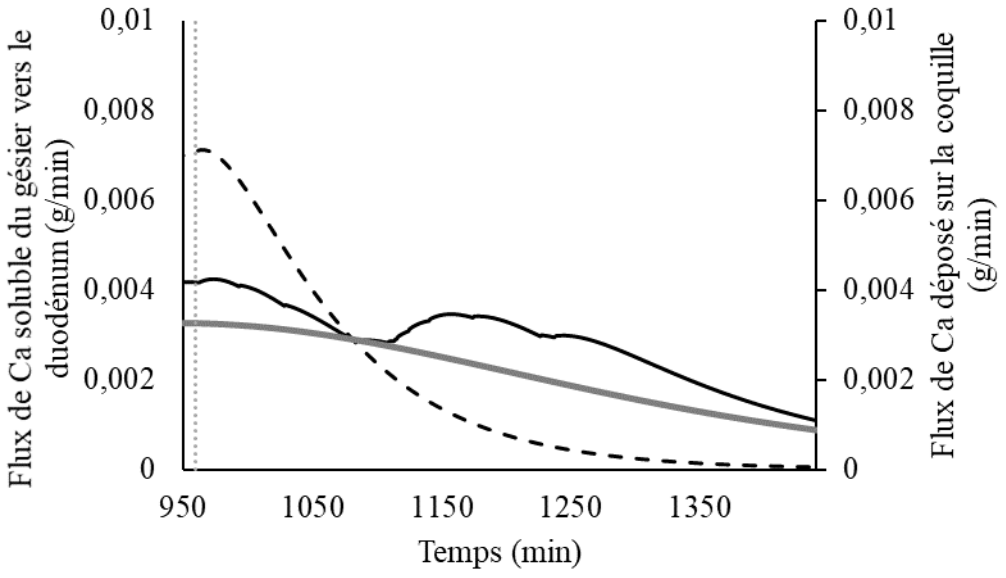


Figure 64 : Flux de Ca soluble (g/min) sortant du gésier vers le duodénum simulé par le modèle digestif.
La courbe noire pleine représente le régime MIX300 (aliment contenant 1,8 g PNP/kg d'aliment, supplémentés avec 300 FTU de phytase/kg d'aliment, avec 75 % de carbonate de Ca particulaire + 25 % de carbonate de Ca fin) et la courbe noire pointillée représente le régime FL300 (aliment contenant 1,8 g PNP/kg d'aliment, supplémentés avec 300 FTU de phytase/kg d'aliment, avec 100 % de carbonate de Ca fin). La droite grise pointillée horizontale représente l'heure d'extinction de la lumière. La courbe grise représente le flux de Ca sortant du plasma pour être déposé sur la coquille. Un flux de Ca soluble sortant du gésier inférieur au besoin pour la coquille traduit nécessairement une mobilisaiton osseuse du Ca.

P pour les différents régimes alimentaires étudiés (Tableau 36). Cette analyse indique un bilan positif pour les régimes sans phytase microbienne. Dans ces régimes, les poules recevaient 5,3 g de P*t*/kg d'aliment. Ces résultats laissent supposer que le P était en excès, en accord avec Jing et al. (2018) qui ont montré qu'il était possible d'apporter 3,8 g de P*t*/kg d'aliment sans altérer les performances de production ni la minéralisation osseuse.

De façon surprenante, les poules qui présentaient la DPCA du P la plus basse (35 % ; FP300) présentaient également un bilan positif, alors que les poules du régime MIX300 présentaient un bilan négatif, malgré une digestibilité plus élevée (42 %). Les poules du régime MIX300 pondaient plus tard que celle du régime FP300 : 8 h et 9 h 30, respectivement. Au vu de ces résultats, il pourrait paraître pertinent de penser que les poules du régime MIX300 ont creusées l'écart entre le Ca disponible et le besoin pour la coquille, induisant une mobilisation osseuse plus importante. Néanmoins, les données de besoins en P tirées de Kebreab et al. (2009), ne prennent pas en considération l'effet du Ca particulaire pour diffuser du Ca soluble plus longtemps au cours de la nuit et ainsi limiter la mobilisation osseuse du Ca. Le modèle développé au cours de ce doctorat simule quant à lui une diffusion plus lente de Ca soluble provenant du Ca particulaire (Figure 64) permettant de répondre aux besoins pour la coquille, ce qui aurait pour conséquence de limiter la mobilisation osseuse. Cette analyse montre : 1) l'importance du cycle de ponte journalier sur l'utilisation du Ca et du P chez la poule pondeuse, et 2) la nécessité de lier le modèle digestif développé au cours de ce doctorat avec un modèle de l'utilisation métabolique du Ca et du P.

2.3.2 Vers une alimentation de précision chez la poule pondeuse

Considérant les éléments présentés au cours de cette discussion, il apparait pertinent de suggérer que l'apport de Ca et P devrait suivre un schéma différent à l'échelle de la journée afin de répondre aux besoins métaboliques particuliers de la poule. Par exemple, Molnar et al. (2018) ont testé six combinaisons différentes pour apporter le $CaCO_3$ au cours de la journée chez des poules de 75 semaines d'âge. Par exemple, ces auteurs ont testé : 1) 50 % du Ca apporté le matin sous forme de fines particules (FP) et 50 % du Ca apporté l'après-midi sous forme de larges particules (LP) ; 2) 50 % du Ca apporté le matin sous forme de LP et 50 % du Ca apporté l'après-midi sous forme de FP ; 3) 30 % du Ca apporté le matin sous forme de FP et 70 % du Ca apporté l'après-midi sous forme de LP. Ces auteurs ont montré que le régime apportant 50 % du Ca le matin sous forme de FP et 50 % l'après-midi sous forme de LP était le régime optimal en termes de production et de qualité de coquille. De façon surprenante, ces auteurs ne montrent pas d'effets des différentes combinaisons sur les paramètres de

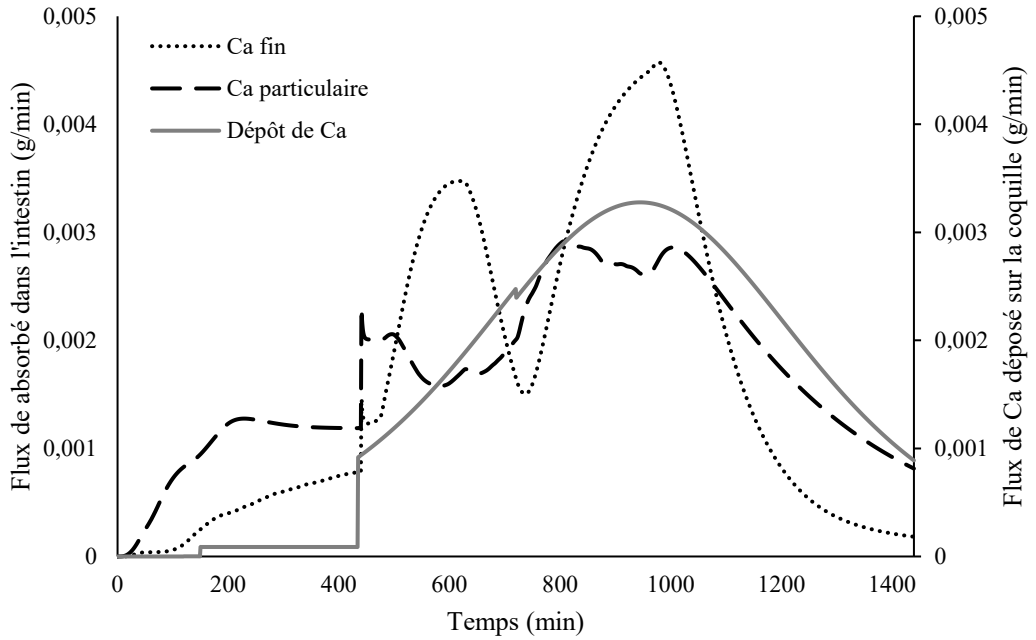


Figure 65 : Flux de Ca absorbé au niveau intestinal (g/min) au regard du besoin en Ca pour la coquille.
Les pointillés courts représentent un régime 50 % du Ca apporté le matin sous forme de LP et 50 % du Ca apporté l'après-midi sous forme de FP. Les pointillés longs représentent un régime 50 % du Ca apporté le matin sous forme de FP et 50 % du Ca apporté l'après-midi sous forme de LP. La courbe grise représente le flux de Ca déposé sur la coquille (g/min).

minéralisation osseuse. Néanmoins, les poules recevant 50 % du Ca le matin sous forme de LP et 50 % l'après-midi sous forme de FP présentaient la moins bonne qualité de coquille. Cette observation pourrait traduire une plus forte mobilisation osseuse, comme le suggère Sauveur (1988). La simulation de ces deux régimes proposés par Molnar et al. (2018) est représentée en Figure 65. Cette figure montre que l'apport de Ca fin l'après-midi créé un déficit par rapport au besoin pour la coquille, ce qui devrait stimuler la résorption osseuse. Cette approche semble montrer la pertinence d'un apport biphasique du Ca.

Dans une perspective d'alimentation de précision, l'outil de modélisation apparait essentiel afin de tester différentes stratégies nutritionnelles qui pourront être validées dans un second temps par une approche *in vivo*. Afin d'évaluer de façon précise et complète l'effet des stratégies alimentaires d'intérêt, il conviendra de modéliser les flux d'utilisation du Ca et du P à l'échelle de l'animal, comme l'ont proposé Létourneau-Montminy et al. (2015) chez le porc en croissance.

CONCLUSION

Les connaissances acquises au cours de ce doctorat, couplées à des données issues de la littérature, ont permis le développement d'un modèle de recherche capable de prédire le devenir du Ca et du P dans le tube digestif de la poule pondeuse. Ce doctorat, en combinant des outils de méta-analyses et d'expérimentation *in vivo*, a contribué à améliorer les connaissances sur les processus impliqués dans l'utilisation digestive du Ca et du P. Ces travaux ont confirmé que l'incorporation de Ca particulaire permet d'améliorer l'utilisation digestive et métabolique des minéraux. L'incorporation de Ca particulaire limite la formation de complexes entre le Ca et l'acide phytique par rapport au Ca fin. Ainsi, l'incorporation de Ca particulaire améliore l'efficacité de la phytase microbienne, permettant d'optimiser l'utilisation digestive et métabolique du P chez la poule. L'effet du Ca particulaire est médié par une plus longue rétention dans le gésier, assurant une diffusion progressive de Ca soluble dans l'intestin. Ce doctorat a, de plus, mis en évidence l'importance de la phase gastrique pour moduler la cinétique d'utilisation des minéraux et ainsi améliorer la synchronisation avec le cycle de biominéralisation de la coquille. L'ensemble de ces travaux montrent l'importance des étapes de solubilisation/complexation pour l'utilisation digestive des minéraux et l'intérêt d'un modèle pour appréhender la complexité des interactions entre les minéraux.

En considérant les leviers nutritionnels et les étapes majeures contrôlant l'utilisation digestive du Ca et du P, le modèle développé au cours de ce doctorat, constitue une première étape pour optimiser l'apport et l'utilisation des minéraux. L'étape suivante sera de combiner ce modèle digestif avec un modèle décrivant les flux de Ca et P au niveau métabolique (tissus mous, os et œuf). Ce nouvel outil fournira une représentation globale de l'utilisation du Ca et du P à l'échelle de l'animal en fonction de l'âge de la poule. Couplé à une approche par alimentation de précision, cet outil pourra à terme synchroniser les apports et les besoins en minéraux de la poule à l'échelle de la journée, en vue notamment de limiter la mobilisation osseuse, véritable enjeu économique et de bien-être animal pour améliorer la fin de période productive.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbasi, F., T. Fakhur-un-Nisa, J. Liu, X. Luo, and I. H. R. Abbasi. 2019. Low digestibility of phytate phosphorus, their impacts on the environment, and phytase opportunity in the poultry industry. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int*. 26: 9469−9479.

Abdollahi, M. R., V. Ravindran, and B. Svihus. 2013. Pelleting of broiler diets: an overview with emphasis on pellet quality and nutritional value. *Anim. Feed Sci. and Technol*. 179: 1−23.

Abe, E. H., Horikawa, T. Masumura, M. Sugahara, M. Kubota, and T. Suda. 1982. Disorders of cholecalciferol metabolism in old egg-laying hens. *J. Nutr.* 112: 436−446.

Abudabos, A. 2012. Phytate phosphorus utilization and intestinal phytase activity in laying hens. *Ital. J. Anim. Sci*. 11: 1e8.

Adedokun, S. A., and O. Adeola. 2013. Calcium and phosphorus digestibility: metabolic limits. *J. Appl. Poult. Res*. 22: 600−608.

Agriculture Canada. 2021. L'industrie canadienne des œufs de consommation et de transformation. https://agriculture.canada.ca/fr/secteur/production-animale/information-marche-volaille-oeufs/consommation-transformation.

Ahlbeck, J., T. Engman, S Fälten, and M. Vihma. 1993. A method for measuring the reactivity of absorbents for wet flue gas desulfurization. *Chem. Eng. Sci*. 48: 3479−3484.

Ahmadi, H., and M. Rodehutscord. 2012. A meta-analysis of responses to dietary nonphytate phosphorus and phytase in laying hens. *Poult. Sci*. 91: 2072−2078.

Ahmadi, R., and F. Rahimi. 2011. Factors affecting quality and quantity of egg production in laying hens: a review. *World Appl. Poult. Sci*. 12: 372−384.

Akahori, F., M. Matsurra and K. Arai. 1971. Studies on the movement of the alimentary canal. VI. Physiological values in growing female chicks and quails. *Bull. Azabu Univ. Vet. Med* 22: 25.

Akbari Moghaddam Kakhki, M., T. Heuthorst, A. Mills, M. Neijat, and E. Kiarie. 2019. Interactive effects of calcium and top-dressed 25-hydroxy vitamin D3 on egg production, egg shell quality, and bones attributes in aged Lohmann LSL-lite layers. *Poult. Sci*. 98: 1254−1262.

Al-Batshan, H. A., S. E. Scheideler, B. L. Black, J. D. Garlich, and K. E. Anderson. 1994. Duodenal calcium uptake, femur ash, and eggshell quality decline with age and increase following molt. *Poult. Sci*. 73: 1590−1596.

Alfonso-Carillo, C., C. Benavides-Reyes, J. de los Mozos, N. Dominguez-Gasca, E. Sanchez-Rodriguez, A. I. Garcia-Ruiz, and A. B. Rodriguez-Navarro. 2021. Relationship between bone quality, egg production and eggshell quality in laying hens at the end of an extended production cycle (105 weeks). *Animals* 11: 623.

Amerah, A. M., P. W. Plumstead, L. P. Barnard, and A. K. Kumar. 2014. Effect of calcium level and phytase addition on ileal phytate degradation and amino acid digestibility of broilers fed corn-based meals. *Poult. Sci*. 93: 906−915.

Amerah, A. M., V. Ravindran, R. G. Lentle, and D. G. Thomas. 2008. Influence of feed particle size on the performance, energy utilization, digestive tract development, and digesta parameters of broiler starters fed wheat- and corn-based diets. *Poult. Sci*. 87: 2320−2328.

Angel, R. 2011. Calcium and phosphorus requirements in broilers and laying hens. Australian Poultry Science Symposium, Sidney, Australia, 14−16 February.

Angel, R., N. M. Tanim, T. J. Applegate, A. S. Dhandu and L. E. Ellestad. 2002. Phytic acid chemistry: influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. *J. Appl. Poult. Res*. 11: 471−480.

AOAC International. 2006. Method 990.08: Metals in solid wastes. In W. Horwitz, G. W. Latimer, and AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC International. Maryland: Association of Official Analytical Chemists.

Applegate, T. J., and C. R. Angel. 2004. Nutrient requirements of poultry publication: History and need for an update. *J. Appl. Poult. Res*. 23: 567−575.

Ascenzi, A., C. François, and D. S. Bocciarelli. 1963. On the bone induced by estrogens in birds. *J. Ultrastruct. Res*. 8: 491−505.

Babatunde, O. O., and O. Adeola. 2020. Additivity of apparent and standardized ileal digestibility of phosphorus in corn and canola meal mixed diets; basal endogenous loss of phosphorus responses to phytase and age in broiler chickens. *Br. Poult. Sci*. 62: 244−250.

Bain, M. M., Y. Nys, and I. C. Dunn. 2016. Increasing persistency in lay and stabilising egg quality in longer laying cycles. What are the challenges? *Br. Poult. Sci*. 57: 330 – 338.

Ballard, P. D., and H. V. Bielier. 1975. Effect of photoperiods on feed intake rhythms of domestic fowl. *Int. J. Biometeor*. 9: 255−266.

Bar, A. 2008. Calcium homeostasis and vitamin D metabolism and expression in strongly calcifying laying birds. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol*. 151: 477−490.

Bar, A., 2009. Calcium transport in strongly calcifying laying birds: mechanisms and regulation. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr*. 152: 447−469.

Bar, A., A. Cohen, S. Edelstein, and M. Shemesh. 1978. Involvement of cholecalciferol metabolism in birds in the adaptation of calcium absorption to the needs during reproduction. *Comp. Biochem. Physiol. B. Comp. Biochem*. 59: 245−249.

Bar, A., A. Maoz, and S. Hurwitz. 1979. Relationship of intestinal and plasma calcium binding protein to intestinal calcium absorption. *FEBS Lett*. 102: 79–81.

Bar, A., and S. Hurwitz. 1984. Egg shell quality, medullary bone ash, intestinal calcium and phosphorus absorption, and calcium-binding protein in phosphorus-deficient hens. *Poult. Sci*. 63: 1975–1979.

Bar, A., and S. Hurwitz. 1987. Vitamin D metabolism and calbindin (calcium-binding protein) in aged laying hens. *J. Nutr*. 117: 1775−1779.

Bar, A., U. Eisner, G. Montecuccoli, and S. Hurwitz. 1976. Regulation of intestinal calcium absorption in the laying quail: independent of kidney vitamin D hydroxylation. *J. Nutr*. 106: 1336−1342.

Bar, A., V. Razaphkovsky, and E. Vax. 2002. Re-evaluation of calcium and phosphorus requirements in aged laying hens. *Br. Poult. Sci*. 43: 261−269.

Bastiabelli, D., D. Sauvant, and A. Rerat. 1996. Mathematical modeling of digestion and nutrient absorption in pigs. *J. Anim. Sci*. 74: 1873−1887.

Bauer, L. R., and D. M. Hamby. 1991. Relative sensitivities of existing and novel model parameters in atmospheric tritium dose estimates. *Rad. Prot. Dosimetry*. 37: 253−260.

Beaumont, C., F. Calenge, H. Chapuis, J. Fablet, F. Minvielle, and M. Tixier-Boichard. Génétique de la qualité de l'œuf. *INRA Prod. Anim*. 23 : 123−132.

Beck, M. M., and K. K. Hansen. 2004. Role of estrogen in avian osteoporosis. *Poult. Sci*. 83: 200−206.

Bécot, L., N. Bédère, and P. Le Roy. 2021. Sélection sur la ponte des poules en systèmes alternatifs à la cage. *INRA Prod. Anim*. 34 : 1−14.

Bedford, M., and X. Rousseau. 2017. Recent findings regarding calcium and phytase in poultry nutrition. *Anim. Prod. Sci*. 57: 2311−2316.

Bedrani, L., E. Hellion, N. Guyot, S. Réhault-Godbert, and Y. Nys. 2013. Passive maternal exposure to environmental microbes selectively modulates the innate defenses of chicken egg white by increasing some of its antibacterial activities. *BMC Microbiology* 13: 128.

Bello, A., and D. R. Korver. 2019. Long-term effects of *Buttiauxella sp*. Phytase on performance, eggshell quality, apparent ileal Ca and P digestibility, and bone properties of white egg layers. *Poult. Sci*. 98: 4848−4859.

Bello, A., Y. Dersjant-Li, and D. R. Korver. 2020. Effects of dietary calcium and available phosphorus levels and phytase supplementation on performance, bone mineral density, and serum biochemical bone markers in aged white egg-laying hens. *Poult. Sci*. 99: 5792−5801.

Bergwitz, C., and H. Jüppner. 2010. Regulation of phosphate homeostasis by PTH, vitamin D, and FGF23. *Ann. Rev. Med*. 61: 91−104.

Bhatti, B. M., and T. R. Morris. 1978. The effect of ahemeral light and dark cycles on patterns of food intake by the laying hen. *Br. Poult. Sci*. 19: 125−128.

Bibby, J., and H. Toutenburg. 1977. Prediction and Improved Estimation in Linear Models. New-York: Wiley. 188 pages.

Biggs, P., and C. M. Parsons. 2009. The effects of whole grains on nutrient digestibilities, growth performance, and cecal short-chain fatty acid concentrations in young chicks fed ground corn-soybean meal diets. *Poult. Sci*. 88: 1893−1905.

Bjerrum, L., K. Pedersen, and R. M. Engberg. 2005. The influence of whole wheat feeding on salmonella infection and gut flora composition in broilers. *Avian Dis*. 49: 9−15.

Boling, S. D., M. W. Douglas, M. L. Johnson, X. Wang, C. M. Parsons, K. W. Koelkebeck, and R. A. Zimmerman. 2000. The effects of dietary available phosphorus levels and phytase on performance, of young and older laying hens. *Poult. Sci*. 79: 224−230.

Bo-Linn, G. W., G. R. Davis, D. J. Buddrus, S. G. Morawski, C. S. Ana, and J. S. Fordtran. 1984. An evaluation of the importance of gastric acid secretion in the absorption of dietary calcium. *J. Clin. Invest*. 73: 640−647.

Bournazel, M., M. Lessire, S. Klein, N. Même, C. Peyronnet, A. Quinsac, M. J. Duclos, and A. Narcy. 2018. Phytase supplementation in diets rich fiber from rapeseed enhances phosphorus and calcium digestibility but not retention in broiler chickens. *Poult. Sci*. 97: 1627−1640.

Bradbury, E. J., S. J. Wilkinson, G. M. Cronin, C. L. Walk, and A. J. Cowieson. 2016. Effects of phytase, calcium source, calcium concentration and particle size on broiler performance, nutrient digestibility and skeletal integrity. *Anim. Prod. Sci*. 58: 271−283.

Braw-Tal, R., S. Yossefi, S. Pen, D. Shinder, and A. Bar. 2004. Hormonal changes associated with ageing and induced moulting of domestic hens. *Br. Poult. Sci*. 45: 815−822.

Brejnholt, S. M., G. Dionisio, V. Glitsoe, L. K. Skov, and H. Brinch-Pedersen. 2011. The degradation of phytate by microbial and wheat phytases is dependent on the phytate matrix and the phytase origin. J. *Sci. Food Agric*. 91: 1398−1405.

Breves, G., and B. Schröder. 1991. Comparative aspects of gastrointestinal phosphorus metabolism. *Nutr. Res. Rev*. 4: 125−140.

Brister, R. D. Jr., S. S. Linton, and C. R. Creger. 1981. Effects of dietary calcium sources and particle size on laying hen performance. *Poult. Sci*. 60: 2648−2654.

Bronner, F., and D. Pansu. 1999. Nutritional aspects of calcium absorption. *J. Nutr*. 129: 9−12.

Bronner, F., D. Pansu, and W. D. Stein. 1986. An analysis of intestinal calcium transport across the rat intestine. *Am. J. Physiol*. 250: 561−569.

Brown, B. P., K. Schulze-Delrieu, J. E. Schrier and M. M. Abu-Yousef. 1993. The configuration of the human gastrointestinal junction in the separate emptying of liquids and solids. *Gastroenterology* 105: 433−440.

Burhol, P. G., and B. I. Hirschowitz. 1972. Dose responses with subcutaneous infusion of histamine in gastric fistula chickens. *Am. J. Physiol*. 222: 308−313.

Carletti, C., H. Gréman, C. de Blasio, E. Mäkilä, J. Salonen, D. Yu Murzin, T. Salmi, and T. Westerlund. 2015. Revisiting the dissolution kinetics of limestone – experimental analysis and modeling. *J. Chem. Technol. Biotechnol*. 91: 1517−1531.

Carlos, A. B., and H. M. Jr., Edwards. 1998. The effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol and phytase on the natural phytate phosphorus utilization by laying hens. *Poult. Sci*. 77: 850−858.

Castillo, C. A., C. Benavides-Reyez, J. de dos Mozos, N. Dominguez-Gasca, E. Sanchez-Rodriguez, A. I. Garcia-Ruiz, and A. B. Rodriguez-Navarro. 2021. Relationship between bone quality, egg production and eggshell quality in laying hens at the end of an extended production cycle (105 weeks). *Animals* 11: 623.

Chan, P. K., and G. T. Rochelle. 1982.. Limestone dissolution – Effects of pH, CO_2 and buffers modeled by mass transfer. In J. L. Hudson and G. T. Rochelle, Flue Gas Desulfurization (1st edtion). San Francisco: American chemical society. Pages 75–97.

Chaplin, S. B., J. Raven and G. E. Duke. 1992. The influence of the stomach on crop function and feeding behavior in domestic turkey. *Physiol. Behav*. 52: 261−266.

Chen, H. Protein digestion kinetics in pigs and poultry. Thèse de doctorat, Université de Wageningen, 2017, 168 pages.

Chen, H., P. A. Wieranga, W. H. Hendriks and A. J. M. Jansman. 2019. *In vitro* protein digestion kinetics of protein sources for pigs. *Animal* 13: 1154−1164.

Chen, R. F., T. Liu, H. W. Rong, H. T. Zhong, and C. H. Wei. 2021. Effect of organic substances on nutrients recovery by struvite electrochemical precipitation from synthetic anaerobically treated swine wastewater. *Membranes* 11: 594.

Cheng, X., and Z. Ning. 2023. Research progress on bird eggshell quality defects: a review. *Poult. Sci*. 102: 102283.

Cheryan, M., F. W. Anderson, and F. Grynspan. 1983. Magnesium-phytate complexes: effect of pH and molar ratio on solubility characteristics. *Cereal Chem*. 60: 235−237.

Choi, J. H., H. Namkung, and I. K. Paik. 2004. Feed consumption pattern of laying hens in relation to time of oviposition. *Asian-Aust. J. Anim. Sci*. 17: 371−373.

Choi, J. H., R. D. Miles, and R. H. Harms. 1979. Effects of different short-term dietary phosphorus levels on egg specific gravity and blood phosphorus of hens. *Poult Sci*. 58: 99−103.

Chow, L. C. 2001. Solubility of calcium phosphates. In L. C. Chow, E. D. Eanes, Octacalcium phosphate. Karger: Monogr Oral Sci. Basel. Pages 94−111.

Classen, H. L., J. Apajalahti, B. Svihus, and M. Choct. 2016. The role of the crop in poultry production. *Wolrds Poult. Sci. J.* 72: 1−14.

Clench, M. H., and J. R. Mathias. 1995. The avian caecum; a review. *Wilson Bull*. 107: 93−121.

Clunies, M., R. J. Etches, C. Fair, and S. Leeson. 1993. Blood, intestinal and skeletal calcium dynamics during egg formation. *Can. J. Anim. Sci*. 73: 517−532.

CNPO. 2022. Les Chiffres clés. https://oeuf-info.fr/infos-filiere/les-chiffres-cles/.

Cohen, A., A. Bar, U. Eisner, and S. Hurwitz. 1978. Calcium absorption, calcium-binding protein, and eggshell quality in laying hens fed hydroxylated vitamin D derivatives. *Poult. Sci*. 57: 1646−1651.

CORPEN. 2006. Estimation des rejets d'azote, phosphore, potassium, calcium, cuivre et zinc par les élevages avicoles. Influence de la conduite alimentaire et du mode de logement des animaux sur la nature et la gestion des déjections. Paris : Éditions Corpen. 55 pages.

Couture, C., A. Narcy, C. Rachel, and M.-P. Létourneau-Montminy. 2019. Méta-analyse de la digestibilité iléale du phosphore chez le poulet de chair : effet du phosphore alimentaire, du calcium et de la phytase. 13ème Journées de la Recherche Avicole, Tours, France, 20-21 mars.

Cowieson, A. J., P. Wilcock, and M. R. Bedford. 2011. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. *Worlds Poult. Sci. J*. 67: 225−236.

Cransberg, P. H., G. B. Parkinson, S. Wilson, and B. H. Thorp. 2001. Sequential studies of skeletal calcium reserves and structural bone volume in a commercial layer flock. *Br. Poult Sci*. 42: 260−265.

Crenshaw, T. D., E. R. Peo, A. J. Lewis, and B. D. Moser. 1981. Bone strength as a trait for assessing mineralization in swine: a critical review of techniques involved. *J. Anim. Sci*.53: 827 – 835.

Cross, H. S., H. Debriec, and M. Peterlik. 1990. Mechanism and regulation of intestinal phosphate absorption. *Miner. Electrolyte Metab*. 16: 115−124.

Curtis, P. A., L. K. Kerth, and K. E. Anderson. 2005. Quality and compositional characteristics of layer hens as affected by bird age. XIth European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products, Doorwerth, The Netherlands, 23-26 May.

Cusack, M., A. C. Fraser, and T. Stachel. 2003. Magnesium and phosphorus distribution in the avian eggshell. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 134: 63−69.

Dacke, C. G., S. Arkle, D. J. Cook, I. M. Wormstone, S. Jones, M. Zaidi, and Z. A. Pascal. 1993. Medullary bone and avian calcium regulation. *J. Exp. Biol*. 184: 63−88.

Danisi, G., C. H. van Os, and R. W. Straub. 1984. Phosphate transport across brush border and basolateral membrane vesicles of small intestine. *Prog. Clin. Biol. Res*. 168: 229−234.

David, L. S., M. R. Abdollahi, M. R. Bedford, and V. Ravindran. 2021. Comparison of the apparent ileal calcium digestibility of limestone in broilers and layers. *Br. Poult. Sci*. 62: 852−857.

de Araujo, J. A., J. H. V. da Silva, F. G. P. Costa, J. M. B. de Sousa, P. E. N. Givisiez, and N. K. Sakomura. 2011. Effect of the levels of calcium and particle size of limestone on laying hens. *Rev. Bras. Zootec*.40: 995 – 1005.

de Oliveira, A. N., E. R. Freitas, T. M. B. Filgueira, C. E. B. Cruz, and G. A. J. do Nascimento. 2013. Limestone particle size and artificial light for laying hens in the second laying cycle. *R. Bras. Zootec*. 42: 481−488.

de Verdal, H., S. Mignon-Grasteau, C. Jeulin, E. Le Bihan-Duval, M. Leconte, S. Mallet, C. Martin, and A. Narcy. 2010. Digestive tract measurements and histological adaptation in broiler lines divergently selected for digestive efficiency. *Poult. Sci*. 89: 1955−1961.

de Witt, F. H., H. J. van der Merwe, J. P. Hayes, and M. D. Fair. 2006. Influence of particle size distribution on *in vivo* and *in vitro* limestone solubility. *S. Afr. J. Anim*. 36 (suppl. 1): 95−98.

de Witt, F. H., N. P. Kuleile, H. J. van der Merwe, and M. D. Fair. 2009. Effect of limestone particle size on bone quality characteristics of hens at end-of-lay. *S. Afr. J. Anim. Sci*. 39: 41−44.

Denbow, D. M. 2015. Chapter 14 – Gastrointestinal anatomy and physiology. In Colin G. Scanes, Sturkie's avian physiology (6th edition). Cambridge: Academic Press. Pages 337−366.

Dersjant-Li, Y., A. Awati, H. Schulze, and G. Partridge. 2015. Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *J. Sci. Food. Agric*. 95: 878−896.

Diana, T. F., A. A. Calderano, F. de Castro Tavernari, H. S. Rostagno, A. de Oliveira Teixeira, and L. F. Teixeira Albino. 2021. Age and calcium sources in laying hens feed affect calcium digestibility. *Open J. Anim. Sci*.11: 501−513.

Dibner, J. J., and J. D. Richards. 2004. The digestive system: challenges and opportunities. *J. Appl. Poult. Res*. 13: 86−93.

Ding, X. M., D. D. Li, S. P. Bai, J. P. Wang, Q. F. Zeng, Z. W. Su, Y. Xuan, and K. Y. Zhang. 2018. Effect of dietary xylooligosaccharides on intestinal characteristics, gut microbiota, cecal short-chain fatty acids, and plasma immune parameters of laying hens. *Poult. Sci*. 97: 874−881.

Dionisio, G., C. K. Madsen, P. B. Holm, K. G. Welinder, M. Jorgensen, E. Stoger, A. Arcalis, and H. Brinch-Pedersen. 2011. Cloning and characterization of purple acid phosphatase phytase from wheat, barley, maize and rice. *Plant Physiol*. 156: 1087−1100.

Dombre, C., N. Guyot, T. Moreau, P. Monget, M. Da Silva, J. Gautron, and S. Réhault-Godbert. 2017. Egg serpins: the chicken and/or the egg dilemma. *Semin. Cell. Dev. Biol*. 62: 120−132.

Dong, X., and Y. Q. Zhang. 2020. An insight on egg white: from most common functional food to biomaterial application. *J. Biomed. Mater. Res*. 109: 1−14.

Donoghue, D. J., and H. Hairston. 2000. Food safety implication: certain antibiotics may rapidly contaminate egg albumen during the process of its formation. *Br. Poult. Sci*. 41: 174−177.

Driver, J. P., G. M. Pesti, R. I. Bakalli, and H. M. Jr. Edwards. 2005. Effects of calcium and nonphytate phosphorus concentrations on phytase efficacy in broilers chicks. *Poult. Sci*. 84: 1406−1417.

Duke, G. E. 1986. Chapter 11 – Alimentary canal: anatomy, regulation, feeding, and motility. In Colin G. Scanes, Sturkie's avian physiology (4th edition). Cambridge: Academic Press. Pages 269−288.

Duncan, I. J. H., and B. O. Hughes. 1975. Feeding activity and egg formation in hens lit continuously. *Br. Poult. Sci.* 16: 145−155.

Dunn, I. C., D. I. de Koning, H. A. McCormack, R. H. Fleming, P. W. Wilson, B. Andersson, M. Schmutz, C. Benavides, N. Domiguez-Gasca, E. Sanchez-Rodriguez, and A. B. Rodriguez-Navarro. 2021. No evidence that selection for egg production persistency causes loss for bone quality in laying hens. *Genet. Sel. Evol*. 53: 11.

Edwards, N. A., V. Luttrell, and I. Nir. 1976. The secretion and synthesis of albumen by the magnum of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem*. 53: 183−186.

Engelen, A. J., F. C. van der Heeft, P. H. G. Randsdorp, and E. L. C. Smit. 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *Journal of AOAC International* 77: 760−764.

Erben, R. G., and O. Andrukhova. 2017. FGF23-klotho signaling axis in the kidney. *Bone* 100: 62 – 68.

Etches, R. J. 1987. Calcium logistic in the laying hen. *J. Nutr*. 117: 619–628.

Etches, R. J. 1996. Reproduction in poultry. Wallingford: CAB International. 348 pages.

Etches, R. J., H. E. McGregor, T. F. Morris, and J. B. Williams. 1983. Follicular growth and maturation in the domestic hen (*Gallus domesticus*). *J. Reprod. Fert*. 67: 351−358.

Eusemann, B. K., A. R. Sharifi, A. Patt, A. K. Reinhard, L. Schrader, C. Thöne-Reineke, and S. Pettow. 2018. Influence of a sustained release deslorelin acetate implant on reproductive physiology and associated traits in laying hens. *Front. Physiol*. 9: 1846.

Evans, W. J., and A. G. Jr., Pierce. 1982. Interaction of phytic acid with the metal ions, copper (II), cobalt (II), iron (III), magnesium (II), and manganese (II). *J. Food Sci*. 47: 1014−1015.

Fernández, J. A. 1995. Calcium and phosphorus metabolism in growing pigs. II. Simultaneous radio-calcium and radio-phosphorus kinetics. *Livest. Prod. Sci*. 41: 243–254.

Fernandez, S. R., S. Charraga, and E. Avila-Gonzalez. 2019. Evaluation of a new generation phytase on phytate phosphorus release for egg production and tibia strength in hens fed a corn-soybean meal diet. *Poult. Sci*. 98: 2087−2093.

Ferrando, C., P. Vergara, M. Jimenez, and E. Gonalons. 1987. Study of the rate of passage of food with chromium-mordanted plant cells in chickens (*Gallus domesticus*). *Q. J. Exp. Physiol*. 72: 251−259.

Fleming, R. H. 2008. Nutritional factors affecting poultry bone health. *Proc. Nutr. Soc*. 67: 177−183.

Fleming, R. H., H. A. McCormack, and C. C. Whitehead. 1998. Bone structure and strength at different ages in laying hens and effects of dietary particulate limestone, vitamin K and ascorbic acid. *Br. Poult. Sci*. 39: 434−440.

Fleming, R. H., H. A. McCormack, L. McTeir, and C. C. Whitehead. 2006. Relationships between genetic, environmental and nutritional factors influencing osteoporosis in laying hens. *Br. Poult. Sci*. 47: 742 – 755.

Forster, I. C., N. Hernando, J. Bider, and H. Murer. 2013. Phosphate transporters of the SLC20 and SLC34 families. *Mol. Aspects Med*. 34: 386−395.

France Agrimer. 2019. Œufs – fiche filière. https://www.franceagrimer.fr/fam/content/download/66423/document/FICHE%2520FILIERE%2520OEUF%25202021.pdf?version=2.

France, J., J. H. M. Thornley, M. S. Dhanoa, and R. C. Siddons. 1985. On the mathematics of digesta flow kinetics. *J. Theor. Biol*. 113: 743−758.

France, J., J. H. Thornley, and L. Thornley. 1984. Mathematical models in agriculture. Butterworth. London: Butterworths. 335 pages.

Francesch, M., J. Broz, and J. Brufau. 2005. Effects of an experimental phytase on performance, egg quality, tibia ash content and phosphorus bioavailability in laying hens fed on maize- or barley-based diets. *Br. Poult. Sci*. 46: 340−348.

Franco-Jimenez, D. J., and M. M. Beck. 2005. Intestinal calcium uptake, shell quality and reproductive hormones levels of three laying hen varieties after prolonged egg production. *Int. J. Poult. Sci*. 4: 518 – 522.

Gabriel, I., S. Mallet, and M. Leconte. 2003. Differences in the digestive tract characteristics of broiler chickens fed on complete pelleted diet or on whole wheat added to pelleted protein concentrate. *Br. Poult. Sci*. 44: 283−290.

Gao, C. Q., C. Ji, L. H. Zhao, J. Y. Zhang and Q. G. Ma. 2013. Phytase transgenic corn in nutrition of laying hens: residual phytase activity and phytate phosphorus content in the gastrointestinal tract. *Poult. Sci*. 92: 2923− 2929.

Gautron, J., and Y. Nys. 2007. Function of eggshell matrix proteins. In R. Huopalahti, R. López-Fandiño, M. Anton, and R. Schade, Bioactive egg compound. Berlin: Springer. Pages 109−115.

Gautron, J., L. Stapane, N. Le Roy, Y. Nys, A. B. Rodriguez-Navarro, and M. T. Hincke. 2021. Avian eggshell biomineralization: an update on its structure, mineralogy and protein tool kit. *BMC Mol. Biol*. 22:11.

Gautron, J., M. T. Hincke, and Y. Nys. 1997. Precursor matrix proteins in the uterine fluid change with stages of eggshell formation in hens. *Connect. Tissue Res*. 36: 195−210.

Gilani, S., A. Mereu, W. Li, P. W. Plumstead, R. Angel, G. Wilks, and Y. Dersjant-Li. 2022. Global survey of limestone used in poultry diets: calcium content, particle size and solubility. *J. Appl. Anim. Nutr*. 10: 19−30.

Giral, H., Y. Caldas, E. Sutherland, P. Wilson, S. Breusegem, N. Barry, J. Blaine, T. Jiang, X. X. Wang, and M. Levi. 2009. Regulation of rat intestinal Na-dependent phosphate transporters by dietary phosphate. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 297: 1466−1475.

Gloux, A. N., Le Roy, N. Même, M. L. Piketty, D. Prié, G. Benzoni, J. Gautron, Y. Nys, A. Narcy, and M. J. Duclos. 2020*b*. Increased expression of fibroblast growth factor 23 is the signature of a deteriorated Ca/P balance in ageing laying hens. *Sci. Rep*.10: 2124.

Gloux, A., N. Le Roy, A. Brionne, E. Bonin, A. Juanchich, G. Benzoni, M. L. Piketty, D., Prié Y. Nys, J. Gautron, A. Narcy, and M. J. Duclos. 2019. Candidate genes of the transcellular and paracellular calcium absorption pathways in the small intestine of laying hens. *Poult. Sci*. 98: 6005−6018.

Gloux, A., N. Le Roy, J. Ezagal, N. Même, C. Hennequet-Antier, M. L. Piketty, D. Prié, G. Benzoni, J. Gautron, Y. Nys, A. Narcy, and M. J. Duclos. 2020*a*. Possible roles of parathyroid hormone, 1,25$(OH)_2D_3$, and fibroblast growth factor 23 on genes controlling calcium metabolism across different tissues of the laying hen. *Domest. Anim. Endocrinol*. 72: 106407.

Gomez, J. M., and A. Corniaux. 2009. Effet du pouvoir tampon de l'aliment sur les performances zootechniques du poulet et du dindon. 8ème Journées de la Recherche Avicole, Saint-Malo, France, 25−26 mars.

Gordon, R. W., and D. A. Sr. Roland. 1997. The influence of environmental temperature on *in vivo* limestone solubilization, feed passage rate, and gastrointestinal pH in laying hens. *Poult. Sci*. 76: 683−688.

Gosselin, R. E., and E. R. Coghlan. 1953. The stability of complexes between calcium and orthophosphate, polymeric phosphate, and phytate. *Arch. Biochem. Biophys*. 45: 301−311.

Grynspan, F., and M. Cheryan. 1983. Calcium phytate: effect of pH and molar ratio on in vitro solubility. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60: 1761−1764.

Gu, Y. F., Y. P. Chen, R. Jin, C. Wang, C. Wen, and Y. M. Zhou. 2021. A comparison of intestinal integrity, digestive function, and egg quality in laying hens with different ages. *Poult. Sci*. 100: 100949.

Guinotte, F. Efficacité biologique de diverses sources de carbonate de calcium chez la poule pondeuse et le poulet en croissance (*Gallus domesticus*). Rôle de la sécrétion gastrique acide du proventricule dans la solubilisation et l'utilisation digestive de ces sources. Thèse de doctorat, Université Paris Diderot, Paris 7, 1992, 212 pages.

Guinotte, F., and Y. Nys. 1991. Effects of particle size and origin of calcium sources on eggshell quality and bone mineralization in egg laying hens. *Poult. Sci*. 70: 583−592.

Guinotte, F., J. Gautron, A. Soumarmon, J. C. Robert, G. Peranzi, and Y. Nys. 1993. Gastric acid secretion in the chicken: effect of histamine H_2 antagonists and H^+/K^+−ATPase inhibitors on gastro-intestinal pH and of sexual maturity, calcium carbonate level, and particle size on proventricular H^+/K^+−ATPase activity. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol*. 106: 319−327.

Guinotte, F., J. Gautron, Y. Nys, and A. Soumarmon. 1995. Calcium solubilization and retention in the gastrointestinal tract in chicks (*Gallus domesticus*) as a function of gastric acid secretion inhibition and of calcium carbonate particle size. *Br. J. Nutr*. 73: 125−139.

Guo, X. Y., and I. H. Kim. 2012. Impacts of limestone Multi-particle size on production performance, eggshell quality, and egg quality in laying hens. *Asian Austral J. Anim. Sci*.25: 839 – 844.

Hadley, J. A., M. Horvat-Gordon, W. K. Kim, C. A. Praul, D. Burns, and R. M. Jr., Leach. 2016. Bone sialoprotein keratan sulfate proteoglycan (BSP-KSPG) and FGF23 are important physiological components of medullary bone. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol*. 194: 1 – 7.

Halas, V., J. Dijkstra, L. Babinszky, M. W. A. Verstegen, and W. J. J. Gerrits. 2004. Modelling of nutrient partitioning in growing pigs to predict their anatomical body composition. 2-Model evaluation. *Br. J. Nutr.* 92: 725−734.

Halgrain, M., N. Bernardet, M. Crepeau, N. Même, A. Narcy, M. Hincke, and S. Réhault-Godbert. 2022. Eggshell decalcification and skeletal mineralization during the chicken embryonic development: defining candidate genes in the chorioallantoic membrane. *Poult. Sci*. 101: 202622.

Hansen, K. K., R. J. Kittok, G. Sarath, C. F. Toombs, N. Caceres, and M. M. Beck. 2003. Estrogen receptor-α populations change with age in commercial laying hens. *Poult. Sci.* 82: 1624−1629.

Härtel, H. 1990. Evaluation of the dietary interaction of calcium and phosphorus in the high producing laying hen. *Br. Poult. Sci*. 31: 473−494.

Herrea, J., B. Saldana, L. Camara, J. D. Berrosco, and G. G. Mateos. 2018. Influence of grinding size of the main cereal of the diet on egg production and eggs quality of brown egg laying hens from 33 to 65 weeks of age. *Poult. Sci*. 97: 2506 – 2515.

Hervo, F., A. Narcy, Y. Nys, and M.-P. Létourneau-Montminy. 2022. Effect of limestone particle size on performance, eggshell quality, bone strength, and *in vitro/in vivo* solubility in laying hens: A meta-analysis approach. *Poult. Sci*. 101: 101686.

Hervo, F., M.-P. Létourneau-Montminy, N. Même, B. Méda, M. J. Duclos and A., Narcy. 2023. Effect of phytase and limestone particle size on mineral digestibility, performance, eggshell quality and bone mineralization in laying hens. *Poult. Sci*. 102: 102613.

Hetland, H., B. Svihus, and A. Krogdahl. 2003. Effects of oat hulls and wood shavings on digestion in broilers and layers fed diets based on whole or ground wheat. *Br. Poult. Sci*. 44:275−282.

Hetland, H., B. Svihus, and V. Olaisen. 2002. Effect of feeding whole cereals on performance, starch digestibility and duodenal particle size distribution in broiler chickens. *Br. Poult. Sci*. 43: 416−423.

Hetland, H., M. Choct, and B. Svihus. 2004. Role of insoluble non-starch polysaccharides in poultry nutrition. *Wolrds Poult. Sci. J.* 60: 415−422.

Hilmi, H. T. A., A. Surakka, J. Apajahti, and P. E. J. Saris. 2007. Identification of the most abundant *Lactobacillus* species in the crop of 1- and 5-week-old broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol*. 73: 7867−7873.

Hincke, M. T., J. Gautron, Y. Nys, A. B. Rodriguez-Navarro, and M. D. McKee. 2018. The eggshell: structure and protective function. In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Improving the safety and quality of eggs and egg products. Volume 1: Egg chemistry, production and consumption. London: Woodhead Publishing Ltd. Pages 83−132.

Hincke, M. T., Y. Nys, J. Gautron, K. Mann, A. B. Rodriguez-Navarro, and M. D. McKee. 2012. The eggshell: composition and mineralization. *Front. Biosci*. 17: 1266−1280.

Hoenderop, J. G. J., B. Nilius, and R. J. M. Bindels. 2005. Calcium absorption across epithelia. *Physiol. Rev.* 85: 373−422.

Hudson, H. A., W. M. Britton, G. N. Rowland, and R. J. Buhr. 1993. Histomorphometric bone properties of sexually immature and mature White Leghorn hens with evaluation of fluorochrome injection in egg production traits. *Poult. Sci*. 72: 1537−1547.

Hughes, A. L., J. P. Dahiya, C. L. Wyatt, and H. L. Classen. 2009. Effect of Quantum phytase on nutrient digestibility and bone ash in White Leghorn laying hens fed corn-soybean meal-based diets. *Poult. Sci*. 88: 1191−1198.

Hughes, B. O. 1972. A circadian rhythm of calcium intake in the domestic fowl. *Br. Poult. Sci*. 13: 485−493.

Humer, E., C. Schwarz, and K. Schedle. 2015. Phytate in pig and poultry nutrition. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr*. 99: 605−625.

Hurwitz, S. 1964. Bone composition and Ca^{45} retention in fowl as influenced by egg formation. *Am. J. Physiol*. 206: 198−204.

Hurwitz, S. 1989. Calcium homeostasis in birds. *Vitam. Horm*. 45: 173−221.

Hurwitz, S. 1996. Homeostatic control of plasma calcium concentration. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. 31: 41−100.

Hurwitz, S., A. Bar, and I. Cohen. 1973. Regulation of calcium absorption by fowl intestine. *Am. J. Physiol*. 225: 150−154.

Hurwitz, S., and A. Bar, 1966. Rate of passage of calcium-45 and yttrium-91 along the intestine, and calcium absorption in the laying fowl. *J. Nutr*. 89: 311−316.

Hurwitz, S., and A. Bar. 1965. Absorption of calcium and phosphorus along the gastrointestinal tract of the laying fowl as influenced by dietary calcium and eggshell formation. *J. Nutr*. 65: 433−438.

Hurwitz, S., and A. Bar. 1968. Activity, concentration, and lumen-blood electrochemical potential difference of calcium in the intestine of the laying hen. *J. Nutr.* 95: 647−654.

Hurwitz, S., and A. Bar. 1969. Intestinal calcium absorption in the laying fowl and its importance in calcium homeostasis. Am. *J. Clin. Nutr*. 22: 391−395.

Hurwitz, S., and A. Bar. 1971. Calcium and phosphorus interrelationships in the intestine of the fowl. *J. Nutr*. 101: 677−686.

Hurwitz, S., and A. Bar. 1972. Site of vitamin D action in chick intestine. *Am. J. Physiol*. 222: 761−767.

Hy-Line International. 2020. Hy-Line W36 commercial layers. Management guide. https://www.hyline.com/filesimages/Hy-Line-Products/Hy-Line-Product-PDFs/W-36/36%20COM%20ENG.pdf.

Incken, W., D. Cavero, M. Schmutz, and R. Preisinger. 2012. New phenotypes for new breeding goals in layers. *Worlds Poult. Sci. J*. 68: 387−400.

INRA-CIRAD-AFZ. 2017. Tables INRAE-CIRAD-AFZ – Composition et valeurs nutritionnelles des matières premières pour bovins, ovins, caprins, porcs, volailles, chevaux, lapins et salmonidés. https://feedtables.com/fr.

ITAVI. 2017. Performances techniques et coûts de production en poulettes et poules pondeuses – Résultats 2017. https://www.itavi.asso.fr/publications/performances-techniques-et-couts-de-production-en-poulettes-et-pondeuses-resultats-2017.

Jalal, M. A., and S. E. Scheideler. 2001. Effect of supplementation of two different sources of phytase on egg production parameters in laying hens and nutrient digestibility. *Poult. Sci*. 80: 1463−1471.

Jansen, S., U. Baulain, C. Habig, A. Weigend, I. Halle, A. M. Scholz, H. Simianer, A. R. Sharifi, and S. Weigend. 2020. Relationship between bone stability and egg production in genetically divergent chicken layer lines. *Animals* 10: 850.

Jardim-Filho, R. de M., J. H. Stringhini, M. B. Cafée, N. S. M. Leandro, W. C. P. da Cunha, and O. Jr. Nascimento. 2005*a*. The influence of limestone source and particles sizes on performance and eggshell quality of commercial laying hen. *Acta Sci. Anim. Sci*.27: 35 – 41.

Jardim-Filho, R. M., J. H. Stringhini, M. B. Café, M. A. Andrade, M. I. Sakamoto, and J. R. Franco. 2005*b*. Influence of limestone source and particle size on the density, strength and mineral content of laying hen's tibia bone. *Acta Sci. Anim. Sci*.27: 23 – 28.

Javadi, M., J. J. Pascual, M. Cambra-Lopez, J. Macias-Vidal, A. Donadeu, J. Dupuy, L. Carpintero, P. Ferrer, and A. Cerisuelo. 2021. Effect of dietary mineral content and phytase dose on nutrient utilization, performance, egg traits and bone mineralization in laying hens from 22 to 31 weeks of age. *Animals* 11: 1495.

Jimenez-Moreno, E., J. M. Gonzlaez-Alvarado, R. Lazaro, and G. G. Mateos. 2009. Effects of type of cereal, heat processing of the cereals, and fiber inclusion in the diet on the gizzard pH and nutrient utilization in broilers at different ages. *Poult. Sci*. 88: 1925 – 1933.

Jing, M., S. Zhao, A. Rogiewicz, B. A. Slominski, and J. D. House. 2018. Assessment of the minimal available phosphorus needs of laying hens: implications for phosphorus management strategies. *Poult. Sci*. 97: 2400−2410.

Jing, M., S. Zhao, A. Rogiewoicz, B. A. Slominski, and J. D. House. 2021. Effects of phytase supplementation on production performance, egg and bone quality, plasma biochemistry and mineral excretion of layers fed varying levels of phosphorus. *Animal* 15: 100010.

Johnston, S. A., and R. M. Gous. 2003. An improved mathematical model of the ovulatory cycle of the laying hen. *Br. Poult. Sci*. 44: 752−760.

Johnston, S. A., and R. M. Gous. 2007. Modelling the changes in the proportions of the egg components during a laying cycle. *Br. Poult. Sci*. 48: 347−353.

Jonchère, V., A. Brionne, J. Gautron, and Y. Nys. 2012. Identification of uterine ion transporters for mineralisation precursors of the avian eggshell. *BMC Physiol*. 12: 10.

Jongbloed, A. W., P. A. Kemme, G. De Groote, M. Lippens, and F. Meschy. 2002. Bioavailability of Major and Trace Minerals. International Association of the European Manufacturers of Major, Trace and Specific Feed Mineral Materials (EMFEMA), Brussels, Belgium.

Karbach, U. 1992. Paracellular calcium transport across the small intestine. *J. Nutr.* 122 (suppl. 3): 672−677.

Katai, K., K. Miyamoto, S. Kishida, H. Segawa, T. Nii, H. Tanaka, Y. Tani, H. Arai, S. Tatsumi, K. Morita, Y. Taketani, and E. Takeda. 1999. Regulation of intestinal Na^+−dependent phosphate co-transporters by a low-phosphate diet and 1,25-dihydroxyvitamin D_3. *Biochem. J*. 343: 705−712.

Kebreab, E., J. France, R. P. Kwakkel, S. Leeson, H. Darmani Kuhi, and J. Dijkstrat. 2009. Development and evaluation of a dynamic model of calcium and phosphorus flows in layers. *Poult. Sci*. 88: 680−689.

Kemme, P. A., U. Sxhlemmer, Z. Mroz, and A. W. Jongbloed. 2006. Monitoring the stepwise phytate degradation in the upper gastrointestinal tract of pigs. *J. Sci. Food Agric*. 86: 612−622.

Kerschnitzki, M., T. Zander, P. Zalansky, P. Fratzl, R. Shahar, and W. Wagermaier. 2014. Rapid alterations of avian medullary bone material during the daily egg-laying cycle. *Bone* 69: 109−117.

Keshavarz, K. 1998. Investigation on the possibility of reducing protein, phosphorus and calcium requirements of laying hens by manipulation of time of access to these nutrients. *Poult. Sci*. 77: 1320–1332.

Keshavarz, K. 2000. Nonphytate phosphorus requirement of laying hens with and without phytase on a phase feeding program. *Poult. Sci*. 79: 748−763.

Keshavarz, K., and R. E. Austic. 1990. Effect of dietary minerals an acid-base balance and eggshell quality in chickens. *J. Nutr*. 120: 1360 – 1369.

Kheravii, S., R. A. Swick, M. Choct and S. B. Wu. 2018. Upregulation of genes encoding digestive enzymes and nutrient transporters in the digestive system of broiler chickens by dietary supplementation of fiber and inclusion of coarse particle size corn. *BMC Genomics* 19: 208.

Kies, A. K., L. H. de Jonge, P. A. Kemme, and A. W. Jongbloed. 2006. Interaction between protein, phytate, and microbial phytase. *In vitro* studies. *J. Agric. Food Chem*. 54: 1753−1758.

Kim, S. W., W. Li, R. Angel, and M. Proszkowiec-Welgraz. 2018. Effects of limestone particle size and dietary Ca concentration on apparent P and Ca digestibility in the presence or absence of phytase. *Poult. Sci*. 97: 4306−4314.

Kim, S. W., W. Li, R. Angel, and P. W. Plumstead. 2019. Modification of a limestone solubility method and potential to correlate with *in vivo* limestone calcium digestibility. *Poult. Sci*. 98: 6837−6848.

Kim, W. K., B. C. Ford, A. D. Mitchell, R. G. Elkin and R. M. Jr., Leach. 2004. Comparative assessment of bone among wildtype, restricted ovulator and out-of-production hens. *Br. Poult. Sci*. 45: 463−470.

Kim, W. K., L. M. Donalson, P. Herrera, L. F. Kubena, D. J. Nisbet, and S. C. Ricke. 2005. Comparisons of molting diets on skeletal quality and eggshell parameters in hens at the end of the second egg-laying cycle. *Poult. Sci.* 84: 522−527.

Kim, W. K., S. A. Bloomfield, T. Sugiyama, and S. C. Ricke. 2012. Concepts and method for understanding bone metabolism in laying hens. *Worlds Poult. Sci. J*. 68: 71−82.

Kornegay, E. T., J. S. Radcliffe, and D. M. Denbow. 1996. Influence of Natuphos phytase on calcium bioavailability in plant ingredients and development of calcium equivalency

values for swine and poultry. In M. B. Coehlo and E. T. Kornegay, Animal Nutrition and Waste Management. Mount Olive: BASF Corporation. Pages 419–434.

Koutoulis, K. V., I. Kyriazakis, G. C. Perry, and P. D. Lewis. 2009. Effect of different calcium sources and calcium intake on shell quality and bone characteristics of laying hens at sexual maturity and end of lay. *Int. J. Poult. Sci*. 8: 342−348.

Kumar, V., A. Miasnikov, J. S. Sands and P. H. Simmins. 2003. *In vitro* activities of three phytases under different pH and protease challenges. Manipulating Pig Production: 164.

Kwakkel, R. P. Multiphasic growth in the layer pullet: effects of nutrient restrictions during rearing. Thèse de doctorat, Université de Wageningen, 1994, 190 pages.

Lautrou, M., A. Narcy, J.-Y. Dourmad, C. Pomar, P. Schmidely, and M.-P. Létourneau-Montminy. 2021. Dietary phosphorus and calcium utilization in growing pigs: requirements and improvements. *Front. Vet. Sci*. 8: 734365.

Lawlor, P. G., P. B. Lynch, P. J. Caffrey, J. J. O'Reilly, and M. K. O'Connell. 2005. Measurements of the acid-binding capacity of ingredients used in pig diets. *Ir. Vet. J*. 58: 447−452.

Le Noë, J., N. Roux, G. Billen, S. Gingrixh, K.-H. Erb, F. Krausmann, V. thieu, M. Silvestre, and J. Garnier. 2020. The phosphorus legacy offers opportunities for agro-ecological transition (France 1850–2075). *Environ. Res. Lett.* 15: 064022.

Lee, S. A., E. Febery, T. Mottram, and M. R. Bedford. 2021. Growth performance, real-time gizzard pH and calcium solubility in the gut of broiler chickens is dependent on the interaction between dietary calcium concentration and limestone particle size. *Br. Poult. Sci*. 62: 827−834.

Lee, S. A., J. Dunne, E. Febery, C. A. Brearley, T. Mottram, and M. R. Bedford. 2018. Exogenous phytase and xylanase exhibit opposing effects on real-time gizzard pH in broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 59: 568−578.

Lee, S. A., J. Dunne, T. Mottram, and M. R. Bedford. 2017. Effect of diet phase change, dietary Ca and P level and phytase on bird performance and real-time gizzard pH measurements. *Br. Poult. Sci*. 58: 290−297.

Lei, X. G., and C. H. Stahl. 2010.Biotechnological development of effective phytase for mineral nutrition and environmental protection. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 57: 474−481.

Len, L., J. Zhang, S. Xu, Q. Xiong, X. Xu, J. Li, and H. Huang. 2019. Meat & bone meal (MBM) incineration ash for phosphate removal from wastewater and afterward phosphorus recovery. *J. Clean. Prod*. 238: 117960.

Létourneau-Montminy, M.-P. Modélisation du métabolisme phosphocalcique chez le porc et le poulet en croissance. Thèse de doctorat, Université Laval, Québec, 2009, 300 pages.

Létourneau-Montminy, M.-P., A. Narcy, J. Y. Dourmad, T. D. Crenshaw, and C. Pomar. 2015. Modeling the metabolic fate of dietary phosphorus and calcium and the dynamics of body ash content in growing pigs. J. *Anim. Sci.* 93: 1200−1217.

Létourneau-Montminy, M.-P., A. Narcy, P. Lescoat, M. Magnin, J. F. Bernier, D. Sauvant, C. Joindreville, and C. Pomar. 2011. Modeling the fate of dietary phosphorus in the digestive tract of growing pigs. *J. Anim. Sci*. 89: 3596−3611.

Levin, V. A., X. Jiang, and R. Kagan. 2018. Estrogen therapy for osteoporosis in the modern era. *Osteoporos. Int.* 29: 1049−1055.

Li, J., X. Ananthapanyasut, and A. S. L. Yu. 2011. Claudins in renal physiology and disease. *Pediatr. Nephrol*. 26: 2133−2142.

Li, P., R. Wang, H. Jiao, X. Wang, J. Zhao, and H. Lin. 2018. Effects of dietary phosphorus level on the expression of calcium and phosphorus transporter in laying hens. *Front. Physiol*. 9: 627.

Li, W., R. Angel, P. W. Plumstead, and H. Enting. 2021. Effects of limestone particle size, phytate, calcium source, and phytase on standardized ileal calcium and phosphorus digestibility in broilers. *Poult. Sci*. 100: 900−909.

Li, X., D. Zhang, and W. L. Bryden. 2017.Calcium and phosphorus metabolism and nutrition of poultry: are current diets formulated in excess? *Anim. Prod. Sci*. 57: 2304−2310.

Lim, H. S., H. Namkung, and I. K. Paik. 2003. Effects of phytase supplementation on the performance, egg quality, and phosphorus excretion of laying hens fed different levels of dietary calcium and nonphytate phosphorus. *Poult. Sci*. 82: 92−99.

Liu, N., G. H. Liu, F. D. Li, J. S. Sands, S. Zhang, A. J. Zheng, and Y. J. Ru. 2007. Efficacy of phytases on egg production and nutrient digestibility in layers fed reduced phosphorus diets. *Poult. Sci*. 86: 2337−2342.

Liu, S. B., Y. X. Hu, X. D. Liao, L. Lu, S. F. Li, L. Y. Zhang, H. Z. Tan, L. Yang, H. Q. Suo, and X. G. Luo. 2016. Kinetics of phosphorus absorption in ligated small intestinal segments of broilers. *J. Anim. Sci*. 94: 3312−3320.

Liu, X., X. Lin, Y. Mi, J. Li, and C. Zhang. 2018*b*. Grape seed proanthocyanidin extract prevents ovarian aging by inhibiting oxidative stress in the hens. *Oxid. Med. Cell. Longev*. 9: 9390810.

Liu, X., X. Lin, Y. Mi, W. Zeng, and C. Zhang. 2018*a*. Age-related changes of yolk precursor formation in the liver of laying hens. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 19: 390−399.

Lobaugh, B., I. C. Joshua, and W. J. Mueller. 1981. Regulation of calcium appetite in broiler chickens. *J. Nutr.* 111: 298−306.

Lohmann Breeders. 2019.Lohmann Trdation layers – Management guide. Cage housing. https://lohmann-breeders.com/files/downloads/MG/Cage/LB_MG_Cage_Tradition_FR.pdf.

Lott, J. N. A., I. Ockenden, V. Raboy, and G. D. Batten. 2000. Phytic acid and phosphorus in crop seeds and fruits: a global estimate. *Seed Sci. Res*. 10: 11−33.

Lukic, M., Z. Pavlovski, Z. Skrbic, Z. Jokic, D. Vitorovic, and V. Petricevic. 2009. Possibility of preventing short term calcium deficit by using large marble particles in nutrition of young laying hens. *Arch. Zootech*.12: 22 – 36.

Macha, I. J., U. Boonyang, S. Cazalbou, B. Ben-Nissan, C. Charvillat, F. N. Oktar, and D. Grossin. 2015. Comparative study of coral conversion, part 2: microstructural evolution of calcium phosphate. *J. Aust. Ceram. Soc.* 51: 149−159.

Maenz, D. D. and H. L. Classen. 1998. Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. *Poult. Sci.* 77: 557−563.

Maenz, D. D., C. M. Engele-Schaan, R. W. Newkirk, and H. L Classen. 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. *Anim. Feed Sci. Technol*. 81: 177−192.

Magdelaine, P. 2011. Egg and egg product production and consumption in Europe and the rest of the world. In Y. Nys, M. Bain, and F. van Immersel, Improving the safety and quality

of eggs and egg products. Volume 1: egg chemistry, production and consumption. London: Woodhead Publishing Limited. Pages 3−16.

Mahdavi Sadati, M. S., V. Rezaeipour, and R. Abdullahpour. 2019. Efficacy of whole wheat grain in combination with acidified drinking water on growth performance, gizzard development, intestinal morphology, and microbial population of broiler chickens. *Livest. Sci*. 259: 104911.

Majeed, S., R. Qudsieh, F. W. Edens, and J. Brake. 2020. Limestone particle size, calcium and phosphorus levels, and phytase effects on live performance and nutrients digestibility of broilers. *Poult. Sci*. 99: 1502−1514.

Manangi, M. K., and C. N. Coon. 2007. The effect of calcium carbonate particle size and solubility on the utilization of phosphorus from phytase for broilers. *Int. J. Poult. Sci*. 6: 85−90.

Manangi, M. K., P. Maharjan, and C. N. Coon. 2018. Calcium particle size effects on plasma, excreta, and urinary Ca and P changes in broiler breeder hens. *Poult. Sci*. 97: 2798−2806.

Mann, K. 2008. Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane. *Proteomics* 8: 2322−2332.

Marini, M. A., W. J. Evans, and N. M. Morris. 1985. Calorimetric and potentiometric studies on the binding of calcium by phytic acid. *J. Appl. Biochem*. 7: 180–191.

Marks, J., G. J. Lee, S. P. Nadaraja, E. S. Debnam, and R. J. Unwin. 2015. Experimental and regional variations in Na^+−dependent and Na^+−independent phosphate transport along the rat small intestine and colon. *Physiol. Rep*. 3: e12281.

Marounek, M., M. Skrivan, O. Rosero, and O. Rop. 2010. Intestinal and total tract phytate digestibility and phytase activity in the digestive tract of hens fed a wheat-maize-soyabean diet. *J. Anim. Feed Sci*. 19: 430−439.

Martinez-Rojas, I. Y., E. A. Gonzalez, J. A. Menocal, T. T. Dos Santos, J. R. Arguello, and C. L. Coello. 2018. Assessment of a phytase included with lactic acid on productive parameters and on deposition of phosphorus, calcium, and zinc in laying hens fed with sorghum–soybean-meal-based diets. *J. Appl. Anim. Res*. 46: 314−321.

Menezes-Blackburn, D., S. Gabler, and R. Greiner. 2015. Performance of seven commercial phytases in an *in vitro* simulation of poultry digestive tract. *J. Agric. Food Chem*. 63: 6142–6149.

Metzler, B. U., R. Mosenthin, T. Baumgärtel and M. Rodehutscord. 2009. Effects of fermentable carbohydrates and low dietary phosphorus supply on the chemical composition of fecal bacteria and microbial metabolites in the gastrointestinal tract of pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr*. 93: 130−139.

Meyer, G. B., S. W. Babcock, and M. L. Sunde. 1970. Decreased feed consumption and increased calcium intake associated with pullet's first egg. *Poult. Sci*. 49: 1164−1169.

Miles, R. D., and R. H. Harms. 1982. Relationship between egg specific gravity and plasma phosphorus from hens fed different dietary calcium, phosphorus and sodium level. *Poult. Sci*. 61: 175 – 177.

Molnar, A., L. Maertens, B. Ampe, J. Buyse, J. Zoons, and E. Deleize. 2018. Effect of different split-feeding treatments on performance, egg quality, and bone quality of individually housed aged laying hens. *Poult. Sci*. 97: 88−101.

Mongin, P. 1976. Composition of crop and gizzard contents in the laying hen. *Br. Poult. Sci*. 17: 499−507.

Mongin, P. 1978. Acid-Base balance during eggshell formation. Satellite Symposium of the 27th International Congress of Physiological Sciences, Göttingen, Germany,28–30.

Mongin, P., and B. Sauveur. 1974. Voluntary food and calcium intake by the laying hen. *Br. Poult. Sci*. 15: 349−359.

Mongin, P., and L. Lacassagne. 1966. Equilibre acido-basique du sang et formation de la coquille de l'œuf. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys*. 6 : 93−100.

Moore, S. J. 1999. Food breakdown in an avian herbivore; who needs teeth? *Aust. J. Zool.* 47: 625–632.

Moran, E. T. Jr. 1982. Small intestine – liver – pancreas complex. In E.T. Moran, Comparative nutrition of fowl and swine. The gastrointestinal system. Guelp: Office for Educational Practice, University of Guelph. Pages 87−176.

Moreau, T., J. Gautron, M. T. Hincke, P. Monget, S. Réhault-Godbert, and N. Guyot. 2022. Antimicrobial proteins and peptides in avian eggshell: structural diversity and potential roles in biomineralization. *Front. Immunol*. 13: 946428.

Mussini, F., J. Wilson, J. Remus, L. Kim, and M. Hruby. 2019. Evaluation of different limestone sources used by the US poultry feed industry. International Production and Processing Expo, Atlanta, USA, 12−14 February.

Narvaez-Solarte, W., H. S. Rostagno, P. R. Soares, L. F. Ubi-Velasquez, and M. A. Silva. 2006. Nutritional requirement of calcium in white laying hens from 46 to 62 wk of age. *Int. J. Poult. Sci*. 5: 181−184.

National Research Council. 1994. Nutrient Requirements of Poultry: Ninth Revised Edition. Washington, DC: The National Academies Press. 173 pages.

Navikis, R. J., B. S. Katzenellenbogen, and A. V. Nalbandov. 1979. Effects of the sex steroid hormones and vitamin D_3 on calcium-binding proteins in the chick shell gland. *Biol. Reprod.*21: 1153 – 1162.

Neset, T. S., and D. Cordell. 2011. Global phosphorus scarcity: identifying synergies for a sustainable future. *J. Sci. Food. Agric*. 92: 2−6.

Nie, W., Y. Yang, J. Yuan, Z. Wang, and Y. Guo. 2013. Effect of dietary nonphytate phosphorus on laying performance and small intestinal epithelial phosphate transporter expression in Dwarf pink-shell laying hens. *J. Anim. Sci. Biotech*. 4: 34.

Nolan, K. B., and P. A. Duffin. 1987. Effects of phytate on mineral bioavailability. In vitro studies on Mg^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{3+}, Cu^{2+}, and Zn^{2+} (also CD^{2+}) solubilities in the presence of phytate. *J. Sci. Food Agric*. 40: 79−85.

Novogen. 2020. Guide d'élevage des pondeuses commerciales – NOVOgen BROWN. https://www.novoponte.fr/wp-content/uploads/2019/03/Guide-Elevage-NovoBrown.pdf.

Nys, Y, and N. Guoyt. 2011. Egg formation and chemistry. In Y. Nys, M. Bain, and F. van Immersel, Improving the safety and quality of eggs and egg products. Volume 1: egg chemistry, production and consumption. London: Woodhead Publishing Limited. Pages 151−182.

Nys, Y. 2017. Chapter 2 – Laying hen nutrition: optimising hen performance and heath, bone and eggshell quality. In J. Roberts, Achieving sustainable production of eggs, Volume 2: animal welfare and sustainability (1st edition). Cambridge: Burleigh Dodds Science Publishing Limited. Pages 47−74.

Nys, Y. Régulation endocrinienne du métabolisme calcique chez la poule et calcification de la coquille. Thèse Doctorat, Université Paris Diderot, Paris 7, 1990, 109 pages.

Nys, Y., and M. C. Cabrera-Saadoun. 1986. Daily changes in acid secretion, intestinal soluble calcium and study on carbonic anhydrase activity in pullets and laying hens laying shell-less or calcified eggs. In World's Poultry Science Association, VIIth European Poultry Conference. Paris: World's Poultry Science Association - French branch. Pages 1037−1041.

Nys, Y., and N. Le Roy. 2018. Chapter 22: Calcium homeostasis and eggshell biomineralization in female chicken. In Feldman D, Vitamin D. Volume 1: Biochemistry, Physiology, and Diagnostics (4th edition). London: Academic Press. Pages 361−382.

Nys, Y., and P. Mongin. 1980. Jejunal calcium permeability in laying hens during egg formation. *Reprod. Nutr. Développ*. 20: 155−161.

Nys, Y., and P. Mongin. 1982. Transport of electrolytes and water in the upper jejunum of the fowl *in vivo* perfusion. *Pflügers Arch*. 392: 251−256.

Nys, Y., B. Sauveur, L. Lacassagne, and P. Mongin. 1976. Food, calcium and water intakes by hens lit continuously from hatching. *Br. Poult. Sci*. 17: 351−358.

Nys, Y., K. Baker, R. Bouillon, H. van Baelen, and D. E. M. Lawson. 1992. Regulation of calbindin D 28K and its mRNA in the intestine of the domestic hen. *Gen. Comp. Endocr*. 86: 460−468.

Nys, Y., M. T. Hincke, A. Hernandez-Hernandez, A. B. Rodriguez-Navarro, J. Gomez-Morales, V. Jonchère, J. M. Garcia-Ruiz, and J. Gautron. 2010. Structure, propriétés et minéralisation de la coquille de l'œuf : rôle de la matrice organique dans le contrôle de sa fabrication. *INRA Prod. Anim*. 23 : 143−154.

Nys, Y., M. T. Hincke, J. L. Arias, J. M. Garcia-Ruiz, and S. E. Solomon. 1999. Avian eggshell mineralization. *Poult. Avian Biol. Re.* 10: 143−166.

Nys., Y., and J. Gautron. 2007. Chapter 15: Structure and formation of the eggshell. In R. Huopalahti, R. López-Fandiño, M. Anton, and R. Schade, Bioactive egg compound. Berlin: Springer. Pages 99−102.

ONU. 2022. Populations. https://www.un.org/fr/global-issues/population#.

Orskov, E. R., and I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighed according to rate of passage. *J. Agric. Sci*. 92: 499−503.

Ousterhout, L. E. 1980. Effects of calcium and phosphorus levels on egg weight and egg shell quality in laying hens. *Poult. Sci.* 59: 1480−1484.

Panda, A. K., S. V. Rama-Rao, M. V. L. N. Raju, and S. K. Bhanja. 2005. Effect of microbial phytase on production performance of White Leghorn layers fed on a diet low in non-phytate phosphorus. *Br. Poult. Sci*. 46: 464−469.

Parsons, A. H., and G. F. Jr. Combs. 1981. Blood ionized calcium cycles in chicken. *Poult. Sci*. 60: 1520−1524.

Pinheiro, J., D. Bates, S. DebRoy, D. Sarkar, and R Core Team. 2015. nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R package, version 3.1–117.

Pointillart, A. 1994. Phytates, phytases : leur importance dans l'alimentation des monogastriques. *INRA Prod. Anim*. 7 : 29−39.

Pongmanee, K., I. Kühn, and D. R. Korver. 2020. Effects of phytase supplementation on eggshell and bone quality, and phosphorus and calcium digestibility in laying hens from 25 to 37 wk of age. *Poult. Sci*. 99: 2595−2607.

Poudel, I., C. D. McDaniel, M. W. Shilling, D. Pflugrath, and P. A. Adhikari. 2022. Role of conventional and split feeding of various limestone particle size ratios on the performance and egg quality of Hy-Line® W-36 hens in the late production phase. *Anim. Feed Sci. Technol*. 283: 115153.

Proszkowiec-Welgraz, M., and R. Angel. 2013. Calcium and phosphorus metabolism in broilers: effect of homeostatic mechanism on calcium and phosphorus digestibility. *J. Appl. Poult. Res*. 22: 609−627.

Punna, S., and D. A. Sr. Roland. 1999. Influence of supplemental microbial phytase on first cycle laying hens fed phosphorus-deficient diets from day one of age. *Poult. Sci.* 78: 1407−1411.

Rama Rao, S. V., A. K. Panda, M. V. L. N. Raju, G. Shyam Sunder, and N. K. Praharaj. 2003. Requirement of calcium of commercial broilers and white leghorn layers at low dietary phosphorus levels. *Anim. Feed Sci. Technol.* 106: 199−208.

Rao, K. S., and D. A. Sr. Roland. 1989. Influence of dietary calcium level and particle size of calcium source on *in vivo* calcium solubilization by commercial Leghorns. *Poult. Sci*. 68: 1499−1505.

Rao, K. S., and D. A. Sr. Roland. 1990. *In vivo* limestone solubilization in commercial Leghorns: role of dietary calcium levels, limestone particle size, *in vitro* limestone solubility rate, and the calcium status of the hen. *Poult. Sci*. 69: 2170−2176.

Rao, K. S., D. A. Sr. Roland, J. L. Adams, and W. M. Durboraw. 1992. Improved retention in the gizzard of commercial Leghorn hens. *J. Appl. Poult. Res*. 1: 6−10.

Rao, S. K., D. A. Sr. Roland, and W. R. Gordon. 1995. A method to determine and factors that influence in vivo solubilization of phosphates in commercial leghorn hens. *Poult. Sci*. 74: 1644−1649.

Rath, N. C., G. R. Ruff, W. E. Huff, and J. M. Balog. 2000. Factors Regulating bone maturity and strength in poultry. *Poult. Sci*. 79: 1024–1032.

Ravindran, V., L. S. David, M. R. Abdollahi, and M. R. Bedford. 2021. True ileal calcium digestibility in soybean meal and canola meal, and true ileal phosphorus digestibility in maize-soybean meal and maize-canola meal diets, without and with phytase, for broiler growers and finishers. *Br. Poult. Sci*. 62: 293−303.

REA. 2021. Guide de référence du Règlement sur les exploitations agricoles (L.R.Q., c. Q-2, r. 26). Québec : Ministère de l'environnement et de la lutte contre les changements climatiques. 180 pages.

Ren, Z., M. Ebrahimi, D. E. Bütz, J. M. Sand, K. Zhang, and M. E. Cook. 2017. Antibody to fibroblast growth factor 23-peptide reduces excreta phosphorus of laying hens. *Poult Sci*. 96: 127 – 134.

Roche, M, and J. Decerprit. 1977. Contrôles hormonal et nerveux de la motricité du tractus digestif de la poule. *Ann. Res. Vet*. 8 : 25−40.

Roche, M., and J. L. Martinoli. 1974. Motricité gastro-intestinale chez le poulet. *Ann. Rech. Vet*. 5 : 295−309.

Roche, M., M. Salimi, and F. Shakeri. 1979. Corrélations matrices gastro-intestinales chez la poule pondeuse. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys*. 19 : 895−898.

Rodehutscord, M., F. Sanver, and R. Timmler. 2002. Comparative study on the effect of variable phosphorus intake at two different calcium levels on P excretion and P flow at the terminal ileum of laying hens. *Arch. Tierernahr*. 56: 189−198.

Rodehutscord, M., V. Sommerfeld, C. R. Angel, and D. R. Korver. 2023. Minimum phosphorus requirements for laying hen feed formulations. *Poult. Sci.* 102: 102344.

Rodriguez-Navarro, A. B., H. M. McCormack, R. H. Fleming, P. Alvarez-Loret, J. Romero-Pastor, N. Dominguez-Gasca, T. Prozorov, and I. C. Dun. 2018. Influence of physical activity on tibial bone material properties in laying hens. *J. Struct. Biol*. 201: 36−45.

Rodriguez-Navarro, A., O. Kalin, Y. Nys, and J. M. Garcia-Ruiz. 2012. Influence of the microstructure on the shell strength of eggs laid by hens of different ages. *Br. Poult. Sci*. 43: 395−403.

Roland D. A. Sr., and Harms R. H. 1973. Calcium metabolism in the laying hen. 5 – Effect of various sources and sizes of calcium carbonate on shell quality. *Poult. Sci*. 52: 369−372.

Roland D. A. Sr., D. R. Sloan, and R. H. Harms. 1972. Calcium metabolism in the laying hen. 1 – Calcium retention in the digestive tract of the laying hen. *Poult. Sci*. 51: 598−601.

Roland, D. A. Sr., and R. H. Harms. 1976. The influence of feeding diets containing different calcium-phosphorus ratios on the laying hen. *Poult. Sci*. 55: 637−641.

Rousseau, X., M.-P. Létourneau-Montminy, N. Même, M. Magnin, Y. Nys, and A. Narcy. 2012. Phosphorus utilization in finishing broiler chickens: effects of dietary calcium and microbial phytase. *Poult. Sci*. 91: 2829−2837.

Rousseau, X., N. Même, M. Magnin, Y. Nys, and A. Narcy. 2011. Méta-analyse de l'utilisation de phosphore alimentaire par le poulet de chair en phase de finition : effet de l'apport de

calcium et de phytase microbienne. 9ème Journées de la Recherche Avicole, Tours, France, 29−30 mars.

Ruoff, H. J., and K. F. Sewing. 1971. The role of crop in the control gastric acid secretion in chickens. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol*. 271: 242 – 248.

Rutherfurd, S. M., T. K. Chung, and P. J. Moughan. 2002. The effect of microbial phytase on ileal phosphorus and amino acid digestibility in the broiler chicken. *Br. Poult. Sci*. 43: 598−606.

Rutherfurd, S. M., T. K. Chung, P. C. Morel, and P. J. Moughan. 2004. Effect of microbial phytase on ileal digestibility of phytate phosphorus, total phosphorus, and amino acids in a low-phosphorus diet for broilers. *Poult. Sci*. 83: 61−68.

Sabbagh, Y., S. P. O'Brien, W. Song, J. H. Boulanger, A. Stockmann, C. Arbeeny, and S. C. Schiavi. 2009. Intestinal Npt2b plays a major role in phosphate absorption and homeostasis. *J. Am. Soc. Nephrol*. 20: 2348−2358.

Sadati, M. S. M., V. Rezaeipour, and R. Abdullahpour. 2022. Efficacy of whole wheat grain in combination with acidified drinking water on growth performance, gizzard development, intestinal morphology, and microbial population of broiler chickens. *Livest. Sci*. 259; 104911.

Sah, N., and B. Mishra. 2018. Regulation of egg formation in the oviduct of laying hen. *Worlds Poult. Sci. J.* 74: 1−13.

Saki, A., A. Rahmani, and A. Yousefi. 2019. Calcium particle size and feeding time influence eggshell quality in laying hens. *Acta Sci*. 41: e42926.

Sales, J., and G. P. J. Janssens. 2003. The use of markers to determine energy metabolizability and nutrient digestibility in avian species. *Worlds Poult. Sci. J*. 59: 314−327.

Samiullah, S., and J. R. Roberts. 2014. The eggshell cuticle of the laying hen. *Worlds Poult. Sci. J*. 70: 693−708.

San, J., Z. Zhang, S. Bu, M. Zhang, J. Hu, J. Yang, and G. Wu. 2021. Changes in duodenal and nephritic Ca and P absorption in hens during different egg-laying periods. *Heliyon*: e06081.

Saunders-Blades, J. L., J. L. McIsaac, D. R. Korver, and D. M. Anderson. 2009. The effect of calcium source and particle size on the production performance and bone quality of laying hens. *Poult. Sci*. 88: 338 – 353.

Saurette, M., and R. T. Alexander. 2019. Intestinal phosphate absorption: The paracellular pathway predominates? *Exp. Biol. Med*. 244: 646−654.

Sauvant, D. 1992. La modélisation systémique en nutrition. *Reprod. Nutr*. Dev. 32 : 217−230.

Sauvant, D., J. M. Perez, and G. Tran. 2004. Tables of Composition and Nutritional Value of Feed Materials. Institut National de la Recherche Agronomique, Association Française de Zootechnie, Paris, France

Sauvant, D., P. Schmidely, J. J. Daudin, and N. R. St-Pierre. 2008. Meta-analyses of experimental data in animal nutrition. *Animal* 2: 1203−1214.

Sauveur B., and P. Mongin. 1975. Alimentation calcique séparée des poules pondeuses. 2ème partie : applications. *Courrier Avicole* 554 : 6−10.

Sauveur B., and P., Clavreul. 1984. Favourable effect on laying performance of varying dietary levels of calcium and phosphorus during the day. Proc. VIIIth World's Poultry Congress Helzinki, Finland.

Sauveur, B. 1988. Reproduction des volailles et production d'œufs. Paris : INRA. 472 pages.

Sauveur, B. 1996. Photopériodisme et reproduction des oiseaux domestiques femelles. *INRA Prod. Anim*. 9 : 25−34.

Sauveur, B., and P. Mongin. 1974. Effects of time-limited calcium meal upon food and calcium ingestion and egg quality. *Br. Poult. Sci.* 15: 305−313.

Sauveur, B., and P. Mongin. 1983. Plasma inorganic phosphorus concentration during eggshell formation. 2 – Inverse relationships with intestinal calcium content and eggshell weight. *Reprod. Nutr. Dévelop*. 23: 755−764.

Savory, C. J. 1987. Gastrointestinal motility in relation to spontaneous meal occurrence in domestic fowl. *Appetite* 9: 139−148.

Scanes, C. G., R. Campbell, and P. Griminger. 1987. Control of energy balance during egg production in the laying hen. *J. Nutr*. 117: 605−611.

Scott, M. L., S. J. Hull, and P. A. Mullenhoff. 1971. The calcium requirements of laying hens and effects of dietary oyster shell upon egg shell quality. *Poult. Sci*. 50: 1055−1063.

Selle, P. H., A. J. Cowieson, and V. Ravindran. 2009. Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. *Livest. Sci.* 124: 126−141.

Selle, P. H., A. J. Cowieson, N. P. Cowieson, and V. Ravindran. 2012. Protein-phytate interactions in pig and poultry nutrition: a reappraisal. *Nutr. Res. Rev*. 25: 1−17.

Selle, P. H., and V. Ravindran. 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. *Anim. Feed Sci. Technol*. 135: 1−41.

Shih, S. M., J. P. Lin, and G. Y. Shiau. 2000. Dissolution rates of limestones of different sources. *J. Hazard. Mater.* 79: 159−171.

Shipov, A., A. Shahir, E. Zelzer, J. Milgram, E. Monsonego-Ornan, and R. Shahar. 2010. The influence of severe prolonged exercise restriction on the mechanical and structural properties of bone in avian model. *J. Vet. Med*. 183: 153−160.

Shirazi-Beechey, S. P., J. P. Gorvel, and R. B. Beechey. 1988. Phosphate transport in intestinal brush-border membrane. *J. Bioenerg. Biomembr*. 20: 273−288.

Shires, A., J. R. Thompson, B. V. Turner, P. M. Kennedy, and Y. K. Goh. 1987. Rate of passage of corn-canola meal and corn-soybean meal diets through the gastrointestinal tract of broiler and White Leghorn chickens. *Poult. Sci*. 66: 289−298.

Shirley, R. B., and H. M. Jr. Edwards. 2003. Graded levels of phytase past industry standards improves broiler performance. *Poult. Sci*. 82: 671−680.

Siddons, R. C., J. Paradine, D. E. Beever, and P. R. Cornell. 1985. Ytterbium as a particulate-phase digesta-flow marker. *Br. J. Nutr.* 54: 504−519.

Singh, Y., V. Ravindran, T. J. Wester, A. L. Molan, and G. Ravindran. 2014. Influence of prepelleting inclusion of whole corn on performance, nutrient utilization, digestive tract measurements, and cecal microbiota of young broilers. *Poult. Sci*. 93: 3073−3082.

Sklan, D., B. Shaschaf, J. Baron, and S. Hurwitz. 1978. Retrograde movement of digesta in the duodenum of the chicks: extent, frequency, and nutritional implications. *J. Nutr.* 108: 1485−1490.

Skrivan, M., M. Englmeairova, and V. Skrivanova. 2018. Negative effect of phytase superdosing in laying hens. *Czech J. Anim. Sci*. 63: 182−187.

Snow, J. L., K. A. Rafacz, P. L. Utterback, C. W. Utterback, R. W. Leeper, and C. M. Parsons. 2005. Hy-Line W-36 and Hy-Line W-98 laying hens respond similarly to dietary phosphorus levels. *Poult. Sci*. 84: 757−763.

Solomon, S. E. 1991. Egg and Eggshell quality. London: Wolfe Publishing. 149 pages.

Sommerfeld, V. A. G. van Kessel, H. L. Classen, M. Schollenberger, I. Khün, and M. Rodehutscord. 2019. Phytate degradation in gnotobiotic broiler chickens and effects of dietary supplements of phosphorus, calcium, and phytase. *Poult. Sci*. 98: 5562−5570.

Sommerfeld, V., A. O. Omotoso, M. Oster, H. Reyer, A. Camarinha-Silva, M. Hasselmann, K. Huber, S. Ponsuksili, J. Seifert, V. Stefanski, K. Wimmers, and M. Rodehutscord. 2020. Phytate degradation, transcellular mineral transporters, and mineral utilization by two strains of laying hens as affected by dietary phosphorus and calcium. *Animals* 10: 1736.

Statistiques Canada. 2023. Rapports d'importations et exportations de volaille. https://agriculture.canada.ca/fr/secteur/production-animale/information-marche-volaille-oeufs/importations-exportations#oeufie.

St-Pierre, N. R. 2001. Integrating quantitative findings from multiple studies using mixed model methodology. *J. Dairy Sci.* 84: 741−755.

Strathe, A. B., A. Danfaer, and A. Chwalibog. 2007. A dynamic model of digestion and absorption in pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 143: 328−371.

Summers, J. D., R. Grandhi, and S. Leeson. 1976. Calcium and phosphorus requirements of the laying hen. *Poult. Sci*. 55: 402−413.

Sun, B., Q. Zhou, X. Chen, T. Xu, and S. Hui. 2010. Effect of particle size in a limestone–hydrochloric acid reaction system. *J. Hazard. Mater*. 179: 400−408.

Suttle, N. F. 2010. Chapter 6: Phosphorus. In N. F. Suttle, Mineral Nutrition of Livestock. (4th edition). Wallingford: CAB Iinternational. Pages 122−167.

Svihus, B. 2011. The gizzard: function, influence of diet structure and effects on nutrient availability. *Worlds Poult. Sci. J.* 67: 207−224.

Svihus, B., and K. Itani. 2019. Intestinal passage and its relation to digestive processes. *J. Appl. Poult. Res*. 28: 546−555.

Svihus, B., H. Hetland, M. Choct, and F. Sundby. 2002. Passage rate through the anterior digestive tract of broiler chickens fed on diets with ground and whole wheat. *Br. Poult. Sci*. 43: 662−668.

Tamim, N. M., R. Angel, and M. Christman. 2004. Influence of dietary calcium and phytase on phytate phosphorus hydrolysis in broiler chickens. *Poult. Sci*. 83: 1358−1367.

Taylor, A. E., M. R. Bedford, S. C. Pace, and H. M. Miller. 2018. The effects of phytase and xylanase supplementation on performance and egg quality in laying hens. *Br. Poult. Sci*. 59: 554−561.

Tenenhouse, H. S., S. Roy, J. Martel, and C. Gauthier. 1998. Differential expression, abundance, and regulation of Na^+−phosphate cotransporter genes in murine kidney. *Am. J. Physiol*. 275: 527–534.

Teng, X., W. Zhang, D. Xu, Z. Liu, N. Yang, D. Luo, H. Wang, M. Ge, and R. Zhang. 2020. Effects of low dietary phosphorus on tibia quality and metabolism in caged laying hens. *Prev. Vet. Med*. 181: 105049.

Ternes W., L. Acker, and S. Scholtyssek. 1994. Ei und Eiprodukte. Verlag Paul Parey. 494 pages.

Theil, H., 1961. Economic forecasts and policy. In R. Strotz, J. Tinbergen, P. J. Verdoorn, and H. J. Witteveen, Contributions to Economic Analysis, (2nd edition). Amsterdam: North-Holland Publishing Company. Pages 6–48.

Tordoff, M. G. 2001. Calcium: taste, intake, and appetite. *Physiol. Rev*. 81: 1567−1597.

Toscano, M. J., I. C. Dunn, J. P. Christensen, S. Pettow, K. Kittelsen, and R. Ulrich. 2020. Explanations for keel bone fractures in laying hens: are there explanations in addition to elevated egg production? *Poult. Sci*. 99: 4183−4194.

Travel, A., Y. Nys, and E. Lopes. 2010. Facteurs physiologiques et environnementaux influençant la production et la qualité de l'œuf. *INRA Prod. Anim*. 23 : 155−166.

Tumova, E., and R. M. Gous. 2012; Interaction of hen production type, age, and temperature on laying pattern and egg quality. *Poult. Sci*. 91: 1269−1275.

Tyler, C. 1955. The variations in limestone and flint grit consumptions by laying birds. *J. Sci. Food. Agric*. 6: 696−704.

Udoumoh, A. F., I. C. Nwaogu, U. M. Igwebuike, and I. R. Obidike. 2019. The morphological characteristics of the Meckel's diverticulum of pre-hatch and post-hatch broiler chicken. *Comp. Clin. Path*. 28: 1617−1624.

van Baal, J., A. Yu, A. Hartog, J. A. Fransen, P. H. Willems, J. Lytton, and R. J. Bindels. 1996. Localization and regulation by vitamin D of calcium transport proteins in rabbit cortical collecting system. *Am. J. Physiol*. 271: 985–993.

van de Velde, J. P., J. P. W. Vermeiden, J. J. A. Touw, and J. P. Veldhuijzen. 1984. Changes in activity of chicken medullary bone cell populations in relation to the egg-laying cycle. *Metab. Bone. Dis. & Rel. Res*. 5: 191−193.

van der Klis, J. D., H. A. J. Versteech, P. C. M. Simmons, and A. K. Kies. 1997. The efficacy of phytase in corn-soybean meal-based diets for laying hens. *Poult. Sci*. 76: 1535−1542.

van der Klis, J. D., M. W. A. Verstegen, and W. de Witt. 1990. Absorption of minerals and retention time of dry matter in the gastrointestinal tract of broilers. *Poult. Sci*. 69: 2185−2194.

van Itallie, C. M., and J. M. Anderson. 2006. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu. Rev. Physiol*. 68: 403–429.

van Krimpen, M. M., R. P. Kwakkel, C. M. C. van der Peet-Schwering, L. A., den Hartog, and M. A. Verstegen. 2011. Effects of dietary energy concentration, nonstarch polysaccharide concentration, and particle sizes of nonstarch polysaccharides on digesta mean retention time and gut development in laying hens. *Br. Poult. Sci*. 52: 730−741.

Verardi, A. D., A. F. Schneider, J. K. Mayer, F. M. Yuri, V. Oliveira, and C. E. 2019. True phosphorus digestibility and total endogenous phosphorus losses associated with canola meal for brown laying hens 17 and 32 weeks old. *Livest. Sci*. 222: 49−53.

Villa-Bellosta, R., S. Ravera, V. Sorribas, G. Stange, M. Levi, H. Murer, J. Biber, and I. C. Forster. 2009. The Na^{+}−P*i* cotransporter P*i*T-2 (SLC20A2) is expressed in the apical membrane of rat renal proximal tubules and regulated by dietary P*i*. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 296: 691−699.

Vlckova, J., E. Tumova, M. Ketta, M. Englmaierova, and D. Chodova. 2018. Effect of housing system and age of laying hens on eggshell quality, microbial contamination, and penetration of microorganisms into eggs. *Czech J. Anim. Sci*. 63: 51−60.

Waldroup, P. 1999. Nutritional approaches to reducing phosphorus excretion by poultry. *Poult. Sci*. 78: 683−691.

Walk, C. L. 2016. The influence of calcium on phytase efficacy in non-ruminant animals. *Anim. Prod. Sci*. 56: 1345−1349.

Walk, C. L., M. R. Bedford, and A. P. McElroy. 2012. Influence of limestone and phytase on broiler performance, gastrointestinal pH, and apparent ileal nutrient digestibility. *Poult. Sci*. 91: 1371−1378.

Walk, C. L., M. R. Bedford, and O. A. Olukosi. 2018. Effect of phytase on growth performance, phytate degradation and gene expression of myo-inositol transporters in the small intestine, liver and kidney of 21 day old broilers. *Poult. Sci*. 97: 1155−1162.

Wang, X., P. Li, J. Zhao, H. Jiao, and H. Lin. 2022. The temporal gene expression profiles of calcium and phosphorus transporters in Hy-Line Brown layers. *Poult. Sci*. 101: 101736.

Wasserman, R. H., and A. N. Taylor. 1973. Intestinal absorption of phosphate in the chick: effect of vitamin D3 and other parameters. *J. Nutr.* 103: 586−599.

Wei, H., Y. Bi, Y. Li, H. Zhang, J. Li, R. Zhang, and J. Bao. 2022. Low dietary phosphorus impairs keel bone health and quality in laying hens. *Brit. Poult. Sci*. 63:73−81.

Whitehead, C. C. 2004. Overview of bone biology in the egg-laying hen. *Poult. Sci.* 83: 193−199.

Whitehead, C. C., and R. H. Fleming. 2000. Osteoporosis in cage layers. *Poult. Sci*. 79: 1033−1041.

Wideman, Jr. R. F. 1987. Renal regulation of avian calcium and phosphorus metabolism. *J. Nutr*. 117: 808−815.

Wijayanti, D. A., I. H. Djunaidi, and O. Sjofjan. 2019. Effect of probiotic and acidifier combination as an alternative to antibiotic growth promoters on digesta pH and intestinal microflora of laying hen. *Int. J. Adv. Eng. Res. Sci*. 4: 1−4.

Wilcox, R. A., C. W. Deyoe, and H. B. Pfost. 1970. A method for determining and expressing the size of feed particles by sieving. *Poult. Sci*. 49: 9 −13.

Wilfart, A., L. Montagne, H. Simmins, J. Noblet, and J. van Milgen. 2007. Effect of fiber content in the diet on the mean retention time in different segments of the digestive tract in growing pigs. *Livest. Sci*. 109: 27−29.

Wilkinson, S. J., P. H. Selle, M. R. Bedford, and A. J. Cowieson. 2011. Exploiting calcium-specific appetite in poultry nutrition. *Worlds Poult. Sci. J*. 67: 587−598.

Wilz, D. R, R. W. Gray, J. H. Dominguez, and J. Jr. Lemann. 1979. Plasma 1,25-(OH_2)-vitamin D concentrations and net intestinal calcium, phosphate, and magnesium absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr*. 32: 2052−2060.

Wise, A. 1983. Dietary factors determining the biological activity of phytates. *Nutr. Abstr. Rev. Clin. Nutr*. 53: 791–806.

Wistedt, A., Y. Ridderstrale, H. Wall, and L. Holm. 2019. Age-related changes in the shell gland and duodenum in relation to shell quality and bone strength in commercial laying hen hybrids. *Acta Vet. Scand*. 61: 14.

WPSA, 1985. Mineral Requirements for Poultry − Mineral Requirements and Recommendations for Growing Birds. Sub-committee on Mineral Requirements for Poultry of the Working Group N°2 – Nutrition − of the European Federation of Branches of the WPSA. *Worlds Poult. Sci. J*. 41: 252−258.

Xavier, R. P. S., E. R. Freitas, N. M. Braz, N. N. P. Farias, R. C. Lima, P. H. Watanbe, G. A. J. Nascimento, and M. S. M. Peixoto. 2015. Limestone particle sizes and lightning regimens on egg and bone quality of laying hens. *Pesqui. Agropecu. Bras*.50: 718 – 725.

Yamada, M., C. Chen, T. Sugiyama, and W. K. Kim. 2021. Effect of age on bone structure parameters in laying hens. *Animals* 11: 570.

Yan, F., R. Angel, and C. M. Ashwell. 2007. Characterization of the chicken small intestine type IIb sodium phosphate cotransporter. *Poult. Sci*. 86: 67−76.

Yee, J., D. Rosenbaum, J. W. Jacobs, and S. M. Sprague. 2021. Small Intestinal Phosphate Absorption: Novel Therapeutic Implications. *Am. J. Nephrol.* 52: 522–530.

Yosefi, S., R. Braw-Tal, and A. Bar. 2003. Intestinal and eggshell calbindin, and bone ash of laying hens as influenced by age and molting. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol*. 136: 673−682.

Zhai, H. X., J. P. Wang, Q. Zhang, R. Aureli, A. Tschambser, and M. U. Faruk. 2022. Evaluation of the efficacy of a novel phytase in short-term digestibility and long-term egg production studies with laying hens. *Poult. Sci*. 101: 101894.

Zhang, B., and C. N. Coon. 1997*a*. The relationship of calcium intake, source, size, solubility *in vitro* and *in vivo*, and gizzard limestone retention in laying hens. *Poult. Sci*. 76: 1702−1706.

Zhang, B., and C. N. Coon. 1997*b*. Improved *in vitro* methods for determining limestone and oyster shell solubility. *J. Appl. Poult. Sci.* 6: 94−99.

Zita, L., Z. Ledvinka, E. Tumova, and L. Klesalova. 2012. Technological quality of eggs in relation to the age of laying hens and Japanese quails. *Rev. Bras. de Zootec*.41: 2079 – 2084.

Fabien HERVO

Optimisation de l'utilisation digestive du calcium et du phosphore chez la poule pondeuse

Vers un nouveau système d'évaluation des besoins par une approche de modélisation

Résumé :

La nutrition calcique de la poule doit être finement ajustée afin de répondre aux besoins pour la production de la coquille. Cette dernière se déroulant principalement au cours de la nuit, la poule puise le calcium (Ca) dans son os médullaire. Cette mobilisation osseuse répétée accroit les rejets de phosphore (P) et est à l'origine d'une fragilisation progressive du squelette avec l'âge. Il apparait donc primordial d'identifier des stratégies nutritionnelles optimisant l'utilisation des minéraux. En combinant des approches de méta-analyse et d'expérimentation *in vivo*, ce doctorat a contribué à améliorer les connaissances sur les processus impliqués dans l'utilisation digestive de Ca et P. Les effets de la taille des particules de carbonate de Ca et de la phytase microbienne présentes dans l'aliment ont ainsi été caractérisés et quantifiés. Les travaux ont également montré que le Ca particulaire favorisait l'action de la phytase microbienne en limitant la formation de complexes entre le Ca et l'acide phytique. Les connaissances acquises au cours de ce doctorat, couplées à des données de la littérature, ont conduit au développement d'un modèle de recherche capable de prédire de façon dynamique le devenir de Ca et P dans le tube digestif de la poule pondeuse. Ce modèle sera ensuite couplé à un outil décrivant les flux métaboliques et servira à définir des stratégies nutritionnelles adaptées permettant de maintenir l'intégrité du squelette et la qualité de la coquille, et de maîtriser les rejets de P dans l'environnement.

Mots Clés : nutrition, modélisation, poule pondeuse, calcium, phosphore

Summary:

To cover the calcium (Ca) requirement for the eggshell, mineral nutrition must be finely tuned in laying hens. However, eggshell production mainly occurs during the dark period, thus, the hen releases Ca from medullary bones. This daily bone mobilisation impairs the skeleton integrity and leads to increase phosphorus (P) excretion. To improve the sustainability of the egg production, the identification of feeding strategies optimising the digestive utilisation of Ca and P is crucial. Combining meta-analysis tools and *in vivo* experiments, this PhD has contributed to improving our knowledge concerning the mechnisms involved in the digestive utilisation of Ca and P. The effects of limestone particle size and microbial phytase were characterised and quantified. This work also showed that coarse limestone imroved the action of microbial phytase by limiting the formation of complexes between Ca and phytic acid. The knowledge acquired during this PhD, coupled with data from the literature, led to the development of a dynamic research model describing the fate of Ca and P in the digestive tract of laying hens. This model will then be coupled to a tool describing metabolic fluxes and will be used to define adapted nutritional strategies to maintain skeletal integrity and shell quality, and to control P releases into the environment.

Keywords: nutrition, modelling, laying hen, calcium, phosphorus