



**Facteurs de variation de la biodisponibilité du zinc,
ajouté sous forme organique ou inorganique, chez deux
espèces monogastriques en croissance (poulet et
porcelet)**

Patrick Schlegel

► **To cite this version:**

Patrick Schlegel. Facteurs de variation de la biodisponibilité du zinc, ajouté sous forme organique ou inorganique, chez deux espèces monogastriques en croissance (poulet et porcelet). Alimentation et Nutrition. AgroParisTech, 2010. Français. NNT : 2010AGPT0054 . pastel-00536407

HAL Id: pastel-00536407

<https://pastel.hal.science/pastel-00536407>

Submitted on 16 Nov 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Doctorat ParisTech

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

**L'Institut des Sciences et Industries
du Vivant et de l'Environnement
(AgroParisTech)**

Spécialité : Nutrition animale

présentée et soutenue publiquement par

Patrick SCHLEGEL

24 septembre 2010

**Facteurs de variation de la biodisponibilité du zinc, ajouté sous forme
organique ou inorganique, chez deux espèces monogastriques en
croissance (poulet et porcelet)**

Directeur de thèse : **Daniel SAUVANT**

Co-encadrement de la thèse : **Catherine JONDREVILLE** et **Yves NYS**

Jury

M. Daniel SAUVANT, professeur, AgroParisTech

M. Peter SPRING, professeur, Haute Ecole Suisse d'Agronomie

M. François MESCHY, docteur, directeur de recherche Emérite, INRA

Mme Catherine JONDREVILLE, docteur, INRA

M. Yves NYS, docteur, INRA

M. Jean-Yves DOURMAD, docteur, INRA

M. Stéphane DUROSOY

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examinateur

Examinateur

Examinateur

À Camille, Quentin et Anne

REMERCIEMENTS

Je remercie les personnes suivantes qui ont toutes contribué de près ou de loin à la réalisation de ma thèse:

Daniel Sauvart, en tant que directeur de thèse à AgroParisTech et pour ses conseils, notamment lors de la réalisation de mes travaux concernant les métaanalyses.

Daniel Kofel, CEO de Pancosma S.A. qui m'a donné l'opportunité de commencer cette thèse. Pancosma S.A. pour sa politique de transparence et d'ouverture quant aux travaux de recherche et leur publication. Puis Walter Stoll, Giuseppe Bee et Frigga Dohme, au sein d'Agroscope qui m'ont donné la possibilité de finir cette thèse lorsque j'ai intégré leur groupe de recherche.

Wilhelm Windisch de l'Universität für Bodenkultur à Vienne, avec qui j'ai eu la chance de mettre en place la toute première expérience sur la source de zinc étudiée lorsqu'il travaillait encore au sein de l'Université de Weihenstephan, près de Munich. J'aimerais également remercier W. Windisch pour ses nombreux conseils et la transmission de ses connaissances sur le sujet des oligo-éléments.

Catherine Jondreville de l'INRA, qui un jour dans les rues de Rennes, me demande « Tu ne veux pas faire une thèse sur le sujet du zinc ? ». Je la remercie de m'avoir accueilli et de m'avoir encadré durant toute la durée de la thèse. Exercice d'autant plus difficile qu'il a été conduit à plusieurs endroits géographiques. Je la remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir transmis ses nombreuses connaissances. Je tiens à la remercier tout particulièrement pour son professionnalisme, sa rigueur et son enthousiasme pour la science.

Yves Nys de l'INRA qui m'a fait redécouvrir les poulets. Je le remercie pour son investissement dans la partie expérimentale, pour ses nombreux conseils et ses encouragements, surtout durant la rédaction finale de la thèse.

Je remercie les membres du jury, particulièrement les personnes que je n'ai pas encore cité qui sont François Meschy de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse, Jean-Yves Dourmad de l'INRA et Stéphane Durosoy anciennement de l'entreprise Pancosma S.A.. Merci pour la richesse et qualité scientifique de leurs commentaires.

J'adresse également mes remerciements au personnel technique de l'INRA de St-Gilles (UMR SENAH) et de Nouzilly (URA) qui s'est fortement impliqué dans la partie expérimentale effectuée à l'INRA. Je remercie en particulier Sandrine Hillion et Anne-Marie Chagneau ainsi que Patrick Touanel et Kleber Gérard. Je remercie également le personnel technique des laboratoires de l'Université de Weihenstephan pour la partie expérimentale effectuée sur les rats.

Marie-Pierre Létourneau-Montminy, pour ses conseils durant mes débuts dans la méta-analyse.

Mes nouveaux collègues d'Agroscope pour leurs encouragements et la fameuse question « Alors, c'est fini ? »

Enfin, ma famille et mes amis pour leur soutien, leurs encouragements et surtout leur patience pour mes absences trop nombreuses que je consacrais à mon ordinateur.

RESUME

Le zinc (Zn) est un élément essentiel pour le métabolisme, un métal lourd pour l'environnement et une ressource non renouvelable. Dans le contexte d'une croissance de la production mondiale de viande de poulet et de porc, une utilisation efficace et durable du Zn en nutrition animale apparaît comme cruciale.

Le but de ce travail était de statuer sur les conditions d'utilisation des sources organiques de zinc chez le poulet et chez le porc. Les phytates sont identifiés comme le facteur alimentaire principal qui limite la biodisponibilité du Zn chez le monogastrique. Ceci, par la formation de complexes phytates-Zn, qui réduit son absorption. Le Zn sous forme organique est supposé moins interagir avec les phytates que celui de forme inorganique. Ainsi, la biodisponibilité du Zn alimentaire (natif, ajouté sous forme inorganique et organique) a été étudiée en fonction des phytates chez le rat, le poulet et le porcelet pour mieux comprendre les mécanismes liés à cette interaction. Le rat a été choisi pour la facilité de l'étude des flux de Zn digestifs à l'aide d'aliments purifiés en Zn. Le poulet et le porc ont été utilisés dans une expérience commune, afin de profiter de leurs caractéristiques digestives distinctes.

Les expériences *in vivo* et les méta-analyses ont permis de mettre en évidence que :

1) L'absorption du Zn sous forme organique (glycinate de Zn) est améliorée par rapport au sulfate, en présence de phytate de sodium qui suggère une protection, du moins partielle, de la forme organique contre cet antagoniste. 2) La biodisponibilité du glycinate de Zn et des formes organiques en général n'est pas améliorée par rapport au sulfate chez le poulet et le porc nourri avec des aliments contenant des phytates d'origine végétale. L'antagonisme des phytates végétales agit sur le Zn natif, mais nos résultats indiquent clairement l'absence d'interaction entre elles et le Zn ajouté, même sous forme sulfate. 3) L'antagonisme des phytates végétales sur la biodisponibilité du Zn est plus prononcé chez le porc que chez le poulet. Nos résultats indiquent que, contrairement au porc, le pH gastrique faible chez le poulet serait capable de valoriser le Zn issu des matières premières d'origine végétale, initialement lié aux phytates. Ceci est cohérent avec les moindres besoins en Zn alimentaire chez le poulet que chez le porcelet. 4) Pour une supplémentation optimale du Zn chez le porc, nous suggérons, en plus de la teneur en Zn native, la prise en compte d'une nouvelle variable « P phytique non hydrolysé ». Celle-ci tient compte de l'activité phytasique végétale et microbienne de l'aliment. La supplémentation en Zn peut ainsi être adaptée en fonction du potentiel antagoniste des phytates non hydrolysées. La capacité naturelle du poulet à valoriser le zinc issu des matières premières d'origine végétale limite la marge de progrès.

Mots clefs : porcelet, poulet, zinc, biodisponibilité, phytates, phytase, sources, antagonisme.

SUMMARY

Zinc (Zn) is an essential element for the metabolism, a heavy metal for the environment and a non renewable resource. In the context of global increase in poultry and pig meat production, an efficient and sustainable use of Zn in animal production seems crucial.

The aim of the present work was assess the conditions in the use of organic Zn sources in broilers and weaned piglets. Phytates are identified as the main dietary factor limiting Zn bioavailability in monogastrics, through the formation of phytate-Zn complexes which reduces Zn absorption. Organic Zn sources are supposed to interact less with dietary phytates than inorganic sources. Dietary Zn bioavailability (as native and supplemented inorganic and organic form) was therefore studied in function of dietary phytate contents on rats, broilers and weaned piglets. The rats were chosen for the use of purified diets to measure digestive Zn fluxes. Broilers and piglets were used in a combined experiment to gain knowledge through their distinct digestive characteristics.

The *in vivo* experiments and the two meta-analysis allowed to evidence the following :

1) In presence of sodium phytate, Zn absorption from an organic source (Zn glycinate) is improved compared to sulfate, suggesting that the organic form is, at least partially, protected against this antagonist. 2) However, Zn bioavailability from Zn glycinate, as well as from organic forms in general, is not improved compared to sulfate in broilers and piglets fed diets containing vegetal phytate. The vegetal phytate antagonism acts on native Zn, but our results clearly indicate the absence of any interaction with added Zn, even in form of sulfate. 3) The antagonism of vegetal phytate on Zn bioavailability is more pronounced in piglets than in broilers. Our results indicate that the lower gastric pH from broilers compared to piglets, allows the birds to use Zn from feed ingredients with vegetal origin, initially bound to phytates. This is conform to the lower Zn requirements for poultry than for piglets. 4) For an optimal Zn supplementation in pigs, we suggest, in addition of the Zn contents of feed ingredients, the use of a new variable « non hydrolyzed phytic P ». This variable takes into account the dietary vegetal and microbial phytase activity. This way, Zn supplementation can be adapted in function of the antagonistic potential of non hydrolyzed dietary phytates. The natural capacity of broilers to use Zn from vegetal feed ingredients limits the potential improvement of dietary Zn utilization in this specie.

Keywords : broiler, piglet, zinc, bioavailability, sources, phytate, antagonism.

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS DANS

LE CADRE DE LA THÈSE

Publications

Schlegel P, Sauvant D and Jondreville C 2010. Bioavailability of organic zinc sources in broilers and piglets: a meta-analysis. *Animal* (en préparation).

Schlegel P, Nys Y and Jondreville C 2010. Zinc availability and digestive zinc solubility in piglets and broilers fed diets varying in their phytate contents, phytase activity and supplemented zinc source. *Animal* 4, 200-209.

Schlegel P and Windisch W 2006. Bioavailability of zinc glycinate in comparison with zinc sulphate in the presence of dietary phytate in an animal model with ⁶⁵Zn labelled rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 90, 216-222.

Communications

Schlegel P and Jondreville C 2011. Interaction phytates-zinc. 43^e Journées de la Recherche Porcine, Paris, France.

Schlegel P and Jondreville C 2010. Ways to improve zinc bioavailability. 13th European Poultry Conference, Tours, France.

Schlegel P, Sauvant D and Jondreville C 2010. Bioavailability of organic zinc sources in piglets: a meta-analysis. 61st Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Heraklion, Grèce.

Schlegel P and Windisch W 2005. Bioavailability of zinc glycinate in comparison to zinc sulfate in phytate containing diets. 12th International Symposium on Trace Elements in Man and Animals (TEMA), Coleraine, Northern Ireland.

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS EN

ALIMENTATION MINÉRALE

Publications

Leeson S, Namkung H, Caston L, Durosoy S and **Schlegel P** 2008. Comparison of selenium levels and sources and dietary fat quality in diets for broiler breeders and layer hens. Poultry Science 87, 2605-2612.

Hansen SL, **Schlegel P**, Legleiter LR, Lloyd KE and Spears JW 2008. Bioavailability of copper from copper glycinate in steers fed high dietary sulfur and molybdenum. Journal of Animal Science 86, 173-179.

Ettle T, **Schlegel P** and Roth FX 2008. Investigations on iron bioavailability of different sources and supply levels in piglets. Journal of Animal physiology and Animal Nutrition, 92, 35-43.

Spears JW, **Schlegel P**, Seal MC and Lloyd KE 2004. Bioavailability of zinc from zinc sulfate and different organic zinc sources and their effects on ruminal volatile fatty acid proportions. Livestock Production Science 90, 211-217.

Edition

Schlegel P, Durosoy S and Jongbloed AW 2008. Trace elements in animal production systems. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

Communications

Schlegel P, Bracher A and Hess D 2010. Teneurs en minéraux et oligo-éléments de céréales suisses destinées à l'alimentation animale. In Schriftreihe aus dem Institut für Pflanzen-, Tier- und Agrarökosystem-Wissenschaften. (eds M Kreuzer, T Lanzini, M Wanner, R Bruckmaier, G Bee) pp. 155-158. ETH Zürich, Zürich, Suisse.

Schlegel P, der Kinderen L, Mul A, Ubbink-Blanksma U and Bruininx E 2009. Effet de la source et dose de supplémentation en oligo-éléments (Fe, Cu, Mn, Zn) sur la performance de croissance de porcelets sevrés. Journées Recherches Porcines 41, 141-142.

Schlegel P, der Kinderen L, Mul A, Ubbink-Blanksma U and Bruininx E 2009. Effects of supplemental trace mineral (Fe, Cu, Mn, Zn) source and level on post-weaning piglet trace mineral excretion and status. In 8. BOKU-Symposium Tierernährung (eds MC Mair, M Kraft and W Windisch), pp. 116-120. Universität für Bodenkultur, Wien, Oesterreich.

Schlegel P, der Kinderen L, Mul A, Ubbink-Blanksma U and Bruininx E 2008. Effects of supplemental trace mineral (Fe, Cu, Mn, Zn) source and dose on growth performance in weaned piglets. In 7. BOKU-Symposium Tierernährung (eds C Plitzner, M Kraft and W Windisch), pp. 225-229. Universität für Bodenkultur, Wien, Oesterreich.

Schlegel P, Durosoy S and Dupas M 2008. Iron status of weaned piglets fed either dietary iron sulfate or iron glycinate. In Trace elements in animal production systems (eds P Schlegel, S Durosoy and AW Jongbloed), pp. 267-270. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

Jang YD, Choi HB, Durosoy S, **Schlegel P**, Choi BR and Kim YY 2008. Efficacy of three organic selenium sources for growing-finishing pigs. In Trace elements in animal production systems (eds P Schlegel, S Durosoy and AW Jongbloed), pp. 264-267. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

Schlegel P, Durosoy S and Dupas M 2007. Iron status evolution of weaned piglets either fed iron sulfate or iron glycinate. In 6. BOKU-Symposium Tierernährung (eds C Plitzner, M Kraft and W Windisch), pp. 273-278. Universität für Bodenkultur, Wien, Oesterreich.

Hansen SL, **Schlegel P**, Lloyd KE, Legleiter LR and Spears JW 2006. Bioavailability of copper from copper glycinate when fed in the presence of high sulfur and molybdenum. Journal of Animal Science 84, Suppl. 1.

Ettle T, **Schlegel P** and Roth FX 2006. Influence of different iron sources on digestibility of iron, growth performance and blood parameters in the piglet. Proceedings of the Society of Nutrition and Physiology 15, 166.

Männer K, Simon O and **Schlegel P** 2006. Effects of different iron, manganese, zinc and copper sources (sulphates, chelates, glycinate) on their bioavailability in early weaned piglets. 9. Tagung Schweine- und Geflügelernährung, 25-27.

Schlegel P, Hansen SL, Lloyd KE, Legleiter LR and Spears JW 2006. Biodisponibilité du glycinate de cuivre chez le taurillon nourri avec présence croissante d'antagonistes cupriques. Rencontres Recherches Ruminants 13, 97.

Schlegel P, Seal MC, Lloyd KE and Spears JW 2006. Bioavailability of inorganic and organic zinc sources in beef. In Experimentelle Modelle des Spurenelementforschung (eds W Windisch and C Plitzner), pp. 68-80. Herbert Utz Verlag, München, Deutschland.

TABLE DES MATIERES

1.	Introduction générale.....	21
2.	Etude bibliographique.....	25
2.1.	L'élément zinc : origines de l'exploitation du zinc par l'Homme et ses rôles en biologie.....	26
2.1.1.	L'élément zinc.....	26
2.1.2.	Le zinc est un élément essentiel.....	27
2.1.3.	Les fonctions du zinc.....	28
2.1.4.	La régulation du métabolisme du zinc.....	29
2.1.5.	Les effets d'une carence en zinc.....	34
2.1.6.	Les effets d'un apport de zinc au-delà de la capacité de régulation homéostatique.....	35
2.1.7.	Le besoin en zinc et les recommandations d'apport alimentaire.....	37
2.1.8.	Les sources de zinc sous forme inorganique.....	39
2.1.9.	Les sources de zinc sous forme organique.....	39
2.2.	Critères de mesure pour estimer le besoin en zinc ou la biodisponibilité de sources de zinc <i>in vivo</i>.....	41
2.2.1.	Utilisation des performances de croissance comme indicateur du statut en zinc.....	41
2.2.2.	Zinc absorbé et bilan de zinc comme indicateurs du statut en zinc.....	43
2.2.3.	Critères de concentration de zinc et de métallothionéines dans les fluides, les organes et les tissus.....	43
2.2.4.	Critères d'activités enzymatiques.....	45
2.2.5.	Critères de défense immunitaire.....	45
2.2.6.	Critères d'expression de gènes.....	48
2.2.7.	Résumé des critères de mesure.....	49
2.3.	La biodisponibilité du zinc et ses facteurs de variation.....	50
2.3.1.	Définition de la biodisponibilité.....	50
2.3.2.	Méthode d'estimation de la biodisponibilité du zinc.....	52

2.3.3.	Facteurs alimentaires ayant une influence sur la biodisponibilité du zinc.....	53
2.4.	Classification caractérisation, utilisation et méthodes d'évaluation des sources de zinc sous forme organique.....	65
2.4.1.	Les systèmes de classification des sources de zinc sous forme organique.....	65
2.4.2.	Origine et développement du marché des sources de zinc sous forme organique.....	67
2.4.3.	Les postulats des sources de zinc sous forme organique.....	68
2.4.4.	La caractérisation des sources de zinc sous forme organique.....	71
2.4.5.	Estimation in vivo des sources de zinc sous forme organique : importance du dispositif expérimental.....	77
2.4.6.	Conclusion sur la caractérisation des sources de zinc sous forme organique et l'importance du dispositif expérimental in vivo.....	79
3.	Etudes expérimentales.....	80
3.1.	Objectifs de recherche.....	81
3.2.	Présentation des caractéristiques physico-chimiques de la source organique de zinc choisie (ZnGly).....	83
3.3.	Bioavailability of zinc glycinate in comparison with zinc sulphate in the presence of dietary phytate in an animal model with ⁶⁵ Zn labeled rats.....	87
3.4.	Zinc availability and digestive zinc solubility in piglets and broilers fed diets varying in their phytate contents, phytase activity and supplemented zinc source.....	94
3.5.	Bioavailability of organic zinc sources in broilers and piglets: a meta-analysis.....	104
4.	Discussion générale.....	129
4.1.	Impact de phytates de sodium apportés dans des régimes semi- synthétiques.....	130

4.2.	Impact des phytates apportés par les matières premières d'origine végétale.....	133
4.2.1.	Effet des phytates sur le zinc présent dans l'aliment chez le porc.....	133
4.2.2.	Effet des phytates sur le zinc présent dans l'aliment chez le poulet.....	142
4.2.3.	Effet des sources de zinc supplémentées sous forme organique	147
4.3.	Intérêt de la comparaison entre poulet et porcelet.....	149
5.	Conclusions générales.....	152
6.	Références bibliographiques.....	155

INDEX DES ABRÉVIATIONS

AAFCO	Association of American Feed Control Officials
ADN	Acide désoxyribonucléique / <i>deoxyribonucleic acid</i>
AFZ	Association Française de Zootechnie
ALP	Activité phosphatase alcaline plasmatique / <i>plasma alkaline phosphatase activity</i>
ANOVA	Analyse de variance / <i>analysis of variance</i>
ARN	Acide ribonucléique / <i>ribonucleic acid</i>
BW	Masse corporelle / <i>body weight</i>
BWG	Accroissement / <i>body weight gain</i>
CAS	Chemical Abstracts Service
CF	Cellulose brute / <i>crude fiber</i>
CP	Matière azotée / <i>crude protein</i>
DZNI	Zinc alimentaire supplémenté sous forme inorganique / <i>dietary supplemented inorganic zinc</i>
DZNN	Zinc natif alimentaire / <i>dietary native zinc</i>
DZNO	Zinc alimentaire supplémenté sous forme organique / <i>dietary supplemented organic zinc</i>
DZNTOT	Zinc alimentaire total / <i>dietary total zinc</i>
ETR	Écart-type résiduel / <i>residual standard deviation</i>
FCR	Indice de consommation / <i>feed conversion ratio</i>
FI	Consommation alimentaire / <i>feed intake</i>
FM	Matière fraîche / <i>fresh matter</i>
FTU ou U	Unité phytasique / <i>phytase unit</i>
G:F	Indice de croissance / <i>gain to feed</i>
GLM	Modèle linéaire / <i>general linear model</i>
Ig	Immunoglobuline / <i>immunoglobulin</i>
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
Max	Maximum / <i>maximum</i>
Mic	Microbien / <i>microbial</i>
mRNA	Acide ribonucléique messager / <i>messenger ribonucleic acid</i>
MS / DM	Matière sèche / <i>dry matter</i>
MT	Métallothionéine / <i>metallothionein</i>
N° / n	Nombre / <i>number</i>
NPP	Phosphore sous forme non phytique / <i>non phytic phosphorus</i>

P	Probabilité / <i>probability</i>
PA / AP	Phosphatase alcaline / <i>alkaline phosphatase</i>
Phyt	Phytique / <i>phytic</i>
Phytv	Phytase végétale / <i>vegetal phytase</i>
Phytm	Phytase microbienne / <i>microbial phytase</i>
PPhytNH	Phosphore phytique non hydrolysé / <i>non hydrolyzed phytic phosphorus</i>
Qf	Quotient de chélation / <i>chelation formation quotient</i>
R ²	Coefficient de détermination / <i>coefficient of determination</i>
RASSF	Rapid alert system for food and feed
RBV	Biodisponibilité relative / <i>relative bioavailability</i>
RMSE	Root mean square error
SE	Erreur standard / <i>standard error</i>
SOD	Superoxyde dismutase / <i>superoxid dismutase</i>
Veg	Végétal / <i>vegetal</i>
Zip	Zn regulated transporter and Fe regulated transporter like protein
ZnGly	Glycinate de zinc ou chélate de zinc et de glycine / <i>zinc glycinate or zinc glycine chelate</i>
Zn _{Sol}	Solubilité du zinc / <i>zinc solubility</i>
ZnSulf	Sulfate de zinc / <i>zinc sulfate</i>
ZnT	Zn ²⁺ transporter

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 2 Etude bibliographique

- Tableau 1** Estimation des besoins en zinc et recommandations d'apport de zinc chez le poulet et le porcelet sevré, selon différents organismes scientifiques [mg / kg d'aliment].
- Tableau 2** Résumé de la réponse des critères d'évaluation du statut immunitaire à l'apport alimentaire de zinc chez le poulet et le porc.
- Tableau 3** Critères d'évaluation du besoin et de la biodisponibilité de sources de zinc proposés chez le poulet et le porc.
- Tableau 4** Evaluation des effets des facteurs de variation de la biodisponibilité du zinc.
- Tableau 5** pH dans le gésier, l'estomac et les différents segments de l'intestin grêle chez le poulet et le porcelet (d'après Létourneau-Montminy, 2009).
- Tableau 6** Biodisponibilité relative de sources de zinc chez la volaille et le porc par rapport au sulfate (d'après Jongbloed *et al.*, 2002).

Chapitre 3 Etudes expérimentales

Chapitre 3.3

- Table 1** Composition of the basal diet.
- Table 2** Final body weight and parameter of Zn supply status.
- Table 3** Balance, absorption, metabolic utilization and bioavailability of Zn.

Chapitre 3.4

- Table 1** Composition of basal diets P- and P+ and P+/ENZ (as fed basis).
- Table 2** Effect of basal diet and zinc supplementation on growth performance, digesta, plasma and bone characteristics in piglets (main factors).
- Table 3** Effect of basal diet and zinc supplementation on growth performance, digesta, plasma and bone characteristics in broilers.

Chapitre 3.5

- Table 1** Summary of the broiler experiments.
- Table 2** Summary of the piglet experiments.

- Table 3** Descriptive statistics of the main broiler variables with results on the GLM procedure.
- Table 4** Descriptive statistics of the main piglet variables with results on the GLM procedure.
- Table 5** Adjusted dependent variable response to dietary DZNN, DZNI and DZNO (mg / kg diet) in broilers.
- Table 6** Adjusted dependent variable response to dietary DZNN, DZNI and DZNO (mg / kg diet) in piglets.

Chapitre 4 Discussion générale

- Tableau 1** Descriptif des aliments expérimentaux testés lors des expérimentations conduites sur porcelet sevré à l'INRA entre 2002 et 2010.
- Tableau 2** Prédiction de la teneur en zinc de l'os de porcelets sevrés [mg / kg MS] en fonction des teneurs en zinc natif [mg / kg aliment], zinc ajouté sous forme de sulfate [mg / kg aliment] et P phytique non hydrolysé [g / kg aliment] de l'aliment.
- Tableau 3** Equivalence entre phytase microbienne [FTU] et zinc ajouté sous forme de sulfate [mg] dans un aliment pour porcelet à base de maïs et de tourteau de soja
- Tableau 4** Descriptif des aliments expérimentaux testés lors des expérimentations conduites sur porcelet sevré à l'INRA entre 1999 et 2010 et par Linares *et al.* (2007).
- Tableau 5** Prédiction de la teneur en zinc de l'os de poulets de 21 jours [mg / kg MS] en fonction des teneurs en zinc natif [mg / kg aliment], zinc ajouté sous forme de sulfate [mg / kg aliment] et activités phytasiques végétale [100 U / kg aliment] et microbienne [100 FTU / kg aliment] de l'aliment.

LISTE DES FIGURES

Chapitre 2 Etude bibliographique

- Figure 1** Flux d'absorption passive, d'absorption active et d'absorption totale de zinc en fonction de sa concentration luminale.
- Figure 2** Flux d'absorption réelle, apparente et excrétion endogène fécale de zinc selon la teneur en zinc alimentaire chez le rat en croissance (d'après Kirchgessner, 1993).
- Figure 3** Schéma des flux corporels de zinc.
- Figure 4** Activité de la PA plasmatique chez le poulet en fonction du zinc alimentaire (d'après Watkins *et al.*, 1993 ; Hauter 1994 ; Mohanna et Nys, 1999a ; Gebert *et al.*, 2003 ; Pancosma unpublished b).
- Figure 5** Exemple de données nécessaires pour le calcul de la biodisponibilité relative de zinc.
- Figure 6** Acide phytique.
- Figure 7** Schéma de la structure moléculaire de $\text{Na}_3\text{Mn}_5 \cdot (\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_{24}\text{P}_6)\text{OH} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ou de $\text{Na}_3\text{Zn}(\text{II})_5 \cdot (\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_{24}\text{P}_6)\text{OH} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. Les atomes fléchés de couleur grise peuvent représenter soit du manganèse, soit du zinc. Les atomes d'hydrogène ne sont pas présentés (d'après Rodrigues-Filho *et al.*, 2005).
- Figure 8** Teneur en zinc dans le tibia du poulet en fonction de la variété d'orge utilisée et du niveau de zinc supplémenté (d'après Linares *et al.*, 2007).
- Figure 9** Comparaison du spectre d'un chélate de glycine de zinc avec un mélange équimolaire de glycine et de sulfate de zinc.
- Figure 10** Biodisponibilité relative du zinc de différentes sources de zinc sous forme organique en fonction de leur solubilité à pH 2 et 5 et de leur quotient de chélation (d'après Cao *et al.*, 2000 ; Huang *et al.*, 2009).
- Figure 11** Solubilité du zinc dans le tractus digestif du porc en fonction du pH du milieu (d'après Dintzis *et al.*, 1995; Ashida *et al.*, 2000).
- Figure 12** Evolution du zinc soluble dans l'iléon et de la teneur en zinc de l'os en fonction de la teneur en zinc de l'aliment apporté à des porcelets sevrés (d'après Susaki *et al.*, 1999).

Chapitre 3 Etudes expérimentales

Chapitre 3.2

Figure 1 Glycinate de zinc (B-TRAXIM® 2C).

Figure 2 Schéma de la molécule du glycinate de zinc (B-TRAXIM® 2C).

Figure 3 Comparaison du spectre du glycinate de zinc lot n° 50554 avec le spectre du lot de référence.

Chapitre 3.4

Figure 1 Effect of digesta pH on Zn solubility.

Chapitre 3.5

Figure 1 Curvilinear-plateau response and corrected within-experiment response of plasma Zn and bone Zn on total dietary Zn in broilers.

Figure 2 Curvilinear-plateau response and corrected within-experiment response of plasma Zn, plasma ALP and bone Zn on total dietary Zn in piglets.

Figure 3 Response of G:F, plasma Zn and bone Zn to total dietary zinc in diets supplemented with DZNI or with DZNO in broilers.

Figure 4 Response of plasma Zn, plasma ALP, liver Zn, bone Zn and absorbed Zn to total dietary Zn in diets supplemented with DZNI or with DZNO in piglets.

Chapitre 4 Discussion générale

Figure 1 Absorbabilité apparente du zinc chez le rat en croissance en fonction de l'ajout de phytate de sodium et de zinc ajouté sous forme de sulfate dans des aliments semi-synthétiques (d'après Weigand et Kirchgessner, 1980 ; 1992 ; Rimbach et Pallauf, 1992 ; 1997 ; Rimbach *et al.*, 1995 ; Schlegel et Windisch, 2005).

Figure 2 Teneur en zinc de l'os chez le porcelet sevré en fonction de teneur en zinc d'aliment supplémentés ou non de zinc sous forme de sulfate – synthèse des résultats obtenus à l'INRA entre 2002 et 2010.

Figure 3 Teneur en zinc de l'os chez le porcelet sevré en fonction de teneur en zinc d'aliment corrigée de l'équivalence entre phytase microbienne et zinc sous forme de sulfate – synthèse des résultats obtenus à l'INRA entre 2002 et 2010.

Figure 4 Teneur en zinc de l'os de porcelets sevrés et non supplémentés en zinc en fonction de la teneur en P phytique de l'aliment – synthèse des résultats obtenus à l'INRA entre 2002 et 2010.

- Figure 5** Teneur en zinc de l'os de porcelets sevrés et non supplémentés en zinc en fonction de la teneur en P phytique non hydrolysé¹ de l'aliment – synthèse des résultats obtenus à l'INRA entre 2002 et 2010.
- Figure 6** Prédiction de la teneur en zinc de l'os de porcelets sevrés en fonction de la supplémentation en zinc sous forme de sulfate d'aliments à base de type maïs et de tourteau de soja ou d'aliments à teneur en P phytique réduite.
- Figure 7** Teneur en zinc de l'os chez le poulet de 21 jours en fonction de teneur en zinc d'aliment supplémentés ou non de zinc sous forme de sulfate – synthèse des résultats obtenus à l'INRA entre 1999 et 2010 et par Linares *et al.* (2007).
- Figure 8** Prédiction de la teneur en zinc de l'os de porcelets sevrés en fonction de la teneur en zinc et de l'activité phytasique que l'aliment
- Figure 9** Effet de la source et du niveau d'apport de zinc dans un aliment à base de maïs et de tourteau de soja, sur la concentration de zinc dans l'os chez le poulet (d'après Wedekind *et al.*, 1992 ; Swiatkiewicz *et al.*, 2001 ; Cao *et al.*, 2002)
- Figure 10** Solubilité du zinc dans le gésier et l'estomac en fonction du pH du milieu (d'après données brutes du chapitre 3.4)
- Figure 11** Teneur en zinc de l'os du poulet et du porcelet en fonction de la solubilité du zinc dans le gésier / estomac (d'après données brutes du chapitre 3.4).

1. Introduction générale

Selon les estimations de Food and Agriculture Organization (2002), d'ici 2030, la population mondiale atteindra 8,23 milliards d'individus, soit une augmentation de 40% depuis 1999. Même si cette progression devrait ralentir par rapport à la période 1979 - 1999, le besoin en denrées alimentaires va croître de façon significative. Selon la Food and Agriculture Organization (2002), la demande en production carnée augmentera pour atteindre une quantité de 376 millions de tonnes, soit une augmentation de 72% par rapport à 1999. La consommation de viande atteindra ainsi en moyenne 45,5 kg par personne et par an. Entre la production de volaille, de porc et de ruminants, celle de la volaille connaîtra le plus grand essor et dépasserait même celle du porc d'ici 2030. La demande en ressources (eau, sols arables, énergie fossile, matières premières utilisées en alimentation animale, ...) devrait également connaître une évolution positive d'ici 2030. La production animale devra faire face à ces nouvelles situations par une intensification durable et une optimisation des ressources disponibles (Food and Agriculture Organization, 2002). La pression de son impact sur l'environnement (pressions sanitaires, émissions d'ammoniaque, de méthane, pollution de métaux lourds, ...) sera également capital dans les années à venir. En ce qui concerne l'alimentation animale, une utilisation si possible encore plus efficace des nutriments devra être recherchée.

L'élément zinc (Zn) est à la fois un élément essentiel pour le métabolisme et un métal polluant pour l'environnement. Chez le porc, comme chez le poulet, une réduction du niveau d'apport en zinc peut conduire à une sub-carence qui se manifeste par des dysfonctionnements, comme des retards de croissance ou des déficiences des fonctions immunitaires, pouvant mettre à mal les performances d'un élevage. Les phases de production animale dans lesquelles l'indice de consommation est faible, telles que le démarrage des poulets ou le post-sevrage des porcelets, sont particulièrement sensibles. Les recommandations d'apport de zinc s'élèvent à 100 et 40 mg / kg d'aliment pour respectivement le porcelet en post-sevrage le poulet en croissance (Institut National de la Recherche Agronomique, 1989 ; National Research Council, 1994 ; National Research Council, 1998). Ces niveaux sont plus élevés que ce qu'apportent les matières premières habituellement utilisées en alimentation animale, c'est pourquoi les aliments pour porcs et poulets doivent être supplémentés avec des sources inorganiques ou organiques de zinc.

Un excès de zinc dans les sols peut conduire à des phénomènes de toxicité pour les plantes et la microflore du sol à partir d'une concentration de 100 à 200 mg / kg MS (Mc Grath *et al.*, 1995). En 2003, les teneurs en zinc maximales autorisées dans les aliments destinés aux porcs et volailles dans l'Union Européenne ont, pour des raisons environnementales, été revues à la baisse, en passant de 250 mg à 150 mg / kg d'aliment (European Community, 2003). Grâce à cette nouvelle directive les rejets de zinc provenant de la production animale

devraient baisser d'environ autant, soit 40%, compte tenu du faible pourcentage de rétention du zinc (Jondreville *et al.*, 2003). Toutefois, il n'est pas exclu, que dans le futur de nouvelles directives voient le jour dans le domaine de la qualité de l'eau ou des engrais de ferme (purin, fumier) qui limiteraient encore d'avantage l'utilisation du zinc en alimentation animale (Windisch, 2009).

Par ailleurs, en admettant que la demande de zinc reste constante, on estime que les réserves minières mondiales connues et exploitables avec les techniques utilisées actuellement seront épuisées dans moins de 20 ans (Conseil Fédéral, 2009). La limitation de l'utilisation de cette ressource non renouvelable pourrait donc contribuer à la durabilité des systèmes.

Ainsi, les institutions de recherche et les industries sont invitées à trouver des moyens pour améliorer l'efficacité de l'utilisation du zinc en alimentation animale, qui permettraient de limiter les volumes utilisés et les rejets, tout en maintenant les performances des élevages. Parmi ces solutions, figure l'utilisation de sources organiques de zinc dans alimentation du poulet de chair et du porcelet sevré. En effet, les sources organiques de zinc (décrites sous les termes de *complexes*, *chélates*, *protéinates* ou *polysaccharidates*) sont considérées comme plus biodisponibles que les sources inorganiques (sulfate ou oxyde de zinc). Cette réputation est issue de diverses expériences menées sur les deux catégories d'espèces cibles visant à étudier, soit le remplacement total ou partiel d'une source inorganique par une source organique, soit le remplacement d'une source inorganique par une source organique à dose réduite, soit l'apport supplémentaire (« on top ») sous forme organique. Le choix de l'une ou l'autre de ces stratégies d'application pour étudier des sources de zinc sous forme organique provient le plus souvent d'une combinaison d'intérêts sous des contextes commerciaux et environnementaux différents. Cependant, peu de ces études permettent réellement de statuer sur la biodisponibilité proprement dite du zinc apporté sous cette forme. A cet égard, les revues portant sur la biodisponibilité des sources de zinc chez la volaille et le porc estiment que les sources organiques sont équivalentes aux sources inorganiques (Ammerman *et al.*, 1995; Jongbloed *et al.*, 2002). Toutefois, dans certaines conditions expérimentales et chez le poulet, une amélioration de la biodisponibilité du zinc lorsqu'il était apporté sous forme organique plutôt qu'inorganique a été rapportée (Wedekind *et al.*, 1992, Swiatkiewicz *et al.* 2001 ; Cao *et al.*, 2002 ; Ao *et al.*, 2006). Ces auteurs ont attribué cette différence à la protection des sources organiques qu'ils ont utilisées contre l'antagonisme de certains composés alimentaires, notamment les phytates. A l'inverse, l'amélioration de la disponibilité du zinc par remplacement du sulfate de zinc par une source organique chez le porc n'a jamais été rapportée dans la littérature.

La variabilité des résultats obtenus pourrait avoir diverses origines. L'absence d'effet positif de l'usage de sources organiques s'expliquerait facilement si le zinc et son ligand ne sont pas

liés. Or, les études publiées donnent de façon générale une description très succincte de la source organique de zinc utilisée. En particulier, la liaison entre le ligand et le zinc n'est souvent pas caractérisée, ni même prouvée. Par ailleurs, les conditions expérimentales, en particulier la nature de l'aliment dans lequel le zinc est introduit, varient d'une étude à l'autre. Or, selon Wedekind *et al.* (1992, 1994a), l'usage de sources organiques de zinc ne pourrait être avantageux que lorsque l'aliment contient des antagonistes du zinc, en particulier des phytates, en quantité suffisante. Dans ces conditions, ces auteurs, avec la même source de zinc organique ont observé un effet positif du remplacement du zinc inorganique par du zinc organique chez le poulet et non chez le porc. Ces auteurs attribuent cette différence à la concentration plus élevée de calcium dans l'aliment pour poulets, qui contribuerait à stabiliser les phytates et donc à accentuer leur effet antagoniste sur le zinc. A aucun moment, ils ne mentionnent un possible effet spécifique de l'espèce, qui pourtant ne peut pas être exclu.

Le but de notre travail est donc de chercher à statuer sur les conditions d'utilisation des sources organiques de zinc chez le poulet et chez le porc. Notre hypothèse de départ est que, les phytates constituant le principal antagoniste du zinc, la protection des sources organiques contre ces composés est à l'origine de leur meilleure disponibilité par rapport aux sources inorganiques. Nous avons donc cherché à comprendre les mécanismes liés à cette interaction chez les deux espèces.

Nous avons, dans un premier temps, produit une revue que la littérature qui rappelle, chez les deux espèces, les rôles du zinc et le métabolisme du zinc, puis les méthodes et critères d'évaluation de la biodisponibilité du zinc, en particulier *in vivo*. Nous y abordons ensuite les facteurs de variation de la biodisponibilité, notamment d'origine alimentaire. Finalement, nous faisons le point sur les données disponibles concernant les méthodes d'évaluation des sources de zinc organique et les principaux résultats obtenus.

Notre travail comporte une partie expérimentale qui a consisté à tester, dans différentes conditions, la protection d'une source de zinc contre l'antagonisme des phytates. La source de zinc sous forme organique choisie a été mise au point, produite et commercialisée par la société Pancosma. Toutes les études ont été menées *in vivo*, avec des espèces animales en croissance (rat, poulet, porc). L'origine des phytates varie d'une étude à l'autre. Pour compléter ce travail expérimental, nous avons conduit une analyse quantitative de la littérature visant à évaluer la disponibilité de sources organiques de zinc par rapport aux sources inorganiques.

La discussion générale fait le point sur les avancées obtenues quant à la question de l'interaction entre zinc et phytates.

2. Etude bibliographique

2.1. L'élément zinc : origines de l'exploitation du zinc par l'Homme et ses rôles en biologie

2.1.1. L'élément zinc

Le zinc porte le numéro atomique 30 et se situe dans le groupe XII de la classification Périodique des Eléments. Le zinc est un métal de transition, caractérisé par une bonne conductivité électrique. En biologie, le zinc est généralement un cation divalent (Zn^{2+}) qui s'associe facilement avec l'oxygène et les éléments non métalliques tels que des acides aminés, des peptides, des protéines et des nucléotides, pour former des complexes avec quatre liaisons de coordinations en disposition tétraédrique.

Avant même que l'élément zinc ne soit identifié, l'utilisation du minerai nommé calamine (carbonate de zinc) était déjà répandue 10 siècles avant J.C. pour la fabrication de bracelets ou pour son application comme pansements sur des blessures. En Inde, la fabrication de l'oxyde de zinc à partir de calamine était courante dès le 12^e siècle. Au 16^e siècle, le terme zinc fut employé pour la première fois dans un écrit par l'alchimiste suisse Paracelsus, sous le nom de "zincum". Les Italiens Galvani et Volta ont été les pionniers de l'utilisation de la conductivité électrique du zinc par le développement des piles voltaïques vers 1800.

Le minerai contenant du zinc est très répandu sur notre globe. La première industrialisation de la production européenne a été accomplie en Grande Bretagne en 1743, près de 600 ans après l'Inde, par un procédé de réduction de la calamine. L'extraction du minerai contenant du zinc s'effectue aujourd'hui dans plus de 50 pays. La Chine, l'Australie, le Pérou, les Etats Unis d'Amérique, le Canada et l'Union Européenne sont les plus grands producteurs. Le zinc est principalement utilisé pour galvaniser l'acier, le protégeant ainsi contre la corrosion (50% de la production mondiale). Environ 20% du zinc produit sont destinés à la fabrication de laiton en alliage avec le cuivre.

La consommation annuelle mondiale de zinc se monte à 11 millions de tonnes. Entre 1994 et 2005, le prix du zinc, coté en bourse, a varié entre 700 \$ / t et 1800 \$ / t. En 2006 et 2007, il a dépassé les 3000 \$ / t et actuellement, il est vendu à 2000 \$ / t (London Metal Exchange, 2010). L'oxyde de zinc (ZnO) est généralement utilisé dans la production de peintures, cosmétiques, médicaments, produits plastiques, textiles et équipements électriques. Le sulfate de zinc ($ZnSO_4$) est généralement utilisé dans la production de peintures, d'ampoules fluorescentes et d'écrans. Oxydes et sulfates sont les principales sources de zinc utilisées comme suppléments en alimentation animale. Leur proportion d'utilisation en alimentation animale, par rapport aux autre usage, s'élève à moins de 3% (London Metal Exchange, 2010).

2.1.2. Le zinc est un élément essentiel

En biologie, Raulin (1869) découvre qu'*Aspergillus niger* contient du zinc. Quelques années plus tard, Lechartier et Bellamy (1877) constatent sa présence dans divers organismes végétaux et animaux. La même année, Raoult et Breton (1877) révèlent sa présence dans le foie humain. Dans les années qui suivirent, le zinc a été mis en évidence dans la plupart des plantes et des animaux à des concentrations un peu moins élevées que le fer, mais plus importantes que celles du manganèse et du cuivre. Dans l'organisme, le zinc fait effectivement partie de la catégorie des oligo-éléments ou éléments traces métalliques. Cette catégorie comprend les éléments contenus dans un organisme à une concentration inférieure à 50 mg / kg (Kirchgessner, 2004). Après le fer, le zinc est l'oligo-élément le plus abondant dans l'organisme et présente une concentration de 20 - 30 mg / kg de poids corporel (Kirchgessner *et al.*, 1994). Ainsi, un poulet de 3 kg poids vif, contient entre 60 et 90 mg de Zn et un porc de 100 kg poids vif, entre 2 et 3 g de Zn.

En 1934, la dégradation des performances de croissance de rats et de souris induite par la réduction de l'apport alimentaire de zinc a révélé le caractère essentiel de cet élément. Cette observation a été rapportée presque simultanément en Europe (Bertrand et Bhattacharjee, 1934) et en Amérique (Todd *et al.*, 1934). Un premier pas important venait d'être franchi dans la découverte des rôles physiologiques du zinc. Les oligo-éléments, dont fait partie le zinc, sont une classe d'éléments nécessaires à la vie d'un organisme, mais en quantités très faibles. Ils présentent également un caractère toxique pour l'organisme lorsqu'ils sont présents à des taux trop élevés. Un oligo-élément est dit essentiel lorsque son absence, tout comme son apport excessif, provoquent des anomalies structurelles et physiologiques pouvant mener à la mort.

En 1940, le zinc fut identifié dans l'enzyme anhydrase carbonique isolée et purifiée (Kielin et Mann, 1940). L'anhydrase carbonique catalyse la conversion du dioxyde de carbone (CO_2) en bicarbonate (HCO_3^-) dans les tissus, qui sera transporté par les érythrocytes aux poumons. Le bicarbonate est transformé en acide carbonique (H_2CO_3), puis en CO_2 et H_2O pour être expiré des poumons. En 1955, le caractère essentiel du zinc préalablement démontré chez le rat et la souris, a été mis en évidence chez le porc (Tucker et Salmon, 1955) et en 1958 chez le poulet de chair (O'Dell *et al.*, 1958). Tucker et Salmon (1955) ont observé chez le porc qu'une affection cutanée, appelée parakératose, était causée par une carence en zinc et qu'une addition suffisante de zinc dans l'aliment permettait de guérir l'animal et de prévenir cette affection. De 1955 à nos jours, une somme importante de travaux a été menée sur l'apport de zinc dans l'alimentation des animaux d'élevage et de l'Homme afin de préciser ses rôles physiologiques et de déterminer les niveaux d'apports alimentaires aptes à prévenir l'apparition de signes de carence ou de toxicité, en relation avec certains facteurs de variation liés à l'aliment ou à l'animal, comme son stade physiologique.

2.1.3. Les fonctions du zinc

Entre 3 et 10% des protéines synthétisées par le génome des mammifères ont besoin de zinc pour leur structure ou l'expression de leurs fonctions (Andreini *et al.*, 2006 ; Hill et Link, 2009). Le zinc joue un rôle structurel dans les cellules, les ribosomes, les acides nucléiques et les enzymes telles que la phosphatase alcaline (PA), contenant quatre atomes de zinc par molécule, le superoxyde dismutase (SOD) à cuivre et zinc contenant deux atomes de zinc par molécule, la catalase, la peroxydase ou les « zinc finger proteins ». La PA hydrolyse les monoesters de phosphates et la SOD participe à la défense oxydative cellulaire par la transformation des ions superoxydes (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en oxygène (O_2). Le zinc (sphères argentées dans l'image ci-contre) stabilise la structure 3D des liaisons entre les protéines de transcription et l'ADN ou l'ARN. Cette structure est connue sous le nom de « zinc finger protein ».



Le zinc intervient comme catalyseur dans l'expression de plus de 300 enzymes des classes oxydoréductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérases et ligases. A travers ces différentes enzymes, le zinc joue un rôle dans la plupart des fonctions biologiques. Ces fonctions biologiques sont principalement la défense oxydative des membranes cellulaires, la défense immunitaire, la réplication et la transcription de l'ADN (polymérases) pour la croissance, le développement et la prolifération cellulaire, la synthèse des protéines, des lipides, des glucides, et la détoxification cellulaire d'autres métaux comme le mercure et le cadmium (Davis et Cousins, 2000).

Le zinc joue un rôle central dans la croissance, le développement et la prolifération cellulaire, car la réplication et la transcription de l'ADN nécessitent l'activité des enzymes polymérase et transcriptase qui dépendent du zinc (Shankar et Prasad, 1998). Les tissus qui prolifèrent rapidement, tels que les tissus épithéliaux de la peau, du tractus gastro-intestinal et des voies respiratoires seraient les plus sensibles à l'apport de zinc (Rink et Gabriel, 2001).

Le zinc est nécessaire pour le fonctionnement normal de la défense immunitaire et oxydative. Ce rôle du zinc s'explique par son implication précédemment mentionnée dans l'intégrité des tissus externes du corps, qui représentent la « première barrière défensive ». Il s'explique aussi par son implication dans le développement cellulaire de la moelle épinière, qui synthétise les leucocytes (Fraker *et al.*, 2000) et pour son implication dans l'activité des cellules monocytes hétérophiles ou neutrophiles (Rink et Gabriel, 2001). Les hétérophiles (volaille) ou neutrophiles (mammifères) sont les premiers à assurer la défense cellulaire, par phagocytose. L'expression de l'hormone thymuline, produite par les cellules épithéliales de la

glande thymique, impliquée dans la maturation des cellules T est aussi dépendante du zinc (Prasad, 2008).

2.1.4. La régulation du métabolisme du zinc

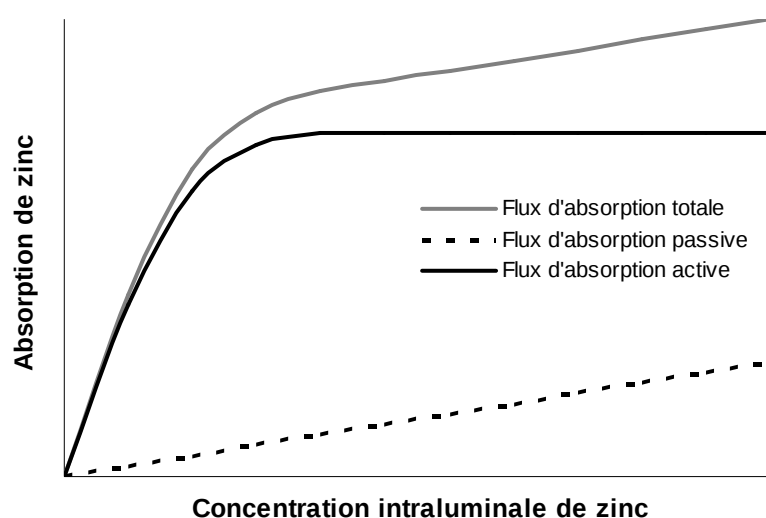
Tout comme pour de nombreux minéraux essentiels, le zinc corporel est soumis à une régulation visant l'homéostasie ou l'homéorhèse lorsqu'il y a accréation corporelle chez des animaux en croissance ou sécrétion via le lait ou l'œuf (Kirchgessner, 1993 ; 2004). Le système tend donc vers un statut en zinc équilibré permettant le bon fonctionnement métabolique, en dépit des contraintes extérieures, telles que par exemple, la variation de la quantité de zinc ingéré. La régulation homéostatique du zinc est principalement contrôlée par l'adaptation de son absorption intestinale, de son excrétion endogène fécale, qui résulte du niveau de sécrétion endogène intestinale et de sa réabsorption, et de sa mise en réserve / mobilisation dans des tissus et le squelette. Contrairement aux oligo-éléments anioniques, l'excrétion urinaire de zinc constitue une voie mineure d'élimination du zinc qui n'excède pas 1 à 2% de l'excrétion totale chez le porc (Adeola, 1995 ; Poulsen et Larsen, 1995). L'élément central de la régulation homéostatique du zinc se situe donc au niveau du système digestif, avec principalement l'intestin grêle, le foie et le pancréas (Krebs, 2000). Chez le rat adulte, quatre jours sont nécessaires pour adapter l'absorption réelle du zinc et environ sept jours sont nécessaires pour adapter son excrétion endogène fécale en réponse à un changement de concentration alimentaire de 58 mg à 2 mg Zn / kg d'aliment (Windisch, 2003).

a) Adaptation de l'absorption du zinc

L'absorption est définie comme étant la quantité d'un nutriment de l'aliment qui passe de la lumière digestive, à travers la muqueuse, dans la circulation portale. L'absorbabilité représente la proportion de l'absorption par rapport à la quantité du nutriment ingéré. L'intestin grêle est le principal site d'absorption du zinc chez la plupart des espèces animales. Chez le rat, l'absorption de zinc la plus intense se situe au niveau du duodénum, la section la plus courte de l'intestin grêle (Davies, 1980). Mais, compte tenu de la longueur des différentes sections, environ 20, 20 et 60% du zinc absorbé le seraient respectivement dans le duodénum, le jéjunum et l'iléon (Lonnerdal, 1989). Chez le poulet, le flux le plus important de zinc absorbé se situe également dans l'iléon (Yu *et al.*, 2008). Chez le poulet, le zinc pourrait même être absorbé au niveau du gésier (Swinkels *et al.*, 1994). Chez les mammifères (Krebs, 2000), comme chez l'oiseau (Yu *et al.*, 2008), le zinc est absorbé selon deux procédés. Le premier est un mécanisme d'absorption paracellulaire, passif et non saturable, qui dépend du gradient de concentrations intraluminal et interstitielle et le deuxième un mécanisme de transport

transcellulaire, actif et saturable. Le sens du flux paracellulaire est généralement orienté vers le secteur plasmatique, à l'exception de situations particulières comme les diarrhées. Chez les mammifères, la voie active est considérée comme prédominante (Miller *et al.*, 2007). Chez le poulet, Yu *et al.* (2008) ont mis en évidence une absorption principalement passive dans l'iléon, alors que le zinc serait absorbé par voie active dans le duodénum et le jéjunum. Lorsque la concentration intraluminaire de zinc augmente, le flux de zinc absorbé par voie passive augmente. Les deux procédés d'absorption du zinc sont schématisés à la figure 1.

Figure 1 Flux d'absorption passive, d'absorption active et d'absorption totale de zinc en fonction de sa concentration luminale.



L'absorption active de zinc s'effectue en plusieurs étapes : le zinc présent dans le milieu intraluminal entre dans l'entérocyte à travers la membrane apicale, migre à travers le cytoplasme, jusqu'à la membrane basale d'où il est transporté dans le système de circulation sanguine. Dans l'entérocyte, une partie du zinc est fixé aux métallothionéines (MT), protéines qui favorisent la captation du zinc intracellulaire et limitent son transfert vers le milieu intérieur. Chez le mammifère (Davis *et al.*, 1998) et l'oiseau (Yu *et al.*, 2008), la synthèse de MT dans l'entérocyte et autres tissus (foie, pancréas et reins) est induite par une augmentation de la teneur en zinc alimentaire. Les MT ne semblent pas indispensables à la survie, mais s'avèrent être un atout lorsque l'animal est sous stress, présente des inflammations, des infections, une consommation alimentaire faible ou un apport insuffisant ou excessif de zinc alimentaire (Davis et Cousins, 2000), car c'est une forme de réserve cellulaire de zinc rapidement mobilisable. Deux familles de transporteurs de zinc ont été identifiées ; les transporteurs ZnT « Zn^{2+} transporters » et Zip « Zn^{2+} and Fe^{2+} regulating proteins » qui ont des rôles opposés dans la régulation homéostatique du zinc cellulaire. Les transporteurs Zip (14 transporteurs identifiés) favorisent la présence de zinc intracellulaire en stimulant l'absorption cellulaire

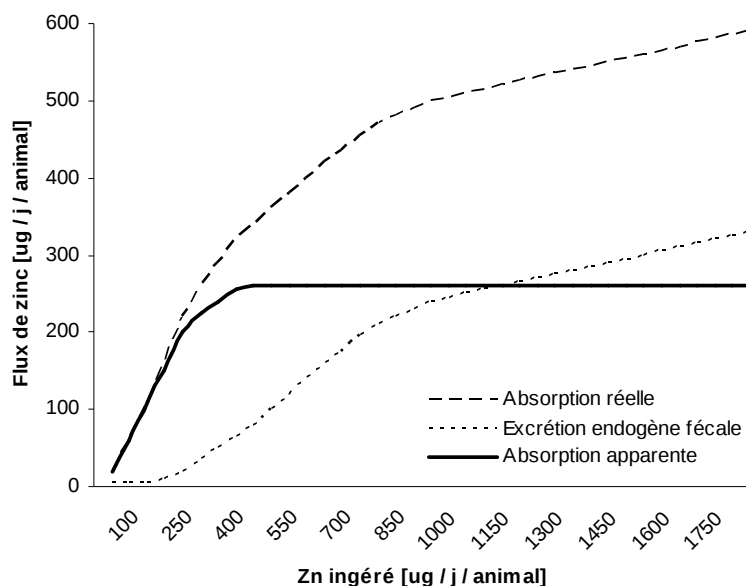
depuis le fluide extracellulaire ou les vésicules intracellulaires. Les transporteurs ZnT (10 transporteurs identifiés) stimulent la sécrétion de zinc dans des vésicules cellulaires ou en dehors de la cellule. ZnT-1 est responsable du transport du zinc de l'entérocyte vers la circulation sanguine (Liuzzi et Cousins, 2004). L'expression de ces transporteurs change en fonction de l'apport alimentaire de zinc. Lors d'une déficience en zinc, son absorption augmente grâce à l'accroissement du nombre de transporteurs Zip chez le mammifère (Swinkels *et al.*, 1994) comme chez le poulet (Yu *et al.*, 2008). Chez l'Homme, les sujets ayant consommé un supplément de 25 mg de zinc par jour ont présenté une présence de ZnT1, ZnT5 et Zip4 réduite au niveau iléal par rapport aux sujets sans supplément de zinc (Cragg *et al.*, 2005).

b) Adaptation de l'excrétion endogène fécale en zinc

Chez l'animal en croissance, l'excrétion endogène fécale est la principale voie de sortie du métabolisme pour le zinc. Les sécrétions endogènes intestinales de zinc proviennent des sécrétions gastriques et pancréatiques, de la bile, de la salive, de la muqueuse intestinale et des cellules intestinales. La part relative de ces différentes composantes dépend de la quantité de zinc ingéré : les sécrétions pancréatiques sont relativement importantes lorsque le zinc est apporté en faible quantité alors que la bile est prédominante lorsque l'apport de zinc alimentaire est excédentaire (Sullivan *et al.*, 1981). L'élimination continue des entérocytes par desquamation contribue aux sécrétions de zinc dans la lumière intestinale. Cette voie d'élimination est d'autant plus importante lorsque le zinc alimentaire est apporté en abondance et est séquestré par les MT dans l'entérocyte. Une partie du zinc endogène sécrété peut être réabsorbé par les mêmes voies que le zinc alimentaire.

L'adaptation combinée des sécrétions endogènes intestinales et de l'absorption du zinc alimentaire et endogène, rend possible un flux entrant de zinc net (absorption apparente = absorption réelle – excrétion endogène), stable sur une large palette de concentrations alimentaires de zinc (Figure 2).

Figure 2 Flux d'absorption réelle, apparente et excrétion endogène fécale de zinc selon la teneur en zinc alimentaire chez le rat en croissance (d'après Kirchgessner, 1993).



c) Transport, mise en réserve et mobilisation du zinc dans les tissus

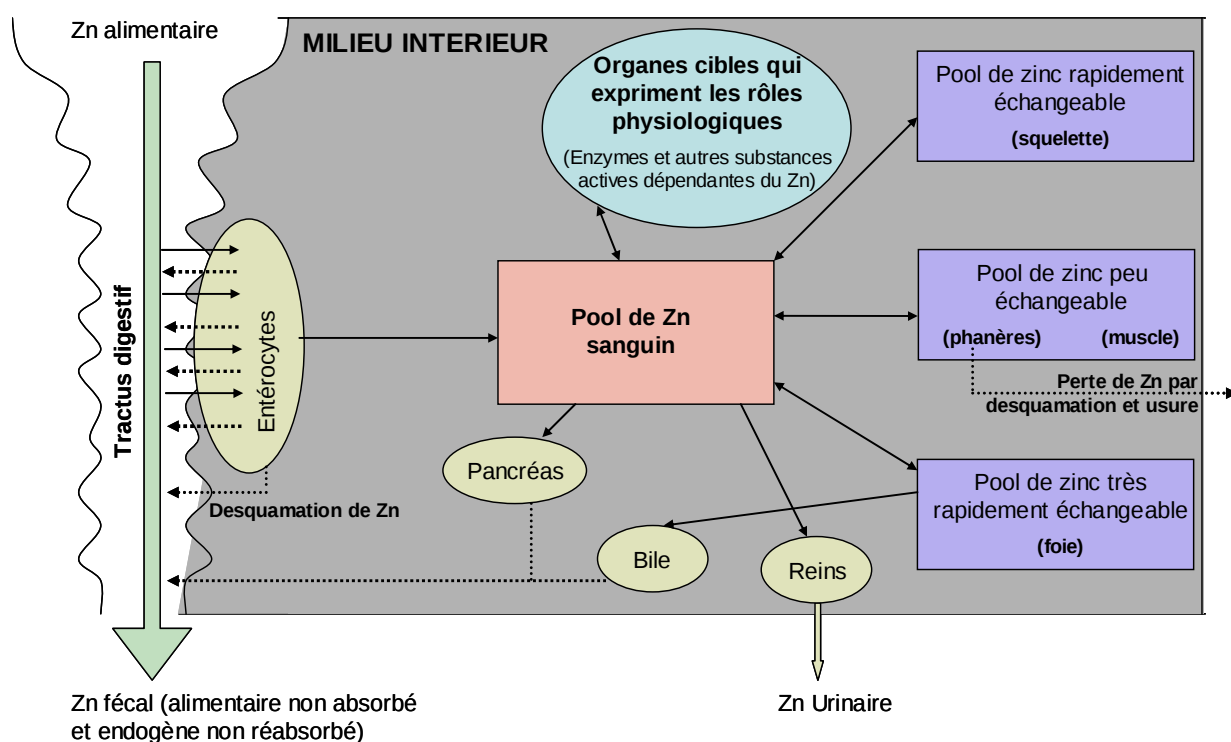
Le zinc est transporté par voie sanguine, principalement lié faiblement à l'albumine (65% du zinc plasmatique), fermement à l' α_2 -macroglobuline (30% du zinc plasmatique) et à d'autres protéines (5%), telles que la transferrine et la céruloplasmine. Le zinc plasmatique, lié à l'albumine, représente la source principale pour alimenter les tissus en zinc. Ces tissus sont en premier lieu le foie, puis les autres organes producteurs d'enzymes et de protéines dépendantes du zinc et / ou les tissus de stockage. Le foie, considéré à la fois comme organe de distribution de l'élément, de stockage et de détoxification (par la sécrétion via la bile) possède un turnover du zinc 5 à 6 fois plus élevé que les autres tissus. Il capte entre 30 et 40% du zinc plasmatique nouvellement absorbé (Rucker et al., 1994) qu'il stocke sous forme liée aux MT qu'il synthétise. Les tissus de stockage sont principalement les tissus musculaires et le squelette qui contiennent respectivement 60% et 30% du zinc corporel. Les 10% restants se trouvent distribués dans les entérocytes, les cellules épithéliales, le sang, le foie, les reins, les poumons, le cœur et le cerveau (Underwood et Suttle, 1999). La concentration de zinc la plus élevée se mesure dans l'œil, les testicules, le foie, le pancréas, le squelette et les phanères (Kirchgessner, 2004). Pour résumer, les différents flux corporels du zinc sont schématisés dans la Figure 3.

Lorsque l'apport alimentaire de zinc devient insuffisant, la mobilisation des réserves de zinc permet d'assurer les fonctions physiologiques dépendantes de cet élément jusqu'à leur épuisement. En cas de carence en zinc, le turnover métabolique diminue et la distribution de

zinc dans les différents tissus est réattribuée (Windisch et Kirchgessner, 1994a ; 1994b ; 1999b). Contrairement au zinc présent dans le muscle, le zinc présent dans l'os est largement mobilisable. En l'espace de 12 jours, la réserve osseuse de zinc a été diminuée de 20% chez le rat lorsque l'apport de zinc alimentaire a été réduit de 20,5 mg / kg à 1,4 mg / kg (Windisch et al., 2002). Dès que l'apport de zinc alimentaire est à nouveau suffisant pour permettre son accumulation, la concentration initiale de zinc dans l'os est progressivement rétablie. Lorsque le zinc alimentaire est en excès, le système s'inverse : l'absorption de zinc diminue, les sécrétions endogènes de zinc augmentent (Windisch et al., 2002).

Cette régulation peut être dépassée lorsque l'apport alimentaire de zinc est excessivement bas ou haut pour une période prolongée dépassant ainsi la capacité de l'animal à mobiliser ou déposer le zinc dans les organes de stockage. Dans ce cas, l'animal se situe dans une situation de carence ou de toxicité.

Figure 3 Schéma des flux corporels de zinc.



2.1.5. Les effets d'une carence en zinc

Avant que Tucker et Salmon (1955) ne montrent l'effet curatif du zinc sur la parakératose porcine, cette maladie sévissait dans de nombreux élevages nord-américains et européens. La parakératose était associée à des retards de croissance, voire une mortalité importante qui n'était pas sans conséquences économiques. De nos jours, les cas cliniques de parakératose sont devenus rares, voire inexistants sur les exploitations agricoles.

Les symptômes cliniques d'une carence en zinc, qui sont identiques chez la volaille et le porc, consistent en une détérioration généralisée d'un ensemble de fonctions liées aux rôles des différentes enzymes contenant du zinc. Ces symptômes sont réversibles par une supplémentation en zinc par voie alimentaire. Le risque d'apparition de symptômes de carence en zinc, survient tout particulièrement chez les jeunes animaux à consommation alimentaire encore faible et dotés d'un potentiel de croissance rapide, tels que le porcelet sevré ou le poulet de chair en début d'engraissement.

Chez le porc, la perte d'appétit est souvent l'un des premiers signes cliniques d'une carence en zinc. Les mécanismes sont mal connus, mais le zinc est un composant de la gustine, protéine impliquée dans l'acuité gustative (Arnaud et Favier, 1991). Des diarrhées peuvent être observées simultanément à cette perte d'appétit (Stevenson et Earle 1956). Elles s'expliquent par une diminution du renouvellement des entérocytes et de la taille des villosités. Ces dysfonctionnement contribuent aux retards de croissance observés lors d'une carence en zinc, mais n'en expliquent pas la totalité (Miller *et al.*, 1968 ; Swinkels *et al.*, 1996). La carence en zinc a un effet propre sur la croissance, en réduisant la synthèse protéique en raison de la diminution de l'activité des ADN et ARN polymérases dont il est cofacteur (Shankar et Prasad, 1998). Lors d'une carence sévère en zinc, la parakératose se manifeste. Chez le porc, des plaques rougeâtres, (Figure ci-contre) se couvrant par la suite de croûtes noirâtres, apparaissent, tout d'abord sur les parties inférieures des membres, puis sur l'ensemble du corps. Ces lésions peuvent aussi affecter la langue et l'œsophage (O'Dell *et al.*, 1958 ; Smith *et al.*, 1976). Chez le poulet, la parakératose se manifeste de manière semblable. Les lésions sont cependant moins visibles, car elles sont cachées par le plumage. Le



Photo : W. Windisch

développement des plumes est réduit et son taux de couverture est affecté (Sunde, 1972). Les rares plumes qui se développent ne possèdent pas de barbules ce qui empêche leur accrochage entre elles, donnant ainsi un aspect ébouriffé au plumage. Des signes de dyschondrodystrophie (courbure du tibiotarse et du tarsométatarse, raccourcissement des os

longs, déplacement des tendons jambiers caudaux) apparaissent également en cas de carence en zinc (Nielsen *et al.*, 1966 ; Letierrier *et al.*, 1998). Ce dernier symptôme n'est pas observé chez le porc, en raison de la structure et de l'irrigation sanguine différente des os entre les deux espèces. Les cas extrêmes de carence en zinc peuvent rapidement conduire à la mort de l'animal, lorsque ses réserves mobilisables de zinc ont été entièrement épuisées (Smith *et al.*, 1961).

Une carence en zinc réduit aussi la capacité de défense immunitaire et défense oxydative des cellules, par le dysfonctionnement progressif des activités enzymatiques, de la défense des hétérophiles ou neutrophiles et des macrophages et de l'intégrité des structures cellulaires liées au zinc (chapitre 2.1.3). Une carence prononcée en zinc provoque principalement une réponse réduite des anticorps, une atrophie du thymus (jusqu'à 50 %) et de la rate (jusqu'à 60 %) et une réduction de la production de lymphocytes. L'atrophie du thymus révèle la production chronique de glucocorticoïdes accélérateurs de l'autodestruction des lymphocytes.

2.1.6. Les effets d'un apport de zinc au-delà de la capacité de régulation homéostatique

Le zinc est également un élément toxique. Le seuil de tolérance est représenté par l'apparition des premiers symptômes d'un dérèglement de la capacité de régulation homéostatique du zinc par un apport excessif de zinc, principalement par voie orale. Les seuils de tolérance pour le zinc sont estimés à un apport de 500 mg / kg d'aliment chez la volaille et 1000 mg / kg d'aliment chez le porc, lorsque l'élément est mis à disposition sur une période de plusieurs semaines (National Research Council, 2005). Le niveau toxique (dose létale pour 50% de la population étudiée) est estimé à une concentration corporelle de 100 mg / kg.

Chez le porc, un apport de zinc excédant 1000 mg de Zn / kg d'aliment peut induire une déficience en fer et en cuivre et conduire à une anémie (Chesters, 1997). L'apport de 4000 mg de Zn / kg d'aliment durant 10 semaines a fortement réduit la teneur en fer hépatique (Cox et Hale, 1977) et l'apport de 5000 mg de Zn / kg d'aliment durant 20 semaines a réduit le poids des animaux et la teneur en cuivre sérique par rapport à une supplémentation de zinc en dessous de 500 mg / kg (Hill *et al.*, 1983). Chez le poulet un apport de 1000 mg de zinc / kg d'aliment n'a pas induit d'effet négatif sur la teneur en cuivre et fer hépatique (Sandoval *et al.*, 1999). L'apport de 4000 mg de Zn / kg d'aliment a par contre fortement réduit l'hémoglobiniémie et l'hématocrite (Southern et Baker, 1983). L'effet d'un apport élevé de zinc sur le fer et le cuivre n'est pas lié à une toxicité directe de l'élément zinc, mais à un antagonisme au niveau des sites d'absorption ou à l'induction de MT, qui lie non seulement le zinc, mais d'autres cations divalents, comme le cuivre et le fer (chapitre 2.2.3).

Chez le porcelet sevré, l'apport minimum de 2000 mg de Zn sous forme d'oxyde / kg d'aliment durant une quinzaine de jours permet de prévenir les diarrhées consécutives au sevrage en stabilisant la flore intestinale (Poulsen, 1989 ; Hahn et Backer, 1993 ; Carlson *et al.*, 1999 ; Hill *et al.*, 2001). Cet apport pharmacologique de zinc est très répandu à travers le monde, mais il est interdit dans l'Union Européenne et en Suisse. Une telle supplémentation de zinc sous forme d'oxyde est effectuée sur une période courte, ce qui limite fortement le risque d'apparition de symptômes d'un dérèglement de la capacité de régulation homéostatique du zinc (National Research Council, 2005). La forme oxyde est principalement utilisée, car sa solubilité serait plus faible que la forme sulfate et son absorption réduite. Ainsi, l'utilisation de la forme oxyde par rapport à la forme sulfate serait moins sujette à une intoxication en zinc. De plus, la concentration en zinc de la forme oxyde est plus élevée que la forme sulfate, ce qui nécessite moins de place dans la formule de l'aliment. Selon Katouli *et al.* (1999), l'effet positif de l'apport de zinc se manifesterait par le maintien de la diversité des coliformes, plutôt que par la diminution du nombre d'*Escherichia coli*. Cependant, l'oxyde de zinc protège les cellules intestinales *in vitro* en empêchant l'adhésion d'*Escherichia coli* (Roselli *et al.*, 2003) et la stimulation de la croissance par le zinc s'additionne à celle obtenue par l'addition d'antibiotiques dans l'alimentation (Mavrochalis *et al.*, 2000 ; Hill *et al.*, 2001). Les mécanismes d'action du zinc sur la réduction des apparitions de diarrhées et la croissance ne sont pas élucidés. Le zinc stimulerait la consommation d'aliment (Hahn et Baker, 1993) et aurait un effet direct sur la croissance en améliorant l'indice de consommation (Mavrochalis *et al.*, 2000 ; Hill *et al.*, 2001). Jensen-Waern *et al.* (1998) ont suggéré une amélioration de la digestion des aliments consécutive à la stabilisation de la flore intestinale qui n'a toutefois pas été confirmée (Hedemann *et al.*, 2006). L'effet du zinc sur la morphologie intestinale est également controversée, car Li *et al.* (2001) ont mesuré une augmentation de la hauteur des villosités et une diminution de la profondeur des cryptes sur l'ensemble de l'intestin grêle, tandis que Li *et al.* (2006) n'ont mesuré que l'effet sur la hauteur des villosités et Hedeman *et al.* (2006) n'ont mesuré aucun effet sur ces paramètres. Les plus récentes hypothèses sur le mode d'action d'un apport élevé de zinc s'orientent d'une part vers une perméabilité intestinale réduite (Rodriguez *et al.*, 1996 ; Carlson *et al.*, 2006 ; Feng *et al.*, 2006) et d'autre part vers une sécrétion réduite d'eau et d'ions chlorures (Carlson *et al.*, 2007). L'effet réducteur du zinc sur cette sécrétion serait exercé depuis le milieu intérieur impliquant, selon les auteurs, l'absorption préalable du zinc au niveau cellulaire. Il n'est pas exclu que cette absorption cellulaire soit totalement passive. Toutes ces hypothèses sont dirigées sur l'eubiose de la flore intestinale, la morphologie de la paroi intestinale et sur les sécrétions induites par une concentration de zinc élevée dans les entérocytes. De ce fait, les effets d'un apport élevé de zinc seraient indépendants de toute régulation homéostatique.

Chez le poulet de chair, il n'existe aucun élément démontrant que l'apport de zinc alimentaire au-delà de 500 mg / kg, puisse être utilisé en tant que facteur de croissance (Oh *et al.*, 1979 ; Dewar *et al.*, 1983 ; Henry *et al.*, 1987 ; Wedekind *et al.*, 1992).

2.1.7. Le besoin en zinc et les recommandations d'apport alimentaire

Le besoin d'un élément essentiel, tel que le zinc, peut être défini comme l'apport alimentaire nécessaire pour satisfaire l'ensemble des fonctions physiologiques qui lui sont liées (Windisch and Ertle, 2008).

Il existe deux méthodes principales de détermination des besoins en nutriments : la méthode empirique et la méthode factorielle.

Le besoin en zinc est estimé, chez le poulet et le porc, à l'aide de la méthode empirique. C'est une approche globale de mesure de l'utilisation du zinc par l'animal. A l'aide d'une augmentation progressive des apports de zinc alimentaire, la méthode consiste à déterminer le niveau de zinc nécessaire, pour maximiser ou minimiser un ou plusieurs paramètres de mesure appropriés. La réponse est souvent modélisée, pour le zinc, selon un modèle linéaire-plateau (Kirchgessner, 1993). L'estimation du besoin en zinc est ainsi directement liée au principe de régulation homéostatique présenté précédemment (chapitre 2.1.4), qui conduit à la stabilité de la réponse au-delà des apports nécessaires à sa maximisation (Windisch et Kirchgessner, 1994b ; 1995b). Toutefois, l'approche factorielle d'estimation du besoin en zinc a été proposée chez le rat en croissance (Weigand et Kirchgessner, 1977) et chez la vache laitière (Underwood et Suttle, 1999). Cette méthode consiste à faire la somme des besoins d'entretien et de production (croissance, gestation, lactation), pour un stade physiologique donné. Les besoins d'entretien correspondent aux pertes endogènes minimales. Ces chercheurs ont estimé, par la méthode factorielle, le besoin net du zinc pour le rat et le ruminant. Pour définir le besoin brut en zinc, niveau requis pour pouvoir être appliqué en pratique, Underwood et Suttle (1999) ont fixé le coefficient d'absorption réel du zinc à 70% pour la vache adulte et à 85% pour le veau. Ce coefficient a toutefois été revu à la baisse avec 20% pour la vache adulte et 50% pour le veau (National Research Council, 2001). Cependant, cette approche ne tient pas compte de la relation qui existe entre l'absorption apparente et le niveau d'apport de zinc. Weigand et Kirchgessner (1977) ont d'ailleurs mis en garde sur ce point et ont proposé un coefficient d'absorption apparent du zinc fixe, applicable uniquement à une alimentation spécifique du rat de laboratoire. La variabilité importante de l'absorption apparente du zinc entre un apport déficient et conforme au besoin de l'animal est probablement la raison majeure qui a empêché l'implantation de l'approche factorielle pour estimer le besoin en zinc. Chez le poulet, on peut ajouter la difficulté liée à l'excrétion par la

même voie des urines et des fèces, qui rend quasiment impossible l'estimation de l'absorption intestinale. Les critères de réponses adéquats pour estimer le besoin en zinc alimentaire chez le poulet et le porcelet, selon l'approche empirique seront traités dans le chapitre 2.4.

Les recommandations d'apport de zinc (Tableau 1) sont des suggestions, ayant pour but d'assurer une ingestion suffisante de zinc dans des situations conformes aux pratiques d'élevage dans une zone géographique donnée. Les recommandations d'apport de zinc intègrent le niveau de zinc nécessaire pour maximiser différents critères. Elles sont applicables à une catégorie d'animaux donnée et peuvent également contenir une marge de sécurité. Les paramètres utilisés pour définir le besoin en zinc et le niveau de la marge de sécurité peuvent être différents entre organismes prescripteurs. L'introduction d'une marge de sécurité est souvent justifiée pour la prise en compte des variabilités afférentes par exemple à la variation attendue des teneurs en zinc des matières premières contenues dans l'aliment ou à l'écartement des individus présents dans un troupeau par rapport à l'individu moyen. Les marges de sécurité sont supposées couvrir des variations normales et non des situations extrêmes. National Research Council (1994 ; 1998), une référence utilisée au niveau mondial, ne prend pas de marge de sécurité en compte et décrit sa valeur comme une estimation du besoin en zinc. Il ne précise toutefois pas sur quel(s) paramètre(s) elle repose. National Research Council (1998) insiste pour que l'utilisateur puisse ajouter une marge de sécurité, s'il l'estime nécessaire. Les organismes allemand Gesellschaft für Ernährung (2003 ; 2006) et français Institut National de la Recherche Agronomique (1989) incluent une marge de sécurité dans leur estimation, menant ainsi directement à une recommandation d'apport. En Suisse, Agroscope (1994) recommande une supplémentation en zinc. Notons que plus la région à laquelle les valeurs publiées par les organismes sont destinées est petite, plus la quantité de facteurs présentant une certaine homogénéité, semble avoir été prise en compte. La Suisse a même déduit la teneur en zinc natif attendue (25 mg Zn / kg d'aliment) d'une ration alimentaire majoritairement utilisée chez le porc à base de céréales à paille et de tourteau d'oléagineux pressé. Ceci à l'avantage de simplifier largement son application. Mais cela rend la recommandation rigide au point que toute nouvelle mesure visant à améliorer l'efficacité d'utilisation du zinc est rendue difficile (chapitre 2.2). Malgré ces concepts différents, les recommandations d'apport en zinc sont cohérentes entre elles.

Tableau 1 Estimation des besoins en zinc et recommandations d'apport de zinc chez le poulet et le porcelet sevré, selon différents organismes scientifiques [mg / kg d'aliment].

Poulet de chair		Porcelet sevré	
Organisme ¹⁾		Organisme ¹⁾	Poids 5-10 kg Poids 10-25 kg
		Agroscope 1994 ²⁾	+75 +75
GfE 1999	40 - 60	GfE 2006	80 - 100 80 - 100
INRA 1989	40	INRA 1989	100 100
NRC 1994	44	NRC 1998	110 88

¹⁾ GfE: Gesellschaft für Ernährung, NRC: National Research Council

INRA: Institut National de la Recherche Agronomique

²⁾ Supplémentation en Zn

La teneur en zinc natif dans les rations usuelles pour ces deux catégories d'espèces est située entre 25 et 45 mg / kg. Se référant aux recommandations officielles citées, une supplémentation en zinc peut s'avérer nécessaire chez le poulet et l'est systématiquement chez le porcelet.

2.1.8. Les sources de zinc sous forme inorganique

Les sources de zinc sous forme inorganique utilisées en alimentation animale sont principalement représentées par l'oxyde de zinc (ZnO) et le sulfate de zinc hydraté (ZnSO₄ [H₂O]_n). L'alimentation animale utilise principalement le sulfate de zinc heptahydraté. La liaison entre l'ion métal et le ligand est ionique. L'oxyde de zinc est plus utilisé que le sulfate (surtout chez le porcelet), en raison de sa teneur en zinc plus élevée (teneur moyenne en Zn de 72% comparée à 36%), sa moindre réactivité avec d'autres ingrédients dans les aliments (vitamines, enzymes,...) et son prix au point métal plus avantageux. En revanche, les caractéristiques du ZnO, telles que la granulométrie, la couleur, la concentration de zinc peuvent présenter une variabilité plus importante que celles du ZnSO₄. En ce qui concerne la teneur en métaux lourds, un seul lot de ZnSO₄ a été analysé avec une teneur en cadmium au dessus du seuil réglementaire de 10 mg / kg entre 2005 et octobre 2009, puis mis en alerte par des laboratoires de l'Union Européenne (RASSF, 2009).

2.1.9. Les sources de zinc sous forme organique

Les sources de zinc sous forme organique représentent les composés où l'ion zinc est lié à une molécule contenant de l'azote. Cette molécule est en général un acide aminé, un peptide ou une protéine. Il existe également des sources de zinc inorganiques enrobées ou séquestrées par une matrice d'hydrates de carbones. Ces produits sont également considérés comme sources de zinc sous forme organique. Les termes suivants sont utilisés pour nommer

les sources de zinc sous forme organique : *complexe*, *chélate*, *protéinate* ou *polysaccharidate*. D'un point de vue chimique, un composé résultant de l'association d'un ion métallique et d'un ou plusieurs ligands est défini comme un *complexe*. Le *chélate* est une forme spécifique d'un complexe caractérisée par une organisation en tenaille des ligands autour du ion métallique (du grec *chela* : pince). La transformation d'un complexe en chélate et vice-versa, dépend principalement du pH du milieu. Le *polysaccharidate* est une forme de zinc inorganique séquestrée. Les sources de zinc sous forme organique contiennent généralement entre 10% et 25% de zinc. Entre 2005 et octobre 2009, aucun lot de zinc sous forme organique n'a été mis en alerte par les laboratoires de l'Union Européenne (RASSF, 2009) pour des teneurs en métaux lourds supérieures aux seuils réglementaires.

Comme indiqué, les paramètres de mesures considérés pour estimer le besoin en zinc alimentaire sont variable entre les organismes. La majorité des organismes tiennent compte des facteurs animaux, tels que âge / poids et stade de lactation / gestation, mais ne tiennent pas compte des facteurs alimentaires. Les matières premières et les additifs utilisés en alimentation animale peuvent influencer la qualité du zinc alimentaire en le rendant plus ou moins disponible pour l'animal. Ainsi, la présentation des paramètres de mesures adéquats pour estimer le besoin en zinc et des facteurs alimentaires qui influencent la biodisponibilité du zinc est nécessaire. Ces thèmes sont traités dans les chapitres 2.2. et 2.3.

2.2. Critères de mesure pour estimer le besoin en zinc ou la biodisponibilité de sources de zinc in vivo

Un critère adéquat pour évaluer le besoin en zinc doit répondre à des exigences de sensibilité et de spécificité qui doit en faire le reflet fidèle du statut en zinc de l'animal (Swinkels *et al.*, 1994). Il doit baisser rapidement lors de carences modérées, augmenter avec la supplémentation de l'aliment et se stabiliser au fur et à mesure que le statut en zinc est restauré. Il ne doit pas être modifié lors de situations physiologiques ou pathologiques autres que celles liées à l'apport de zinc. L'apport alimentaire qui permet la stabilisation varie suivant le critère de réponse choisi.

Un critère adéquat pour estimer la biodisponibilité de sources de zinc (définition au chapitre 2.3) doit répondre aux mêmes exigences que ceux qui permettent d'estimer le besoin en zinc. Le paramètre le plus approprié est celui qui répond linéairement et de façon sensible sur la plus grande marge d'apport de zinc alimentaire. En effet, une des difficultés principales est de formuler un aliment supplémenté avec les sources de zinc étudiées, sans atteindre le plateau des critères d'évaluations choisis.

Différents critères ont été utilisés pour évaluer le besoin en zinc des animaux d'élevage ou la biodisponibilité de sources de zinc. En plus du bilan de zinc, ils font référence à des fonctions dans lequel le zinc est impliqué : performances de croissance, défense immunitaire, concentration de zinc, activité de certaines enzymes ou expression de certains gènes mesurée dans certains fluides, organes ou tissus. Sur la base de trois expériences sur porcelets sevrés, Revy (2003) a établi a comparé différents indicateurs du statut en zinc à partir du coefficient de détermination et de l'écart type résiduel de leur réponse à un apport croissant de zinc, dans le domaine de linéaire (Tableau 7). Les critères d'évaluation du besoin et de la biodisponibilité de sources de zinc proposés chez le poulet et le porc sont résumés au tableau 7.

2.2.1. Utilisation des performances de croissance comme indicateur du statut en zinc

Les critères de performance de croissance (consommation d'aliment, gain de poids ou vitesse de croissance, indice de consommation) ne sont pas spécifiques de l'apport de zinc alimentaire, car, même si une carence en zinc peut induire des retards de croissance décrits au chapitre 2.1.5, ils sont souvent multifactoriels et leur intensité est sensible aux conditions environnementales. L'apport de zinc pour maximiser les performances de croissance est inférieur à celui qui permet de maximiser la teneur en zinc plasmatique ou la teneur en zinc de l'os. Sur les périodes assez courtes d'expérimentation mises en œuvre lors d'études de

biodisponibilité, il peut arriver que les performances de croissance ne répondent pas à l'apport de zinc, si l'animal a assez de réserves. En ce sens, les performances de croissance ne sont pas représentatives du statut en zinc de l'animal et ne constituent pas un critère d'évaluation des sources alimentaires de zinc.

Chez le porcelet sevré, certains auteurs ont tenté d'estimer la biodisponibilité relative de différentes sources de zinc en apportant le zinc à des niveaux pharmacologiques. Pour certaines expériences, aucun effet de facteur de croissance n'a été observé avec l'apport de 3000 mg de zinc par kg d'aliment (Schell et Kornegay, 1996 ; Rincker *et al.*, 2005), car la pente de la réponse à l'apport de zinc avec la source de référence ne différait pas de zéro. Cela annule la possibilité de comparaison de pente entre deux source de supplémentation de zinc. Pour la majorité des expériences (Case et Carlson, 2002 ; Carlson *et al.*, 2004 ; Buff *et al.*, 2005 ; Hollis *et al.*, 2005 ; Woodworth *et al.*, 2005 ; Mullan *et al.*, 2002), l'apport des sources de zinc sous forme organique étudiées était de l'ordre de six fois inférieur à celui de la source de référence (500 vs 3000 mg de Zn / kg d'aliment), rendant une comparaison de « pente » pour le moins hasardeuse. Seul Hahn et Baker (1993) ont comparé à dose identique (3000 mg de Zn / kg d'aliment) une source de zinc méthionine avec l'oxyde de zinc. Ces auteurs ont rapporté une meilleure performance de croissance avec l'utilisation d'oxyde de zinc. Toutefois, cette étude, si elle met en évidence une différence de réponse entre les sources, ne permet pas de conclure quant à la disponibilité de l'une par rapport à l'autre. En effet, comme indiqué au chapitre 2.1.6, le mode d'action probable du zinc apporté à doses pharmacologiques ne fait pas intervenir de phénomènes liés à la disponibilité. En particulier, il serait hasardeux de vouloir appliquer les valeurs de « biodisponibilité relative » obtenues dans ce type d'expérimentation à des aliments formulés au niveau du besoin des animaux.

Chez le poulet, en plus des critères de performance, la mortalité a été mesurée lorsque des sources de zinc sous forme organique ont été étudiées (Swiatkiewicz *et al.*, 2001 ; Dozier *et al.*, 2003 ; Pancosma, unpublished b ; Burrell *et al.*, 2004 ; Hudson *et al.*, 2004 ; Hudson *et al.*, 2005 ; Nollet *et al.*, 2007 ; Peric *et al.*, 2007). Aucun des auteurs n'a constaté de réponse de la mortalité en fonction du niveau d'apport en zinc. Ce critère ne répond pas de manière spécifique à l'apport de zinc alimentaire et est donc inadéquat pour étudier le besoin en zinc alimentaire ou la biodisponibilité de sources de zinc.

2.2.2. Zinc absorbé et bilan de zinc comme indicateurs du statut en zinc

Le bilan de zinc est défini comme quantité de zinc retenue sur une période de temps. Il peut être estimé comme la différence entre les quantités ingérées et excrétées, on parle alors de bilan métabolique, ou par différence entre les quantités de zinc corporelles mesurées chez des animaux abattus en fin d'expérimentation et en début d'expérimentation. Dans ce dernier cas on parle de la technique des abattages comparés. Chez le porc, où urine et fèces peuvent être collectées séparément, la technique du bilan métabolique permet de plus d'avoir accès aux quantités de zinc apparemment absorbées en fonction de l'ingestion.

Souvent, la technique des bilans métaboliques, moins lourde que la technique des abattages comparés est mise en œuvre. Pourtant, compte tenu de la faible absorption du zinc, une petite erreur dans l'estimation de l'excrétion conduit à des erreurs importantes sur la valeur du bilan (Revy, 2003).

En dépit de cette variabilité, un bilan métabolique conduit par Revy *et al.* (2002) sur des porcelets sevrés recevant quatre aliments contenant 28 à 58 mg de zinc / kg a permis d'établir une relation linéaire entre les quantités de zinc ingérées et retenues. Les coefficients de détermination (0,65) et de variation résiduelle (17%) de cette relation permettent de classer le bilan parmi les indicateurs possibles pour entreprendre l'estimation de la biodisponibilité de sources de zinc, bien que moins précis que des critères tels que la teneur en zinc de l'os ou du plasma (Revy, 2003). En définitive, ces bilans ont été utilisés surtout pour estimer les rejets de zinc par les animaux d'élevage. Chez le porc dont le besoin en zinc est couvert, des équations établissant la relation entre le poids vif et le zinc corporel (Mahan et Shields, 1998) permettent de prédire les quantités de zinc excrétées par les porcs suivant leurs performances (Jondreville *et al.*, 2003 ; Dourmad et Jondreville, 2007).

2.2.3. Critères de concentration de zinc et de métallothionéines dans les fluides, les organes et les tissus.

Chez le porc, comme chez le poulet, la teneur en zinc plasmatique augmente linéairement avec l'apport de zinc puis atteint un plateau (Hauter 1994 ; Mohanna et Nys, 1999a ; Suzaki *et al.*, 1999 ; Pancosma unpublished a ; Pancosma unpublished b ; Revy *et al.*, 2006). Selon Revy (2003), le coefficient de détermination et le coefficient de variation résiduelle de la relation linéaire entre zinc plasmatique et apport alimentaire de zinc chez le porcelet sevré sont situés respectivement aux alentours de 0,85 à 0,90 et de 14 à 20%, ce qui place ce critère parmi les plus pertinents pour refléter le statut en zinc des animaux.

Selon Revy (2003), la teneur en zinc hépatique augmente de façon exponentielle avec l'apport de zinc, avec des coefficients de détermination et de variation résiduelle situés,

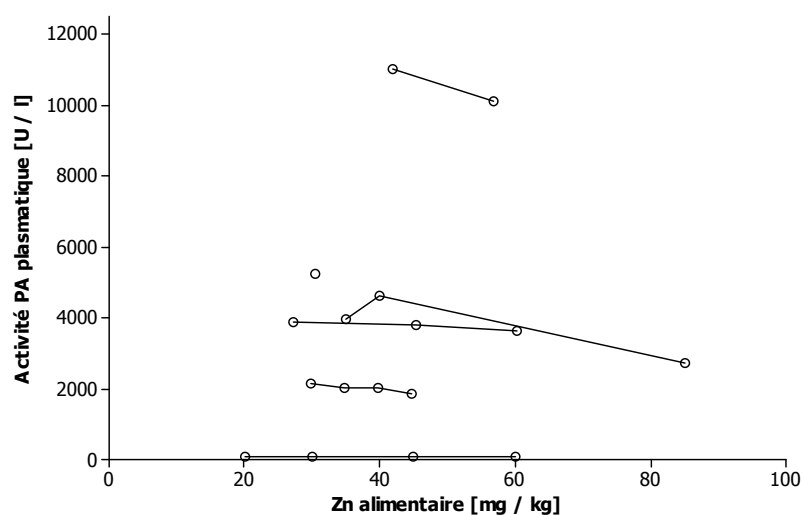
respectivement aux alentours de 0,75 à 0,85 et de 19 à 27%. La teneur en zinc dans le pancréas, le rein, la paroi intestinale, la muqueuse intestinale, ou celle des métallothionéines contenues dans ces tissus augmente en fonction de l'apport alimentaire de zinc, sans atteindre de niveau de stabilité connu (Pimentel *et al.*, 1991 ; Sandoval *et al.*, 1997 ; Sandoval *et al.*, 1998 ; Sandoval *et al.*, 1999 ; Cao *et al.*, 2002 ; Revy, 2003 ; Huang *et al.*, 2007). Ces organes, tissus et cette protéine sont, dans la cadre de la régulation homéostatique du zinc, principalement liés aux fonctions de distribution du zinc affluant (paroi et muqueuse intestinale, foie) et de sécrétion du zinc (pancréas, reins, paroi et muqueuse intestinale). L'utilisation de ces paramètres a été proposée pour étudier la biodisponibilité de sources de zinc supplémentées à 1000 mg / kg chez le poulet (Sandoval *et al.* ; 1997 ; 1998 ; 1999) et jusqu'à 3000 mg / kg chez le porcelet (Martinez *et al.*, 2004). Selon Ammerman *et al.* (1995) de tels niveaux d'apport sont appropriés pour la détermination de la biodisponibilité relative de sources de zinc car le niveau d'apport par la ration de base est négligeable par rapport à celui des sources de supplémentation. Cependant, l'augmentation des concentrations de zinc et de métallothionéines dans le foie, le pancréas, les reins, la paroi ou les muqueuses intestinales reflète davantage la capacité du métabolisme à éliminer le zinc excédentaire que sa capacité à utiliser, pour des besoins physiologiques, le zinc absorbé. Dans ce cadre, on peut douter que la réponse obtenue avec des niveaux d'apports élevés soit représentative de la réponse obtenue avec des niveaux d'apport physiologiques. Avec un apport élevé de zinc alimentaire, ces indicateurs ne sont donc pas adéquats pour étudier la biodisponibilité (telle que définie dans le chapitre 2.2.1) de sources de zinc. Avec un apport de zinc en subcarence, ces paramètres ne présentent pas d'avantages connus par rapport aux paramètres utilisés couramment, comme la teneur en zinc plasmatique ou de l'os.

La teneur en zinc de l'os, site majeur de stockage corporel, est un indicateur fiable du statut en zinc, corrélé à l'apport alimentaire de zinc (Hill *et al.*, 1986 ; Wedekind *et al.*, 1994 ; Mohanna et Nys, 1998 ; Revy, 2003). Chez le porcelet sevré, Revy (2003) a établi que le coefficient de détermination et le coefficient de variation résiduelle de la relation linéaire entre teneur en zinc de l'os et l'apport alimentaire de zinc sont situés respectivement aux alentours de 0,85 et de 16%. Ceci fait que, comme la teneur en zinc du plasma, la teneur en zinc de l'os un indicateur de choix pour comparer des sources de zinc. La teneur en zinc de l'os, qui plafonne pour des apports alimentaires supérieurs à ceux nécessaires à l'optimisation des performances de croissance est souvent utilisée pour déterminer les besoins des animaux. Selon Wedekind *et al.* (1992 ; 1994), lorsque la teneur en zinc de l'os est maximisée, on peut estimer que les besoins physiologiques, y compris ceux qui permettent l'expression des défenses immunitaires, sont couverts.

2.2.4. Critères d'activités enzymatiques

L'activité d'enzymes contenant du zinc structurel ou utilisant le zinc comme cofacteur est supposée être diminuée en cas d'apport réduit en zinc alimentaire. Chez le porc, Revy (2003) a établi que les coefficients de détermination et de variation résiduelle de la relation linéaire entre l'activité de la PA plasmatique et l'apport alimentaire de zinc sont situés respectivement aux alentours de 0,70 à 0,90 et de 15 à 20%. Au contraire, chez le poulet, l'activité de la phosphatase alcaline plasmatique semble indépendante de l'apport alimentaire de zinc (Watkins *et al.*, 1993 ; Hauter 1994 ; Mohanna et Nys, 1999a ; Gebert *et al.*, 2003 ; Pancosma unpublished b) (Figure 4).

Figure 4 Activité de la PA plasmatique chez le poulet en fonction du zinc alimentaire (d'après Watkins *et al.*, 1993 ; Hauter 1994 ; Mohanna et Nys, 1999a ; Gebert *et al.*, 2003 ; Pancosma unpublished b). Chaque point correspond à un traitement, les points liés correspondent à une expérience.



La réponse de l'activité de la 5'nucléotidase sérique à des apports croissants de zinc alimentaire a récemment été étudiée chez le poulet (Huang *et al.*, 2007). Ces auteurs ont établi que l'activité de cette enzyme répond de façon quadratique ($R^2 = 0,88$) à un apport croissant de zinc alimentaire entre 28 et 168 mg / kg avec une réponse maximale aux alentours de 80 mg Zn / kg aliment.

2.2.5. Critères de défense immunitaire

Wedekind *et al.* (1994a) suggèrent que, si la teneur en zinc de l'os du porc est maximisée, alors les fonctions reproductives et immunitaires le sont aussi. Van Heugten *et al.* (2003) ont conclu que la défense immunitaire de porcelets sevrés est garantie avec 100 mg / kg de zinc alimentaire, à l'exception de la présence de macrophages qui tend à augmenter avec un apport de zinc alimentaire de 260 mg / kg, comparé à 104 mg / kg. La présence de

macrophages n'a toutefois pas été influencée entre l'apport alimentaire de 104 à 184 mg Zn / kg. Sun *et al.* (2009) n'ont pas observé de changement dans la prolifération des lymphocytes sanguins lorsque les porcelets recevaient un aliment contenant entre 37 et 157 mg de Zn / kg. Chez le poulet, les poids du thymus, de la rate et de la bourse de Fabricius répondent à un apport croissant de zinc alimentaire jusqu'à environ 70 mg Zn / kg (Pimentel *et al.*, 1991 ; Sunder *et al.*, 2004 ; Feng *et al.*, 2009). Bartlett et Smith (2003) n'ont cependant pas observé de tels effets. Selon Stahl *et al.* (1989), Pimentel *et al.* (1991) et Mohanna et Nys (1999a), la concentration de la totalité des immunoglobulines circulantes ne répond pas à l'apport en zinc alimentaire jusqu'à 88 mg Zn / kg, mais selon Sunder *et al.* (2003), augmente dès l'apport de 80 mg / kg. Lorsque l'apport alimentaire se situe entre 30 et 80 mg Zn / kg d'aliment, le statut en immunoglobulines totales circulantes des animaux était toutefois nettement plus bas chez Sunder *et al.* (2003) que chez Mohanna et Nys (1999a). Lorsque certaines immunoglobulines (IgG et IgM) sont étudiées, leurs concentrations répondent avec l'apport de zinc alimentaire et atteignent leur niveau de plateau vers 60 – 90 mg Zn / kg d'aliment (Bartlett et Smith, 2003 ; Feng *et al.*, 2009). L'activité de phagocytose des macrophages répond à un apport croissant de zinc alimentaire (Kidd *et al.*, 1994 ; Bartlett et Smith, 2003). L'infection du tissu cutané et sous-cutané (cellulite) du poulet n'est pas un paramètre spécifique du statut de zinc, mais le taux de cette infection a baissé de 50 à 40% avec un apport de zinc alimentaire passant de respectivement 90 à 130 mg / kg (Downs *et al.*, 2000).

La réponse de critères indicatifs du statut immunitaire à l'apport de zinc alimentaire chez le porc et chez le poulet est résumée au tableau 2. Les références récentes confirment la suggestion de Wedekind *et al.* (1994a) selon laquelle la quantité en zinc nécessaire pour assurer les fonctions immunitaires chez le porcelet, ne dépasse pas celui qui permet de maximiser la teneur en zinc de l'os. A ce jour, les paramètres de défense immunitaire ne peuvent pas être considérés comme pertinents pour mesurer la biodisponibilité de sources chez le porc, car aucun des paramètres mesurés ne répond de manière linéaire à l'apport alimentaire de zinc. Chez le poulet, les études indiquent que 60 à 90 mg de zinc / kg d'aliment seraient nécessaires pour atteindre des taux maximaux en immunoglobulines G et M. La quantité de zinc nécessaire qui permet de maximiser des critères du statut en zinc tels que la teneur en zinc de l'os, s'élève également entre 60 (Swiatkiewicz *et al.*, 2001 ; Pancosma unpublished b ; Huang *et al.*, 2007 ; Bao *et al.*, 2007) et 90 mg / kg d'aliment (Wedekind *et al.*, 1992 ; Cao *et al.*, 2000). De ce fait, les critères de réponse immunitaire peuvent être recommandés dans des études de besoin en zinc alimentaire chez le poulet, en complément de critères pertinents, tels que la teneur en zinc plasmatique ou la teneur en zinc de l'os. Cependant, la pertinence des critères de défense immunitaires mentionnés n'a pas encore été établie à l'aide de plusieurs expériences comparables.

Tableau 2 Résumé de la réponse des critères d'évaluation du statut immunitaire à l'apport alimentaire de zinc chez le poulet et le porc.

Paramètre	Réactif	Espèce	Traitements	Niveaux étudiés [mg Zn / kg aliment]		Réponse	Réponse max ou plateau [mg Zn / kg aliment]	Source
			n°	minimum	maximum			
Poids organes								
Thymus	-	Poulet	5	28	148	linéaire - plateau	30 - 60	Feng et al., 2010
	-	Poulet	3	34	181	non		Bartlett et al., 2003
	-	Poulet		8	88	linéaire - plateau	8 - 30	Pimentel et al., 1991
Rate	-	Poulet	5	28	148	linéaire - plateau	30 - 60	Feng et al., 2010
	-	Poulet	7	30	350	linéaire - plateau	50 - 70	Sunder et al., 2004
	-	Poulet	3	34	181	non		Bartlett et al., 2003
	-	Porcelet	3	104	260	non		Van Heugten et al., 2003
Glande bourse de Fabricius	-	Poulet	5	28	148	linéaire	148	Feng et al., 2010
	-	Poulet	7	30	350	linéaire - plateau	20 - 40	Sunder et al., 2004
	-	Poulet	3	34	181	non		Bartlett et al., 2003
	-	Poulet		8	88	linéaire - plateau	8 - 30	Pimentel et al., 1991
Teneur en zinc								
Rate	-	Porcelet	3	104	260	non		Van Heugten et al., 2003
Immunoglobulines								
Total des anticorps	globules rouge (mouton)	Poulet	7	30	350	linéaire - plateau	70 - 110	Sunder et al., 2004
	globules rouge (mouton)	Poulet	3	34	181	linéaire - plateau	68 - 181	Bartlett et al., 2003
	globules rouge (mouton)	Poulet	4	20	60	non		Mohanna et Nys, 1999a
	globules rouge (mouton)	Poulet		8	88	non		Pimentel et al., 1991
	globules rouge (mouton)	Poulet	3	37	237	non		Stahl et al., 1989
	globules rouge (mouton)	Porcelet	3	37	157	non		Sun et al., 2009
IgA	-	Poulet	5	28	148	non		Feng et al., 2010
IgG	-	Poulet	5	28	148	quadratique	60 - 90	Feng et al., 2010
	globules rouge (mouton)	Poulet	3	34	181	linéaire - plateau	35 - 70	Bartlett et al., 2003
IgM	-	Poulet	5	28	148	linéaire - plateau	60 - 90	Feng et al., 2010
	globules rouge (mouton)	Poulet	3	34	148	linéaire	148	Bartlett et al., 2003
Système du complément								
Protéine complément C3	-	Poulet	5	28	148	non		Feng et al., 2010
Protéine complément C4	-	Poulet	5	28	148	non		Feng et al., 2010
Macrophage et phagocytose								
Phagocytose des macrophages	Méthode Sephadex	Poulet	3	34	148	oui	148	Bartlett et al., 2003
	Méthode Sephadex	dindon	3	30	75	oui	75	Kidd et al., 1994
	Méthode Sephadex	porcelet	3	104	260	non		Van Heugten et al., 2003
Erythrocytes / macrophages	Méthode Sephadex	Poulet	3	34	148	linéaire - plateau	35 - 70	Bartlett et al., 2003
	Méthode Sephadex	porcelet	3	104	260	linéaire	260	Van Heugten et al., 2003
Lymphocytes	Phytohémagglutinine	dindon	3	30	75	oui	75	Kidd et al., 1994
	Phytohémagglutinine	Poulet		8	88	non		Pimentel et al., 1991
	-	Porcelet	3	37	157	non		Sun et al., 2009
	-	Porcelet	3	104	260	non		Van Heugten et al., 2003
	Phytohémagglutinine	Porcelet	3	104	260	non		Van Heugten et al., 2003
	Mitogène des cellules B	Porcelet	3	104	260	oui	184	Van Heugten et al., 2003
	Lipopolysaccharide	Porcelet	3	104	260	non		Van Heugten et al., 2003
Lésions dermatologiques								
Cellulitis	-	Poulet	2	90	130	oui	130	Downs et al., 2000

Lorsque la réponse immunitaire est provoquée par une situation de stress, la régulation homéostatique du zinc est modifiée, car plusieurs critères, tels que le zinc plasmatique et hépatique changent (Klasing, 1984). Bartlett et Smith (2003) ont observé une diminution moyenne de 11% du zinc plasmatique chez des poulets exposés à un stress à la chaleur. Cette diminution était accentuée lorsque la teneur en zinc alimentaire était de 34 mg / kg par rapport à 181 mg / kg. Cet abaissement du zinc plasmatique indique que l'organisme favorise, dans une situation de stress, l'utilisation du zinc corporel pour la défense immunitaire (Suchner

et al., 2000). Toutefois, chez le porcelet sevré, Le Floc'h *et al.* (2006) n'ont pas observé de changement du zinc plasmatique lorsque les conditions sanitaires générales ont été détériorées. Ces constats, spécialement ceux sur poulets, indiquent que non seulement l'apport en zinc alimentaire provoque un changement dans les critères immunitaires décrits précédemment, mais qu'à l'inverse une situation de stress immunitaire peut aussi provoquer des changements au niveau de différents paramètres de mesure du statut en zinc. Les besoins en zinc sont donc probablement augmentés dans ces conditions de stress, si elles sont durables. La biodisponibilité de sources de zinc peut être comparée dans ce type de conditions, mais ne semble pas fournir d'avantages d'informations que sous des conditions environnementales dites « normales », du moment que le domaine de linéarité de réponse des mesures est garanti.

2.2.6. Critères d'expression de gènes

Plus récemment, les avancées méthodologiques et technologiques permettent de prendre en compte les modifications de l'expression de certains gènes, offrant la possibilité de développement de nouveaux biomarqueurs du statut en zinc. Les critères d'expression de gènes auraient l'avantage, par rapport aux concentrations du produit de ces gènes (protéines), de se rapprocher des « origines » de la réponse de la régulation du métabolisme du zinc. Les facteurs environnementaux seraient alors moins influents sur l'hétérogénéité des mesures. La technique proposée est principalement celle de la QRT-PCR (quantitative, real-time, reverse transcription-PCR) qui permet de mesurer de façon sensible et reproductible des changements d'expression de gènes (Huang *et al.*, 2007). Par exemple, les niveaux de synthèse et l'expression des MT et des transporteurs ZnT-2 (Lichten *et al.*, 2001), qui sont sensibles à l'apport de zinc, ont été évalués chez le poulet (Huang *et al.*, 2007). L'expression des MT dans le pancréas répond de manière linéaire, tandis que celle de ZnT-2 répond de manière quadratique à un apport de zinc alimentaire entre 28 et 148 mg / kg ($R^2=0.95$). Selon la régression calculée, un apport alimentaire de zinc de 84 mg / kg est nécessaire pour permettre l'expression maximale du transporteur ZnT-2. Toutefois, une réponse linéaire ou linéaire-plateau n'est pas exclue, car l'expression maximale du transporteur ZnT-2 est la plus élevée avec une teneur en zinc alimentaire de 168 mg / kg, qui n'a pas été pris en compte pour le calcul de régression présentée par les auteurs. L'expression des transporteurs provenant de toutes les données de Huang *et al.* (2007) ne présente pas un paramètre concluant pour déterminer le besoin en zinc alimentaire du poulet, car aucune stabilisation de l'expression n'a été détectée. Pour étudier la biodisponibilité du zinc, ces paramètres sont d'intérêt. Toutefois l'établissement de la sensibilité et de la spécificité de ces critères doit encore faire l'objet d'études. En particulier, leur avantage par rapport à des critères reconnus

comme pertinents, tels que la teneur en zinc dans le plasma ou l'os n'est pas clairement établie.

2.2.7. Résumé des critères de mesure

Pour estimer le besoin et / ou la biodisponibilité du zinc alimentaire chez le poulet et chez le porc, les critères d'évaluation principaux mentionnés dans ce chapitre sont résumés dans le tableau 3. Les expériences doivent être mises en place pour permettre une réponse linéaire des critères choisis à l'apport alimentaire en zinc. A ce jour, les critères de mesures les plus appropriés sont la teneur en zinc plasmatique et de l'os car :

- Ils reflètent le statut de l'animal et non la capacité de l'animal à gérer un éventuel surplus de zinc absorbé.
- Le plateau de leur réponse est atteint avec un apport en zinc alimentaire plus élevé que d'autres paramètres permettant une réponse linéaire.
- La relation linéaire qui les lie à l'apport alimentaire de zinc peut facilement être établie avec un coefficient de détermination et un écart type résiduel (Revy, 2003)

Tableau 3 Critères d'évaluation du besoin en zinc et de la biodisponibilité de sources de zinc proposés chez le poulet et le porc.

Critères	Poulet Intérêt	Porc Intérêt	R ² ¹⁾	Limitation ²⁾	Source Poulet	Source porcelet
Performance de croissance	-	-				
Bilan de zinc	++	++	0.65		Mohanna et Nys, 1999a	Revy, 2003
<u>Concentration de zinc</u>						
Os	++	++	0.85	plateau	mentionnées dans 2.4.3	Revy, 2003
Plasma	++	++	0.85 - 0.90	plateau	mentionnées dans 2.4.3	Revy, 2003
Foie	-	-	0.75 - 0.85	Métabolisme	mentionnées dans 2.4.3	Revy, 2003
Rein	-	-			mentionnées dans 2.4.3	mentionnées dans 2.4.3
Pancréas	+	+		Métabolisme	Huang et al., 2007	Swinkels et al., 1996
Paroi Intestinale	n.a.	-		Métabolisme	n.a.	Swinkels et al., 1996
Muqueuse intestinale	n.a.	-		Métabolisme		Cao et al., 2002
Métallothionéine pancréatique	+	n.a.		Métabolisme	Huang et al., 2007	
Métallothionéine hépatique	-	n.a.			Cao et al., 2002	Martinez et al., 2004
Métallothionéine mucosale	+	n.a.		Métabolisme	Cao et al., 2002	
<u>Activité enzymatique</u>						
Activité alcaline phosphatase plasmatique	-	++	0.70 - 0.90	plateau	mentionnées dans 2.4.4	Revy, 2003
5'-nucleotidase sérique	+	n.a.		plateau	Huang et al., 2007	
<u>Défense immunitaire</u>						
IgG et / ou IgM	+	n.a.		plateau ou max	Bartlett et al., 2003; Feng et al., 2009	
Macrophages	+	-		plateau ou max	Bartlett et al., 2003	
<u>Expression de gènes</u>						
mRNA MT pancréatique	+	n.a.		Métabolisme	Huang et al., 2007	
mRNA ZnT-2 pancréatique	+	n.a.		Métabolisme	Huang et al., 2007	

- : pas d'intérêt; + : potentiel intérêt, nombre d'études limitées avec ce paramètre; ++ : intérêt confirmé; n.a. : pas de données disponibles

¹⁾ coefficients de corrélation selon Revy, 2003

²⁾ Plateau: réponse linéaire-plateau, qui limite un apport maximal en zinc alimentaire. Métabolisme: difficulté d'interprétation, car le niveau d'apport alimentaire qui différencie l'utilisation du Zn pour les besoins physiologiques de l'élimination du zinc excédentaire n'est pas connu.

2.3. La biodisponibilité du zinc et ses facteurs de variation

L'apport de zinc alimentaire nécessaire pour garantir l'homéostasie du zinc dans l'organisme dépend de la biodisponibilité du zinc ingéré.

2.3.1. Définition de la biodisponibilité

Plusieurs auteurs ont proposé une définition du terme biodisponibilité, qui doit être un indicateur de la qualité de la source alimentaire de zinc.

Proportion d'utilisation d'un oligo-élément alimentaire pour un fonctionnement normal de l'organisme (Fairweather-Tait, 1992).

Proportion maximale d'un oligo-élément ingéré, pouvant être mise en valeur par les fonctions biologiques du métabolisme (Kirchgessner *et al.*, 1993)

Proportion d'un oligo-élément ingéré, absorbé sous une forme utilisable par un animal sain (Ammerman *et al.*, 1995).

Degré d'utilisation d'un oligo-élément ingéré pour une fonction biochimique ou physiologique (O'Dell, 1997).

Part d'un oligo-élément ingéré destiné à des fonctions physiologiques normales ou les réserves (Jackson, 1997)

Degré d'utilisation maximal d'un oligo-élément ingéré pour une fonction biochimique ou physiologique (Windisch, 2001).

Ces six définitions sont proches, mais contiennent des nuances : le terme « maximal » utilisé par Kirchgessner *et al.* (1993) et Windisch (2001) précise l'importance d'une estimation de la biodisponibilité d'un oligo-élément dans un état de subcarence qui inclut non seulement le niveau d'apport, mais également la durée de l'expérimentation. En effet, la réponse de l'animal n'est plus proportionnelle à un apport d'oligo-élément excédant ses besoins ou ses capacités de stockage. Chez ces animaux, l'absorption apparente, principal facteur de biodisponibilité d'un oligo-élément, est réduite par l'effet combiné d'une réduction de l'absorption réelle et d'une augmentation de la sécrétion endogène fécale. Toutefois, le terme « sain » mentionné

par Ammerman *et al.* (1995), précise que le métabolisme doit fonctionner normalement, ce qui ne serait pas garanti dans le cas d'une carence en zinc trop forte. Une carence trop importante peut également générer une non proportionnalité entre l'apport et la réponse. Revy *et al.* (2002) l'ont observé chez des porcelets sevrés pour lesquels la teneur en zinc de l'os et du foie ne répondaient pas à un apport de 10 mg de zinc / kg, contrairement à la teneur en zinc plasmatique.

Le terme « utilisation » dans la définition de la biodisponibilité, inclut également les processus de transport, d'assimilation cellulaire et de conversion sous une forme biologique active (O'Dell, 1997). Kirchgessner *et al.* (1993) et Ammerman *et al.* (1995) parlent d'un potentiel d'utilisation métabolique, O'Dell (1997) et Windisch (2001) mentionnent précisément la « fonction biochimique ou physiologique », tandis que Jackson (1997) mentionne précisément les réserves de zinc. Le zinc de l'os et d'organes tels que le foie, est rapidement mobilisé en cas de besoin chez le rat (Windisch *et al.*, 2003). Les réserves de zinc des organes et des os sont également mobilisées lors d'une réduction d'apport de zinc chez le porc (par exemple Kessler *et al.*, 1996 ; Revy *et al.*, 2002) et le poulet (par exemple Mohanna et Nys, 1999b ; Jondreville *et al.*, 2007a). Les réserves de zinc dans l'os ne sont donc pas inactives et ne peuvent pas être exclues de la définition de biodisponibilité. La définition de O'Dell (1997) est similaire à celle généralement utilisée dans le milieu médical. La meilleure définition, à notre sens serait une combinaison de toutes:

« Degré d'utilisation maximal d'un oligo-élément ingéré pouvant être utilisé par un animal sain pour une fonction biochimique ou physiologique ou pour les réserves».

Ainsi, la détermination de la biodisponibilité d'un oligo-élément s'effectuerait en situation de subcarence. Elle se référerait à son degré d'utilisation incluant son degré d'absorption, l'expression de son effet sur les fonctions biochimiques et physiologiques et ses réserves rapidement mobilisables.

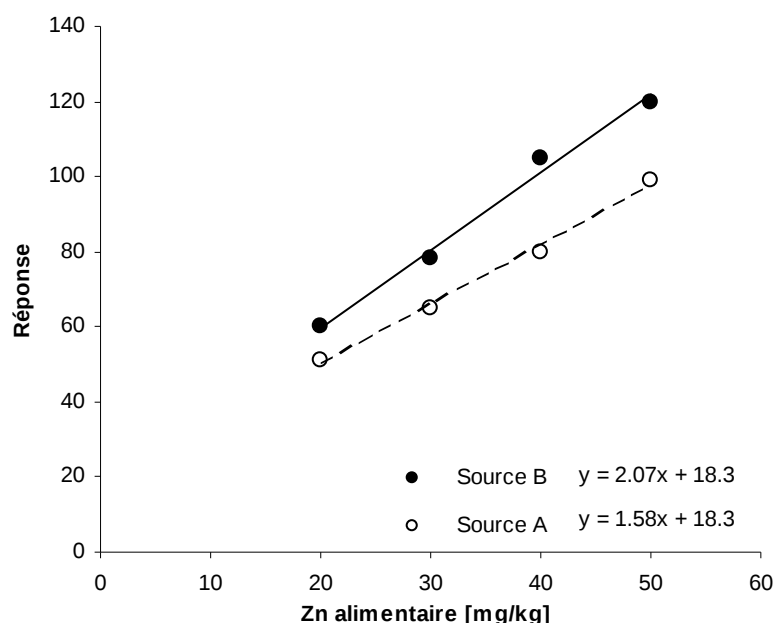
Liée aux études de bilan, la biodisponibilité du zinc a aussi été définie comme la quantité de zinc retenue par rapport à la quantité de zinc ingéré (absorbabilité apparente ou réelle du zinc multipliée par son degré d'utilisation métabolique). Le degré d'utilisation métabolique est défini ici, comme la part du zinc absorbé (apparente ou réelle) non excrété par voie urinaire (Kirchgessner *et al.*, 1974 ; Weigand et Kirchgessner, 1980). L'utilisation métabolique au niveau apparent équivaut aussi au rapport entre le zinc retenu et absorbé. Cette définition de la biodisponibilité nécessite, dans un modèle animal spécifié, la quantification des flux de zinc absorbé et sécrété par voie fécale et urinaire. Pour l'absorbabilité réelle, la quantification du zinc sécrété via l'intestin rend l'utilisation de sources de zinc traçable dans le corps (⁶⁵Zn)

inévitable. Le coût engendré par les expériences avec du zinc marqué favorise l'utilisation d'animaux avec une consommation d'aliment faible, tels que les animaux de laboratoires (souris, rats).

2.3.2. Méthode d'estimation de la biodisponibilité du zinc

Dans le cadre de la définition empirique du besoin en zinc, la biodisponibilité d'une source de zinc est exprimée relativement à celle d'une source de référence, généralement le sulfate de zinc heptahydraté ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). La biodisponibilité relative est estimée, dans le domaine linéaire de la réponse, comme étant le rapport des pentes des réponses obtenues avec la source de zinc étudiée avec celle de la source de référence (Figure 5). Dans l'exemple illustré à la Figure 5, la biodisponibilité relative de la source de zinc B, par rapport à la source A, est de 131 ($2,07 / 1,58 * 100$). Idéalement, pour tester la linéarité, au moins trois niveaux d'apport de chacune des sources doivent être testés. Si, pour des raisons pratiques ou économiques, aucun traitement de contrôle (positif ou négatif) et / ou seule une dose d'apport peut être testée par source de zinc étudiée, la biodisponibilité relative est calculée comme le rapport entre la réponse obtenue avec la source étudiée par rapport à la source de référence. Dans ce cas, il n'est pas garanti que la réponse de mesure se situe dans le domaine de la linéarité.

Figure 5 Exemple de données nécessaires pour le calcul de la biodisponibilité relative de zinc.



2.3.3. Facteurs alimentaires ayant une influence sur la biodisponibilité du zinc

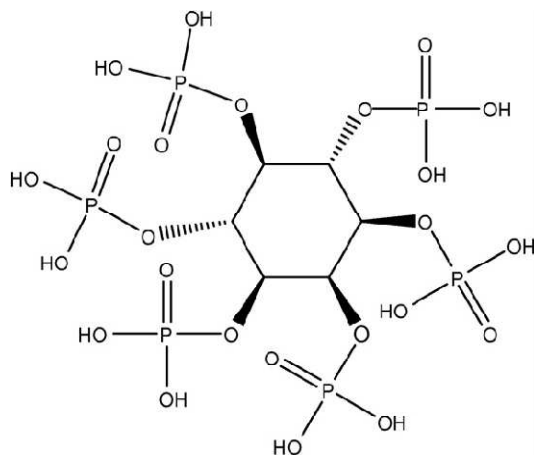
L'un des principaux facteurs de variation de la disponibilité du zinc chez l'animal est sa solubilité intra luminale, notamment à proximité des sites d'absorption. Elle-même dépend du pH gastro-intestinal qui gouverne la liaison avec des composés insolubles (fibres, acide phytique) présents dans la ration. La disponibilité dépend également du niveau d'absorption, qui peut être modulé par des compétitions en cas d'apports pléthoriques ou insuffisants d'autres oligoéléments dans la ration.

a) Liaison avec des composés insolubles présents dans l'aliment

L'absorbabilité réelle du zinc apporté sous forme de sulfate, de chlorure, lié à de l'acide fumarique ou lié à de l'histidine (< 25 mg Zn / kg) dans une ration semi-synthétique (2 mg Zn/kg) s'est avérée extrêmement élevée chez le rat en croissance, car proche de 100% (Weigand et Kirchgessner, 1979 ; 1980 ; 1992). L'absorbabilité réelle du zinc, exprimée en pourcent de l'ingéré, est calculée comme la différence entre la quantité ingérée et la quantité excrétée par voie fécale d'origine non endogène. Cette ration semi-synthétique ne contenait aucun agent complexant connu pour interagir avec le zinc ajouté. Le zinc devait donc se présenter au site d'absorption sous forme entièrement soluble pour y être absorbé à un tel degré. Cette situation représente l'idéal.

L'acide phytique (*myo*-inositol hexaphosphate, Figure 6) est connu pour son antagonisme avec le zinc. Il s'agit d'un acide multi protonique (liaisons d'hydrogène) composé d'un radical inositol et estérifié principalement par six radicaux phosphates. La molécule contient 28,7% de phosphore et les liaisons avec l'hydrogène sont facilement dissociables. Du point de vue chimique, les phytates sont des sels de l'acide phytique dans lesquels des cations tels que le magnésium (Mg), le potassium (K), le calcium (Ca), le fer (Fe), le manganèse (Mn) et / ou le zinc se substituent à l'hydrogène (Raboy, 1997).

Figure 6 Acide phytique.



Les phytates forment avec le zinc des complexes insolubles dans le milieu gastro-intestinal (Davies et Nightingale, 1975). L'apport graduel de 0 à 9 g de phytate de sodium, ($C_6H_6Na_{12}O_{24}P_6$) / kg d'aliment a progressivement abaissé l'absorbabilité réelle du zinc de 55 à 0% chez le rat adulte nourri avec un régime semi-synthétique contenant 2 mg Zn / kg (Windisch et Kirchgessner, 1999a). Chez le rat en croissance, l'absorbabilité apparente de zinc a baissé de 58 à 25% lorsque du phytate de sodium (7 g / kg d'aliment) a été introduit dans un aliment contenant 16 mg Zn / kg (Rimbach *et al.*, 1995). Ces données obtenues chez le rat illustrent à quel point un agent complexant peut avoir un effet antagoniste sur l'absorbabilité du zinc, réduisant ainsi sa biodisponibilité.

Avec une approche similaire, une détérioration importante de la vitesse de croissance a été observée chez le poulet de chair (O'Dell et Savage, 1960) et chez le porc (Oberleas *et al.*, 1962) lorsque du phytate de sodium a été introduit dans une ration à base de caséine contenant soit 9 ou 14 mg de Zn / kg. L'apport de 0,8% de calcium sous forme de chlorure, n'a pas influencé la biodisponibilité du zinc chez le rat lorsque la ration était exempte de phytate. En revanche, le même apport de calcium dans un aliment contenant du phytate de sodium a réduit la biodisponibilité du zinc chez le rat (Oberleas *et al.*, 1966). Cette réponse s'expliquerait par un effet négatif du calcium sur la solubilité des complexes phytates-zinc.

Ainsi, indépendamment de l'espèce monogastrique (rat, poulet, porc), la biodisponibilité du zinc ajouté dans une ration exempte de zinc natif est réduite par l'apport de phytates de sodium. Les phytates se lient au zinc dans le tractus digestif pour former des complexes insolubles et non absorbables. L'apport de calcium renforce cet effet.

A travers ce type d'observations le rapport molaire phytate x Ca / Zn alimentaire a été suggéré (Fordyce *et al.*, 1987 ; Miller *et al.*, 2007) comme indicateur du potentiel antagoniste d'un aliment sur le zinc chez l'humain.

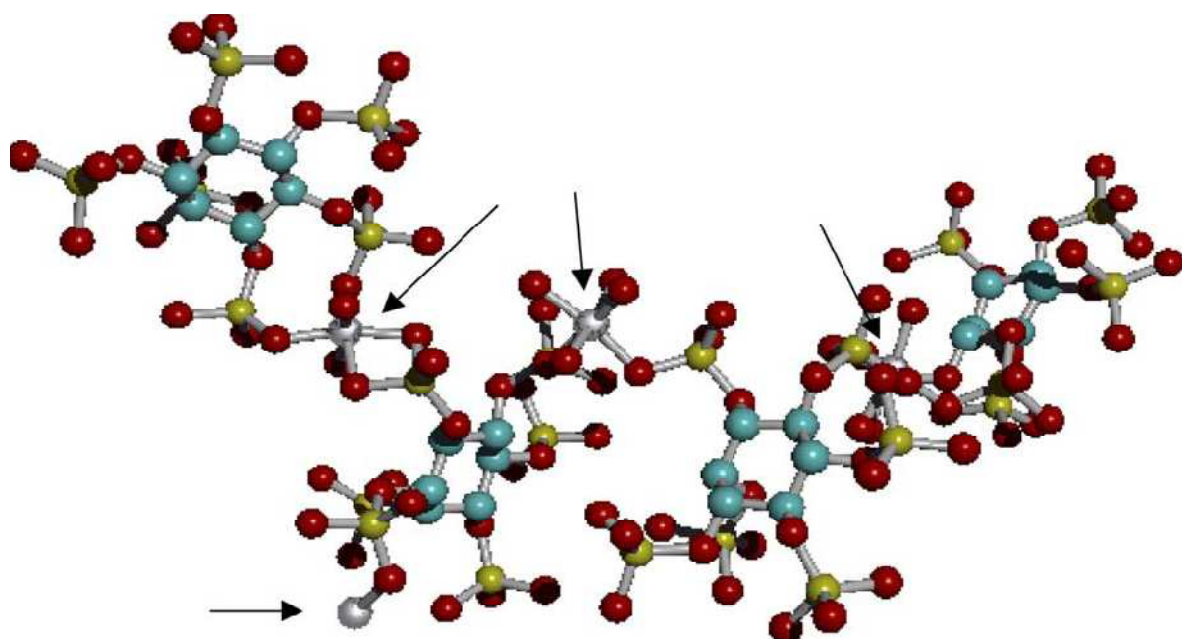
La présence de phytates dans les aliments destinés aux animaux monogastriques est inévitable, car c'est la forme principale de stockage du phosphore dans les grains végétaux. Le phosphore phytique y représente environ 55% à 75% de la teneur en phosphore total (Institut National de la Recherche Agronomique – Association Française de Zootechnie, 2004). Les phytates constituent une réserve de phosphore et de glucides pour la plante au moment de la germination. Leur concentration est augmentée dans les produits riches en protéine (par exemple tourteaux d'oléo-protéagineux, issues de céréales) car ils s'accumulent dans les fractions protéiques du grain. Les aliments pour monogastriques à base de céréales et de tourteau de soja contiennent environ 2,0 à 2,5 g de P phytique / kg. Dans les matières premières d'origine végétale, les teneurs en phosphore phytique et en zinc sont positivement

corrélées (Revy *et al.*, 2003), avec environ 10 mg de Zn pour 1 g de P phytique. Cette relation suggère que le zinc présent dans les matières premières d'origine végétales couramment utilisées dans l'alimentation des animaux monogastriques serait lié aux phytates. Rodrigues-Filho *et al.* (2005) ont récemment conduit des analyses (résonance magnétique nucléaire, résonance paramagnétique électronique et spectrométrie photoélectronique induits par rayons X) de phytates contenus dans des grains de blé et proposent les composés suivants :

- $\text{Na}_3\text{Mn}_5 * (\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_{24}\text{P}_6)\text{OH} * 9\text{H}_2\text{O}$ (Figure 7)
- $\text{Na}_3\text{Zn(II)}_5 * (\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_{24}\text{P}_6)\text{OH} * 9\text{H}_2\text{O}$.
- $\text{Na}_4\text{MnZn(II)}_4 * (\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_{24}\text{P}_6) * (\text{NO}_3)_2 * 8\text{H}_2\text{O}$.

Ainsi, deux composés phytiques sur trois identifiées dans les grains de blé contiennent du zinc.

Figure 7 Schéma de la structure moléculaire de $\text{Na}_3\text{Mn}_5 * (\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_{24}\text{P}_6)\text{OH} * 9\text{H}_2\text{O}$ ou de $\text{Na}_3\text{Zn(II)}_5 * (\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_{24}\text{P}_6)\text{OH} * 9\text{H}_2\text{O}$. Les atomes fléchés de couleur grise peuvent représenter soit du manganèse, soit du zinc. Les atomes d'hydrogène ne sont pas présentés (d'après Rodrigues-Filho *et al.*, 2005).



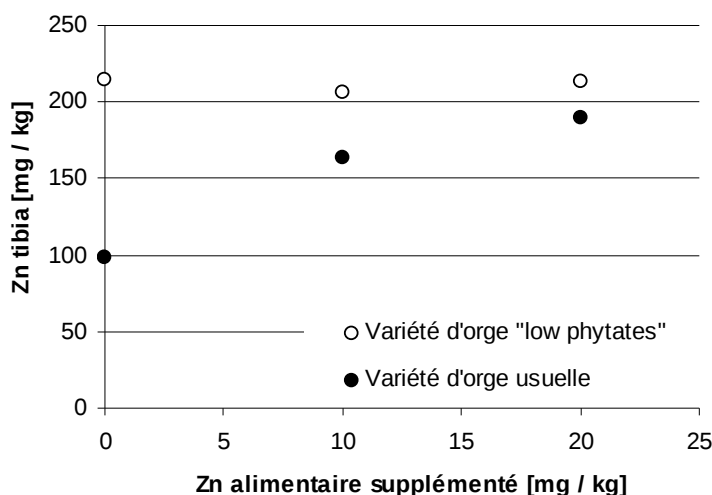
Certaines variétés d'orge, de maïs et de soja ont été sélectionnées par génie génétique pour leur teneur faible en phosphore sous forme phytique (Li *et al.*, 2001 ; Veum *et al.*, 2002 ; Hill *et al.*, 2009). Leur principal intérêt réside dans l'amélioration de l'utilisation du phosphore alimentaire, apporté en plus grande proportion sous forme non phytique. Ces céréales dites « low-phytates », contiennent autant de zinc que les variétés normales (Linares *et al.*, 2007 ; Veum *et al.*, 2009), suggérant que le zinc est présent sous une forme non liée à ces composés dans ces nouvelles variétés. Ces auteurs ne précisent pas sous quelle forme se trouve le zinc.

L'effet des phytates sur la biodisponibilité du zinc a également fait l'objet d'études dans les aliments destinés aux animaux de rente monogastriques à base de céréales, de tourteaux d'oléagineux et de sous-produits (principalement les sous-produits laitiers en alimentation porcine).

L'apport d'acide phytique (source non précisée) a provoqué une réduction des performances de croissance chez le porc (Oberleas *et al.*, 1962) et, dans une moindre mesure, chez le poulet (O'Dell et Savage, 1960) alimentés avec une ration non supplémentée en zinc, à base de glucose et de tourteau de soja (porc) ou de protéine de soja (poulet). Il est important de préciser que ces auteurs ont ajouté l'acide phytique dans une soupe à base d'eau et de la matière première protéique qui a été séchée le lendemain pour fabriquer les aliments expérimentaux. Durant cette préparation en milieu aqueux, l'acide phytique s'est probablement lié avec des minéraux solubles qui ont ensuite été limitant pour la croissance, surtout chez le porc. Avec l'approche inverse, la déphytinisation préalable d'une matière première riche en phytates (tourteau de soja) a amélioré la concentration de zinc fémoral chez le porc (Matsui *et al.*, 1998). Le remplacement de matières premières riches en phytates (tourteau de soja) par des matières exemptes de phytates (poudre de lait), tout en maintenant la teneur en zinc alimentaire, a augmenté la concentration de zinc fémoral chez le porc (Ashida *et al.*, 2000). Les études de Linares *et al.* (2007) chez le poulet semblent montrer un bénéfice de variétés d'orge « low phytates » sur l'utilisation du zinc, qu'on pourrait interpréter comme un effet négatif des phytates sur le zinc natif. Elle ne permet toutefois pas de conclure sur l'effet de ces composés sur le zinc ajouté. En effet, les aliments sans zinc ajouté démontrent une meilleure disponibilité du zinc dans les variétés « low phytates ». L'interaction entre la supplémentation de zinc et la variété semble due au fait que, même sans zinc ajouté, la variété « low phytates » permet de maximiser la teneur en zinc du tibia (Figure 8). Au contraire, chez le porcelet sevré, Veum *et al.* (2009) concluent que les recommandations d'apport de zinc et des autres oligo-éléments (fer et cuivre) ne devraient pas être revues à la baisse lorsque des variétés de céréales « low phytates » plutôt que classiques sont introduites dans les aliments. Ces résultats semblent contradictoires, puisque ces derniers suggèrent l'absence d'effet ou un effet négligeable des phytates des céréales sur le zinc alimentaire (natif et / ou supplémenté). Les auteurs n'ont observé aucune interaction entre la variété d'orge et la supplémentation en oligo-éléments sur la minéralisation osseuse. La supplémentation en oligo-éléments permettait bien d'améliorer la teneur en cendre des os, mais pas celle du zinc et l'usage d'orge « low phytates » était sans impact. Les aliments, constitués d'environ 50% d'orge, « low phytate » ou conventionnel, d'environ 25% de tourteau de soja et de 15% de poudre de lait, étaient additionnés de 0 à 80 mg de zinc sous forme de sulfate. Dans l'aliment sans zinc ajouté, le zinc alimentaire provenait pour environ 45% de l'orge, 50% du tourteau de soja et 5% de la poudre de lait. Compte tenu de la contribution relative du zinc apporté par l'orge dans les

aliments, les résultats peuvent difficilement être interprétés pour évaluer l'impact des phytates sur la disponibilité du zinc présent dans les matières premières.

Figure 8 Teneur en zinc dans le tibia du poulet en fonction de la variété d'orge utilisée et du niveau de zinc supplémenté (d'après Linares et al., 2007).



Lorsque le calcium alimentaire n'est pas apporté de manière excédentaire dans des aliments à base de céréales et de tourteaux, l'effet antagoniste du calcium sur le zinc semble limité, voire insignifiant chez le porc et le poulet. Windisch et Kirchgessner (1995a) ont calculé une réduction de moins de 5% de l'absorbabilité apparente de zinc chez le porc et de la rétention en zinc chez le poulet lorsque la teneur alimentaire en calcium a augmenté respectivement de 6,5 à 8,1 g / kg et de 6,2 à 7,9 g / kg. Larsen et Sandström (1993) n'ont pas observé d'effet, sur l'absorbabilité apparente du zinc chez le porc, de l'apport calcique allant de 3 à 11 g / kg dans un aliment à base de céréales et de tourteau de soja. Chez le poulet, l'excrétion de zinc a été légèrement augmentée par l'apport de calcium passant de 6 à 9 g / kg (Rao *et al.*, 2006). Cependant, cet effet pourrait avoir pour origine un défaut de minéralisation osseuse, dont le facteur limitant était vraisemblablement l'apport alimentaire de P non phytique faible (moins de 3 g / kg). Avec une teneur en phosphore non-phytique plus élevée, aucun effet du calcium n'a été mesuré sur l'excrétion de zinc. Les auteurs n'ont d'ailleurs mesuré aucun effet sur la teneur en zinc du tibia. Chez le poulet, un apport massif de 15 à 23 g Ca / kg d'aliment sous forme de CaCO_3 a augmenté le pH du gésier et de l'intestin grêle et réduit la solubilité du zinc intestinal (Shafey *et al.*, 1991). Chez le porc nourri à l'aide d'une ration à base de maïs et de tourteau de soja contenant 28 ou 75 mg de Zn / kg et 5 g de Ca / kg, un apport massif de 10 g de Ca / kg par du phosphate bicalcique a réduit l'activité de la PA plasmatique et la teneur en zinc hépatique de respectivement 15% et 11%, indépendamment de la teneur alimentaire en zinc (Morgan *et al.*, 1969). Ces auteurs ne présentent pas de données sur le pH du contenu digestif.

Ainsi, dans un aliment conventionnel, la biodisponibilité du zinc est influencée par la variation de la teneur alimentaire en phytates, à teneur en zinc équivalente. Le calcium semble peu influencer la biodisponibilité du zinc présent dans l'aliment, à moins que celui-ci ne soit incorporé à doses élevées.

Les phytases microbiennes, couramment utilisées dans l'alimentation des poulets et des porcs, hydrolysent les phytates permettant ainsi la mise à disposition du phosphore (Pointillart, 1994). L'hydrolyse des phytates devrait permettre la libération du zinc qui y est lié et par conséquent améliorer la disponibilité de cet oligo-élément. Cet effet a été vérifié expérimentalement chez le poulet (Biehl *et al.*, 1995 ; Yi *et al.*, 1996 ; Mohanna et Nys, 1999b ; Jondreville *et al.*, 2007a) et chez le porc (Pallau *et al.*, 1992 ; 1994 ; Lei *et al.*, 1993 ; Adeola, 1995 ; Jondreville *et al.*, 2005). Jondreville *et al.* (2005 ; 2007a) ont évalué la quantité de zinc libéré par l'ajout de phytase microbienne. Une unité de phytase (FTU) correspond à la quantité d'enzyme qui permet de libérer 1 μmol de P inorganique 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. L'ajout de 500 FTU de phytase microbienne (produite par *Aspergillus niger*) dans une ration à base de maïs et de tourteau de soja permet de remplacer un apport équivalent à 32 mg / kg de Zn sous forme ZnSO_4 chez le porc et de 5 mg / kg de Zn chez le poulet de chair. Chez le poulet d'autres estimations ont révélé des valeurs plus élevées, mais en dessous d'une équivalence de 15 mg / kg (Biehl *et al.*, 1995; Mohanna et Nys, 1999b).

Certaines matières premières d'origine végétale, peuvent contenir de la phytase. Cette phytase végétale présente une activité non négligeable pour l'hydrolyse des phytates et est surtout présente dans le blé et ses co-produits, l'orge, le seigle et le triticale, alors que le maïs et les tourteaux d'oléagineux en sont dépourvus (Pointillart, 1994). L'activité phytasique végétale (U) peut être très variable à l'intérieur d'une même matière première. Eeckhout et de Paepe (1994) ont mesuré une activité allant de 915 à 1581 U / kg et de 1180 à 5208 U / kg dans respectivement 13 lots de blé et 5 lots de son de blé. Toutefois, une activité moyenne respectivement de 460, 540, 5350 et 770 U / kg figure dans les tables de composition des matières premières (Institut National de la Recherche Agronomique – Association Française de Zootechnie, 2004). De nombreuses études montrent un effet positif des phytases végétales sur la disponibilité du phosphore chez le porc (Pointillart, 1991 ; Eeckhout et de Paepe 1992 ; Zimmermann *et al.*, 2002 ; 2003) et chez le poulet (Olaffs *et al.*, 2000 ; Jondreville *et al.*, 2007b). Pour une même activité mesurée *in vitro*, on estime que l'efficacité de la phytase végétale pour augmenter l'utilisation du phosphore chez le porc et le poulet est réduite d'environ 40 à 70% par rapport à la phytase microbienne (Eeckhout et de Paepe 1992 ;

Weremko *et al.*, 1997 ; Zimmermann *et al.*, 2002 ; Jondreville *et al.*, 2007b). La phytase végétale est détruite par des températures dépassant 70°C. Il est ainsi envisageable que la biodisponibilité du zinc puisse être influencée par l'activité phytasique végétale d'un aliment, en particulier, sous forme farine. Ils sont principalement destinés à compléter les rations pour porcs à base de co-produits ou de sous-produits de fromageries (lactosérum, ...). Ce type d'alimentation est très répandu en Suisse, car environ 50% de la production laitière helvétique est transformée en fromage. Cependant, la variabilité de l'activité phytasique intra matière première (Eeckhout et de Paepe, 1994) rend cette prise en compte périlleuse.

La phytase microbienne améliore très nettement la biodisponibilité du zinc alimentaire chez le porc et plus faiblement chez le poulet.

b) Fibres

Les fibres alimentaires (polysaccharides non amylacés + lignine) peuvent aussi exercer un effet antagoniste sur la biodisponibilité du zinc.

Chez le poulet, l'utilisation de matières premières riches en polysaccharides non amylacés, comme l'apport de 8% de parois cellulaires de luzerne (exemptes de phytate) ou de 4 et 8% de son de blé ou d'avoine (présence de phytates) réduit le niveau de zinc plasmatique et la teneur en zinc du tibia (van der Aar *et al.*, 1983). Par contre, l'apport de 4 et 8% de pectine, de lignine ou d'un mélange de xylose et de gomme arabique n'ont pas eu cet effet (van der Aar *et al.*, 1983). Selon les auteurs, les fibres alimentaires augmentent, par effet abrasif, le turn-over de la muqueuse intestinale riche en zinc, augmentant ainsi les pertes de zinc endogène par desquamation. Mohanna *et al.* (1999) suggèrent plutôt que les matières premières riches en hémicelluloses telles que l'orge et le blé peuvent augmenter la viscosité du contenu intestinal et réduire la biodisponibilité du zinc chez le poulet. La gomme de guar augmente le potentiel de viscosité de l'aliment et ne possède pas de propriétés qui interfèrent directement avec les minéraux présents dans le tractus digestif. L'ajout de gomme de guar a augmenté la viscosité intestinale, réduit la performance de croissance et réduit le niveau de zinc plasmatique (Khan *et al.*, 1987 ; Mohanna *et al.*, 1999) et la teneur en zinc du tibia chez le poulet (Mohanna *et al.*, 1999).

Chez le porc, l'apport de 20% de son de blé dans une ration à base de maïs et de tourteau de soja a réduit l'absorption apparente du zinc chez le porc de 40 à 30%, niveaux étonnement élevés, sachant que la teneur en zinc alimentaire était de 180 mg / kg (Newton *et al.*, 1983). Cependant l'apport de 15% de son d'avoine ou de 20% de luzerne séchée dans une ration à base de maïs et de tourteau de soja n'a pas eu d'effet sur l'absorbabilité du zinc chez le porc (Moore *et al.*, 1988). Toutefois, certaines de ces composantes alimentaires riches en fibres,

contiennent également des phytates à des niveaux non négligeables (son de blé avec 80% du P sous forme phytique selon Institut National de la Recherche Agronomique – Association Française de Zootechnie, 2004). Les effets négatifs sur la biodisponibilité du zinc observés pour ces matières premières riches en fibres ne peuvent donc pas être attribués avec certitude aux fibres.

c) pH du milieu gastro-intestinal

La solubilité du zinc dans le milieu gastro-intestinal dépend du pH (Cao *et al.*, 2000; Jongbloed *et al.*, 2002). *In vitro*, les sels de phytates liés à Ca^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} et Cu^{2+} deviennent solubles à un pH inférieur à 4 – 5, et les phytates de magnésium sont solubles jusqu'à un pH de 7,5 (Kumar *et al.*, 2010). Les acides organiques sont souvent utilisés dans l'alimentation des porcelets sevrés pour pallier les conséquences négatives du sevrage sur le pH digestif. L'eubiose ou équilibre de la flore intestinale et l'utilisation énergétique et protéique de la ration seraient améliorés par l'apport d'acides organiques (Kirchgessner et Roth, 1988). L'abaissement du pH du tractus digestif en est probablement, l'origine. Ainsi, l'apport d'acide citrique (1,5%) dans une ration à base de maïs et de tourteau de soja contenant soit 30, 40, 60 ou 100 mg de Zn / kg, a permis d'améliorer légèrement l'absorbabilité apparente et le zinc plasmatique chez le porcelet (Höhler et Pallauf 1993 ; 1994). L'apport de formiate de potassium (1,8%) a amélioré l'absorption apparente du zinc de 9% (Roth *et al.*, 1998). Chez le poulet, l'apport d'acide citrique n'a influencé ni la rétention de zinc, ni la teneur tibiale en zinc, que ce soit en combinaison ou non avec de la phytase microbienne dans une ration contenant près de 100 mg / kg de Zn (Brenes *et al.*, 2003).

d) Sources de supplémentation de zinc

La nécessité de supplémenter une ration usuelle pour poulet ou porcelet en zinc a été introduite dans le chapitre précédent (chapitre 2.1). Les sources de zinc supplémentées seront spécialement traitées dans le chapitre suivant (chapitre 2.3), mais l'hypothèse d'une meilleure biodisponibilité des sources de zinc sous forme organique par rapport aux formes inorganiques doit être mentionnée à ce stade déjà, car la forme de zinc fait partie des facteurs alimentaires pouvant influencer sa biodisponibilité. Selon Kratzer et Vohra (1986), la meilleure disponibilité du zinc apporté sous cette forme s'expliquerait, en premier lieu, par la protection de l'atome de zinc par le ligand contre la formation de complexes insolubles, notamment avec les phytates. A l'opposé, le zinc des sources inorganiques serait rendu indisponible après la formation de complexes insolubles avec les phytates (Wedekind *et al.*, 1992).

Chez le rat, l'apport de zinc sous forme organique, à la place de ZnSO_4 , a permis d'augmenter la teneur en zinc des poils, des muscles et des reins (Power *et al.*, 1994; Walter *et al.*, 2002). Gallaher *et al.* (2000) ont également observé un effet bénéfique sur la teneur en zinc de divers tissus chez le rat nourri avec une de deux sources de zinc organique à la place de zinc sous forme sulfate dans des aliments semi-synthétiques.

Chez le poulet, Wedekind *et al.* (1992) ont montré que la disponibilité d'un complexe zinc-méthionine, par rapport au sulfate, diffère selon la nature du régime. Les auteurs ont calculé la biodisponibilité relative du zinc méthionine dans un régime composé de maïs et de tourteau de soja à 206%, dans un régime à base d'isolat de soja à 177% et dans un régime semi-synthétique à base d'acides aminés et d'amidon de maïs à 117%. Ces différences de disponibilité relative sont attribuées à la présence de phytates et de fibres dans les régimes complexes par rapport au régime semi-synthétique. Swiatkiewicz *et al.* (2001) ont confirmé cette hypothèse en introduisant de la phytase microbienne dans un régime riche en phytates. La source organique présentait une biodisponibilité de 130% par rapport au sulfate dans le régime sans phytase, alors que cette différence était atténuée dans le régime additionné de phytase microbienne (110%). Cao *et al.* (2002) ont relevé une biodisponibilité relative de 116% pour un protéinate de zinc et une de 78% pour le zinc méthionine. Ao *et al.* (2006) ont évalué la biodisponibilité relative d'un protéinate de zinc à 157%. A l'inverse, Mohanna et Nys (1999a) n'ont pas mis en évidence d'amélioration de la disponibilité du zinc sous forme de complexe zinc-méthionine par rapport au sulfate.

Chez le porc, aucune étude ne mentionne d'amélioration de la disponibilité des sources organiques de zinc par rapport au sulfate (Hill *et al.*, 1986 ; Wedekind *et al.*, 1994a ; Swinkels *et al.*, 1996; Revy *et al.*, 2002). Revy *et al.* (2004) n'ont pas constaté d'effet de la présence de phytase microbienne dans un aliment pour porcelets sevrés sur la disponibilité du zinc méthionine exprimée relativement à celle du sulfate.

e) Compétition au site d'absorption

Un autre type d'interaction, pouvant altérer la biodisponibilité du zinc, est la compétition avec un autre minéral au site d'absorption.

Avec un apport excessif de fer alimentaire (1000 mg / kg matière sèche), la teneur en zinc hépatique a été réduite chez le taurillon à l'engrais (Standish *et al.*, 1971). Chez l'humain, l'absorbabilité du zinc a été réduite par un apport croissant de fer (Solomons et Jacob, 1981). Le zinc et le fer ont un comportement antagoniste lorsque la concentration de l'un ou l'autre est trop élevée. La raison de cet antagonisme Fe-Zn n'a été expliquée que récemment. L'expression de Zip14 (transporteur de zinc) a été réduite par un apport alimentaire de fer croissant (Hansen *et al.*, 2009).

L'utilisation du cuivre comme facteur de croissance, avec un apport alimentaire de 250 mg / kg d'aliment sous forme de sulfate peut entraîner l'apparition de signes de parakératose, révélateur d'une carence en zinc, chez des porcelets sevrés (O'Hara *et al.*, 1960). Le cuivre est un cation divalent (Cu^{2+}) qui possède un électron de moins que le zinc. Le cuivre se lie aux MT, présent dans les entérocytes et une fois transféré dans le milieu intérieur, il est transporté vers le foie, majoritairement par les albumines (Jondreville *et al.*, 2002). Une présence en cuivre excessive, par rapport à celle du zinc, provoque ainsi une carence induite en zinc, car les MT et les albumines sont aussi nécessaires pour la régulation du métabolisme du zinc (chapitre 2.1.4).

f) Vitamine D

La vitamine D, impliquée dans la régulation du métabolisme phosphocalcique, améliore l'absorption du calcium et du phosphore, en cas d'apport déficient de calcium. Ainsi la vitamine D, en stimulant la calcification osseuse entraînerait une augmentation de l'absorption de zinc (Underwood et Suttle, 1999). Cet effet a été vérifié expérimentalement chez le poulet : l'addition de vitamine D_3 dans un aliment à base de maïs et de tourteau de soja ou à base de dextrose et de protéine de soja, déficients en phosphore améliore la teneur en cendres et en zinc du tibia (Roberson et Edwards 1994 ; Biehl *et al.*, 1995). Selon Biehl *et al.* (1995), l'addition de 10 μg de vitamine D_3 / kg d'aliment équivaut à un apport équivalent à 5 mg / kg de Zn sous forme ZnSO_4 , soit une amélioration proche de celle permise par 500 U de phytase microbienne / kg d'aliment. Chez le porc aucune étude ne renseigne l'effet d'un apport supplémentaire de vitamine D_3 sur la disponibilité du zinc, vraisemblablement en raison de son effet limité sur la disponibilité de phosphore.

Les facteurs de variations de la biodisponibilité du zinc (Tableau 4) décrits pour les trois espèces animales sont les liaisons phytates – Zn et ceux pouvant influencer la présence de ce complexe (pH, calcium, phytase, forme de zinc supplémentée).

Tableau 4 Evaluation des effets des facteurs de variation de la biodisponibilité du zinc.

Type de ration	Teneur en Zn natif [mg/kg]		Synthétique ou semi-synthétique (caséine)			Conventionnel (céréales, tourteaux, ...)	
			1 - 15	20 - 45			
			Rat	Poulet	Porc	Poulet	Porc
		<i>Effet attendu</i>					
Phytates ajoutés ¹⁾		<i>détérioration</i>	**	**	**	*	**
Calcium ajouté ²⁾		<i>détérioration</i>	-	n.d.	-	-	-
Phytates et calcium ajoutés ³⁾		<i>détérioration</i>	**	n.d.	**	n.d.	n.d.
Déphytinisation ou végétaux pauvre en phytates ⁴⁾		<i>amélioration</i>				**	*
Phytase microbienne ajoutée ⁵⁾		<i>amélioration</i>				*	**
Fibres alimentaires ajoutées ⁶⁾		<i>détérioration</i>	n.d.	*	n.d.	*	-
Acide organique ajouté ⁷⁾		<i>amélioration</i>	n.d.	n.d.	n.d.	-	*
Zn supplémenté sous forme organique ⁸⁾		<i>amélioration</i>	**	**	n.d.	*	-
Vitamine D ajoutée ⁹⁾		<i>amélioration</i>	n.d.	n.d.	n.d.	**	n.d.

¹⁾ O'Dell et Savage, 1960; Oberleas et al., 1962; Windisch et Kirchgeßner 1999a

²⁾ Oberleas et al., 1962; Oberleas et al., 1966; Larsen et Sandström, 1993; Windisch et Kirchgeßner, 1995; Rao et al., 2006

³⁾ Oberleas et al., 1962; Oberleas et al., 1966

⁴⁾ Ashida et al. 1999; Linares et al., 2007; Veum et al., 2009

⁵⁾ par exemple Jondreville et al., 2005; Jondreville et al., 2007

⁶⁾ Aar et al., 1983; Newton et al., 1983; Moore et al., 1988

⁷⁾ Höhler et Pallauf, 1993; Höhler et Pallauf, 1994; Brenes et al., 2003

⁸⁾ par exemple Wedekind et al., 1992; Wedekind et al., 1994; Mohanna et Nys 1999a

⁹⁾ Roberson et Edwards, 1994 ; Biehl et al., 1995

Effet prononcé (**), léger (*), nul (-). Effet non décrit (n.d.)

g) Différence entre espèces

Les phytates ajoutés dans un aliment réduisent la biodisponibilité du zinc chez le rat, le poulet et le porc. La déphytinisation des matières premières ou l'hydrolyse des phytates améliorent la biodisponibilité du zinc chez le poulet et le porc, de même que l'usage de variétés de céréales dites « low phytates », au moins chez le poulet. L'ampleur de cette amélioration par l'hydrolyse des phytates avec l'utilisation de phytase microbienne est plus importante chez le porc que chez le poulet. Les seules études faisant mention d'une amélioration de la biodisponibilité du zinc provenant de sources organiques par rapport aux sources inorganiques ont été conduites chez le poulet, en particulier dans des aliments riches en phytates. La teneur alimentaire recommandée en calcium (Institut National de la Recherche Agronomique, 1989) est plus élevée chez le poulet que chez le porc. Selon Wedekind *et al.* (1994b) ces teneurs alimentaires en calcium, plus élevées chez le poulet que chez le porc, seraient à l'origine de la meilleure biodisponibilité de certaines sources organiques de zinc par rapport au sulfate chez le poulet, jamais observée chez le porc. Selon ces auteurs, le calcium, amplifie l'effet de l'antagonisme des phytates sur la biodisponibilité du zinc et favoriserait l'expression de la

protection des sources organiques de zinc chez cette espèce. Cependant, aucune étude ne nous permet de statuer clairement sur l'origine des différences observées entre poulets et porcs quant à l'efficacité de la phytase microbienne pour améliorer la biodisponibilité du zinc et l'intérêt des sources de zinc sous forme organique. En particulier, aucun élément ne nous permet d'exclure ni l'hypothèse émise par Wedekind *et al.* (1994b), d'une teneur plus élevée en calcium alimentaire chez le poulet, ni celle d'une différence spécifique de l'animal (différence de propriétés physico-chimique du tract digestif, vitesse de transit des digesta, ...). En particulier, la solubilité des phytates de zinc est influencée par le pH. Or, le pH varie entre les différents segments du tractus digestif et diffère entre espèces (Tableau 5). Les différences entre les deux espèces, mentionnées ci-dessus, pourraient être exploitées pour améliorer notre compréhension des modes d'actions de la phytase microbienne, des sources de zinc supplémentées et de leur interaction sur la biodisponibilité du zinc alimentaire.

Tableau 5 pH dans le gésier, l'estomac et les différents segments de l'intestin grêle chez le poulet et le porcelet (d'après Létourneau-Montminy, 2009).

	Poulet	Porc
Gésier / estomac	3.5	4.0
Duodénum	5.6	5.0
Jéjunum	6.0	6.0
Iléon	7.0	7.3

L'antagonisme des fibres alimentaires sur la biodisponibilité du zinc semble lié avec celui des phytates. Même si les hémicelluloses, en augmentant la viscosité intestinale chez le poulet peuvent causer une détérioration de la biodisponibilité du zinc, leur effet semble négligeable par rapport à celui des phytates.

Les risques d'apparition de compétition entre zinc et autres minéraux tels que le fer et le cuivre au site d'absorption peuvent être différentes entre espèces, mais aucune spécificité de l'espèce n'a été démontrée jusqu'ici. En ce qui concerne l'antagonisme du fer sur la biodisponibilité du zinc, les animaux consommant du fourrage sont les plus exposés, car une teneur élevée en fer provient principalement de contaminations extérieures, telle qu'une teneur en terre élevée dans les fourrages récoltés sous des conditions météorologiques peu optimales. Les herbivores sont donc les plus touchés par cette situation, mais les élevages de poulets ou de porcs en plein air (labels, ou élevages de truies reproducteurs en plein air rencontrés principalement en Grande-Bretagne) pourraient aussi être confrontés à ce type de problème. Une compétition du cuivre alimentaire sur la biodisponibilité du zinc semble peu probable chez le porcelet. Le bilan et le niveau plasmatique du zinc n'a pas été modifié par l'apport de 120 mg Cu / kg d'aliment (Adeola, 1995).

2.4. Classification, caractérisation, utilisation et méthodes d'évaluation des sources de zinc sous forme organique.

2.4.1. Les systèmes de classification des sources de zinc sous forme organique

Aux Etats-Unis, l'Association of American Feed Control Officials (AAFCO) détermine en collaboration avec la Food and Drug Administration (FDA) et le Département de l'Agriculture (USDA) les sources de zinc sous forme organique autorisées. Les sources de zinc sous forme organique autorisées peuvent entrer dans les classes suivantes (AAFCO, 2001):

- Complexe de zinc et d'acide aminé (n° 57.150 et 57.151) : Produit résultant de la réaction d'un sel métallique soluble et d'un acide aminé spécifique ou non spécifique.
- Chélate de zinc et d'acides aminés (n° 57.142) : Produit résultant de la réaction d'une mole de métal avec 1 à 3 (2 de préférence) moles d'acides aminés pour former des liaisons de covalence et de coordination. Le poids moléculaire ne doit pas excéder 800 Daltons.
- Protéinate de zinc (n° 57.23) : Produit résultant de la réaction de sels métalliques solubles et d'acides aminés et / ou des protéines partiellement hydrolysées.
- Complexe de zinc et de polysaccharides (n° 57.29) : Produit résultant de la réaction d'un sel métallique soluble et d'une solution de polysaccharides

Le protéinate de métal fut autorisé en premier en 1970. Cette autorisation, large dans sa définition, permit la commercialisation de nombreux produits très différents les uns des autres, mais tous appelés protéinates. En 1986, le chélate de métal et d'acides aminés fut autorisé. Dès 1986, plusieurs protéinates, compatibles avec la définition de la nouvelle catégorie, devinrent soudainement des chélates. Puis le complexe de zinc et d'acide aminé non spécifique (1990) et le complexe de zinc et d'acide aminé spécifique (1992) furent autorisés, menant une nouvelle fois à des changements de nomination pour des produits ayant préalablement existé et compatibles avec les nouvelles catégories.

En Europe, les sources de zinc sous forme organique autorisées appartiennent aux classes suivantes (European Community 1988, 2003, 2006, 2009):

- Zinc méthionine $[\text{CH}_3\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COO}]_2\text{Zn}$. Contient au minimum 80% de DL méthionine et au minimum 18,5% de Zn. Limité à l'utilisation chez le ruminant. Autorisé en 1988.
- Chélate de zinc et d'acides aminés, hydraté : $\text{Zn}(\text{x})_{1-3} \cdot \text{nH}_2\text{O}$, (x = anion de tout acide aminé dérivé de protéines de soja hydrolysées). Poids moléculaire ne dépassant pas 1500 Daltons. Autorisé en 2003.

- Chélate de zinc et de glycine, hydraté : $\text{Zn (x)}_{1-3} \cdot n\text{H}_2\text{O}$, (x = anion de glycine synthétique). Autorisé en 2006.
- Chélate de zinc et de l'hydroxyanalogue de méthionine. Contient au minimum 16 % de Zn et 80 % d'acide (2-hydroxy-4-méthylthio) butanoïque. Méthode d'analyse : Spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES) selon la norme EN 15510:2007. Limité à l'utilisation chez le poulet en engraissement. Autorisé en 2009. L'autorisation prend fin le 16 octobre 2019.

Leur apport maximal autorisé est identique à celui des sources de zinc sous forme inorganique et déterminé par la teneur en zinc total de l'aliment complet dans lequel il est introduit.

Les classifications de l'Association of American Feed Control Officials et de l'Union Européenne permettent seulement une description théorique du produit effectuée par le fournisseur, qui se base sur les connaissances de la formule chimique du produit et des matières premières qu'il utilise pour le produire. Elle ne fournit en aucun cas une information sur l'intégrité du produit.

Lors de revues de littérature portant sur l'évaluation des sources organiques de zinc utilisées dans l'alimentation des animaux, une des difficultés souvent rencontrée réside dans la description des sources de zinc sous forme organique utilisées. Les changements d'identité liés à la mouvance des textes législatifs américains et européens ont probablement contribué à ce manque de clarté.

Aucune législation ne propose de méthode d'analyse permettant de vérifier si un produit est effectivement compatible ou non avec la classe à laquelle il appartient. Le manque de possibilités analytiques permettant d'attester de l'identité de ces produits a probablement conduit les organismes officiels, tels que le laboratoire communautaire de référence ou l'Association of American Feed Control Officials (AAFCO, 2001), à laisser la possibilité aux industriels de décrire et classer leur produit eux-mêmes, sur la base des matières premières, de la formulation et des technologies utilisées. Toutefois, les nouvelles technologies d'analyse permettent de mieux évaluer l'identité chimique des sources de zinc sous forme organique. Pour la première fois en 2009, un produit, le chélate de zinc et de l'hydroxyanalogue de méthionine a été autorisé assorti d'une méthode d'analyse (European Community, 2009). Cette voie devrait être suivie pour de nouveaux produits.

2.4.2. Origine et développement du marché des sources de zinc sous forme organique

L'origine des sources de zinc sous forme organique se situe aux Etats-Unis d'Amérique. Dans les années 70 une entreprise produisait de la méthionine, dite protégée, pour la nutrition des bovins. La liaison de l'acide aminé avec le zinc, en évitant son utilisation par la flore ruminale, permettait son absorption dans l'intestin. L'intérêt de la méthionine protégée avec du zinc était donc son effet by-pass ruminal. L'utilisation de ce produit est autorisée dans l'Union européenne depuis 1988 pour l'alimentation des ruminants (European Community, 1988)

Dès lors, une poignée d'employés de l'entreprise a imaginé l'utilisation de ce produit non pas pour l'alimentation protéique, mais pour l'apport de zinc. Cette idée a été concrétisée par la création de l'entreprise Zinpro en 1971 avec le premier produit nommé ZINPRO 40 (4% Zn).

Les premières études utilisées par Zinpro pour promouvoir leur zinc-méthionine, comme source de zinc sous forme organique, proviennent probablement de son utilisation initiale comme méthionine protégée. Elles ont effectivement étudié l'effet by-pass du zinc dans le rumen (Heinrichs et Conrad, 1983). Le produit a commencé à connaître du succès dès les années 80 grâce à l'acquisition de connaissances sur son efficacité pour réduire les problèmes de qualité des onglons chez les taurillons à l'engrais (Brethour, 1984 ; Rust, 1985 ; Spears et Samsell, 1986 ; Martin *et al.*, 1987 ; Stobart *et al.*, 1987). L'utilisation des sources de zinc sous forme organique (zinc méthionine) a donc débuté chez le ruminant. Dès lors, plusieurs autres entreprises sont arrivées sur le marché du zinc sous forme organique avec leurs propres produits. Durant les années 90, les premières publications scientifiques étudiant l'utilisation des sources de zinc sous forme organique chez le poulet de chair (Pimentel *et al.*, 1991) et le porcelet (Hahn et Backer, 1993) apparaissent. Une des références majeures, encore citée très fréquemment aujourd'hui, est celle de Wedekind *et al.* (1992) sur poulet de chair, qui concluait à une biodisponibilité supérieure de la source du zinc méthionine comparé au ZnSO_4 ou au ZnO , pris comme références. Dès lors, l'intérêt de l'industrie pour ces produits s'est étendu à l'ensemble des animaux de rente.

Le marché actuel des oligo-éléments sous forme organique (Cu, Fe, Mn et Zn) est difficile à évaluer. Il représente sans doute un chiffre d'affaire annuel global de 100 à 200 millions d'Euros, avec de loin, les U.S.A. comme plus grand consommateur. En 2004, le marché allemand des oligo-éléments sous forme organique représentait environ 20% du chiffre d'affaire total des oligo-éléments, soit 2,6 millions d'Euros (AWT, 2004). En Suisse, une enquête effectuée auprès des fournisseurs principaux d'oligo-éléments sous forme organique (Schlegel, 2010) révèle qu'en 2009 le chiffre d'affaire s'est élevé à un total de 1 mio CHF, soit 750000 €. Le zinc représente 53% du chiffre mentionné et est utilisé à 40% dans l'alimentation du monogastrique (porc, volaille). Les sources de zinc sous forme organiques représentent environ 17% du chiffre d'affaire en Suisse. Toutefois, les quantités de zinc sous forme

organique représentent moins de 5%, car leur prix (3,60 CHF / kg de produit avec une teneur standardisée de 10% de métal) est 10 fois plus élevé que celui du zinc sous forme inorganique.

2.4.3. Les postulats des sources de zinc sous forme organique

Chez les êtres vivants, le zinc est rarement présent sous forme ionisé mais est lié à des molécules telles que des acides aminés, peptides, protéines, nucléotides. Sous ces différentes formes organiques, le zinc peut être soit transporté, stocké ou faire partie de la structure d'une molécule active du métabolisme, telle qu'une enzyme. L'apport alimentaire de zinc sous forme organique est de ce fait, considéré comme « naturel » et « sain » par ses promoteurs et jouit d'une image positive.

Les sources organiques de zinc sont supposées présenter une biodisponibilité plus élevée que les sources inorganiques. Jongbloed *et al.* (2002) ont proposé des valeurs pour différentes sources de zinc supplémentées, par rapport au sulfate (Tableau 6). Ces valeurs, reprises dans les tables françaises (Institut National de la Recherche Agronomique – Association Française de Zootechnie, 2004) reposent sur un nombre assez faible d'études. Contrairement au postulat d'une meilleure biodisponibilité des sources de zinc sous forme organique, les valeurs sont proches de la source de référence (ZnSO₄ à 100) chez le porc. Pour le poulet, une seule source de zinc organique avec comme ligand la méthionine, figure dans cette revue. La biodisponibilité de 130% qui lui est attribuée est issue de deux études provenant du même laboratoire de recherche (Wedekind et Baker, 1990 ; Wedekind *et al.* 1992). Toutefois, depuis 2002, le nombre d'études sur le sujet a considérablement augmenté ce qui justifie une nouvelle évaluation de la biodisponibilité relative des sources de zinc supplémentées chez le poulet et le porc.

Tableau 6 Biodisponibilité relative de sources de zinc chez la volaille et le porc par rapport au sulfate (d'après Jongbloed *et al.*, 2002).

Ligand	n° d'études	Volaille		n° d'études	Porc	
		Biodisponibilité ¹⁾	Ecart-type		Biodisponibilité ¹⁾	Ecart-type
Sulfate		100	-		100	-
oxyde	8	67	25	3	92	15
lysine				3	89	18
méthionine	2	131	10	3	95	8
protéine hydrolysée				1	102	-

¹⁾ Biodisponibilité relative au sulfate de zinc

La presse professionnelle se fait souvent l'écho de l'origine de la meilleure biodisponibilité des sources de zinc sous forme organique par rapport aux formes organiques chez les animaux

monogastriques. Toutefois, ces affirmations ne sont pas toujours basées sur des observations expérimentales.

a) Meilleure solubilité intestinale

Le postulat considère une meilleure absorbabilité du zinc sous forme organique grâce à sa meilleure solubilité à proximité des sites d'absorption intestinale par rapport à des sources de zinc sous forme inorganique (Kratzer et Vohra, 1986). Selon ces auteurs, la meilleure absorbabilité du zinc apporté sous cette forme s'expliquerait par la protection de l'atome de zinc par le ligand contre la formation de complexes insolubles, notamment avec les phytates. A l'opposé, le cation de zinc libéré en milieu liquide et provenant des sources inorganiques serait rendu indisponible après la formation de complexes insolubles avec les phytates (Wedekind *et al.*, 1992 ; 1994a). Cette explication est plausible, car elle est compatible avec les observations mentionnées dans le chapitre 2.2.2, notamment les études montrant une meilleure disponibilité relative du zinc sous forme organique par rapport au sulfate quand des phytates de sodium sont ajoutés dans une ration semi-synthétique destinée à des rats (Windisch et Kirchgessner, 1999a ; Rimbach *et al.*, 1995) des poulets de chair (O'Dell et Savage, 1960) et des porcs (Oberleas *et al.*, 1962).

b) Amélioration de l'absorption intestinale

Le postulat considère une meilleure absorbabilité du zinc sous forme organique grâce à une absorption de la molécule intacte via un mode d'absorption qui s'ajouterait aux voies normales d'absorption de zinc.

Ashmead *et al.* (1985) ont mesuré une augmentation de la concentration de zinc dans la paroi intestinale de segments de jéjunum de rats incubés dans une solution contenant du zinc sous forme organique plutôt que du zinc sous forme inorganique. Bien que le transfert du zinc capté vers le milieu intérieur n'ait pas été mesuré, ces auteurs ont conclu à une meilleure absorption de la forme organique, probablement demeurée intacte. Hill *et al.* (1987a) ont observé des résultats similaires à ceux d'Ashmead *et al.* (1985) à l'aide de segments d'intestins (10 cm après le pylore) de poulets et de porcs. Ces auteurs ont conclu que plus de zinc provenant d'une source sous forme organique (zinc méthionine) que de chlorure de zinc est capté par le tissu intestinal de porc et de poulet. En revanche, les mêmes auteurs (Hill *et al.*, 1987b), puis Hempe et Cousins (1989) ont observé des phénomènes inverses chez le rat. Cependant, Hill *et al.* (1987a) ont démontré que le transfert de zinc de la lumière vers le milieu intérieur était identique pour les deux sources chez le porc et numériquement en faveur du chlorure de zinc chez le poulet. Plus encore, Beutler *et al.* (1998) ont démontré que les cellules intestinales

captent le zinc et la méthionine issus tout deux d'un complexe zinc-méthionine, indépendamment l'un de l'autre. Au total, à notre connaissance, l'amélioration de l'absorption intestinale de zinc sous forme organique n'a pas été démontrée.

c) Autres raisons mentionnées dans la presse, pour lesquelles les preuves scientifiques sont inexistantes ou discutables. Exemples repris par Mateos et al. (2005)

- Le minéral sous forme organique se présente sous une forme similaire à celle se trouvant dans l'organisme et est ainsi plus « naturel ». La raison, non évoquée par Mateos *et al.* (2005), mais personnellement recueillie sur le terrain, est basée sur une utilisation métabolique plus efficace d'une source liée à une protéine, telle que présente dans le corps (par exemple zinc lié à l'albumine dans le sang) qu'une source inorganique. Cette argumentation suppose que la source entre intacte dans le milieu intérieur et soit utilisée par l'animal, ce qui est loin d'être prouvé (Chapitre 2.3.5 b).
- Chaque minéral sous forme organique facilite l'absorption d'un autre minéral sous forme organique. La raison, non évoquée par Mateos *et al.* (2005), mais personnellement recueillie sur le terrain, est basée sur la problématique de la concurrence entre minéraux au site d'absorption (cf. 2.2.2). Pour éviter cette concurrence, cette argumentation suppose aussi que la source emprunte des voies alternatives d'absorption, ce qui n'a jamais été démontré (Chapitre 2.3.5 b).
- La forme organique favorise l'absorption passive du métal (pas de démonstration).
- La forme organique favorise la solubilité du minéral et son mouvement à travers la paroi cellulaire (pas de démonstration).
- Le minéral sous forme organique est plus stable en milieu acide (pas de démonstration).

En définitive, les seules expérimentations probantes sont celles qui ont été menées *in vivo*, à l'échelle de l'animal, et ont montré une amélioration du statut en zinc, lorsque des sources organiques de zinc plutôt que des sources inorganiques ont été utilisées dans des aliments contenant des ligands alimentaires, notamment des phytates (Wedekind *et al.*, 1992 ; 1994a ; Swiatkiewicz *et al.*, 2001 et Cao *et al.*, 2002). Toutes suggèrent bien que le facteur limitant de l'utilisation du zinc est sa solubilité intraluminale, qui pourrait être préservée lorsque le zinc est apporté sous forme organique.

2.4.4. La caractérisation des sources de zinc sous forme organique

La caractérisation usuelle des sources organiques de zinc consiste à en déterminer les teneurs en zinc, en azote et en eau et les propriétés physiques, telles que la densité, l'apparence et la granulométrie. A l'exception de la teneur en azote, ces informations peuvent être utilement collectées indépendamment du caractère organique ou inorganique de la source de zinc.

La dénomination « source de zinc sous forme organique » implique que l'identité de la source soit déterminée. Son intégrité en milieu aqueux doit également être vérifiée.

- Identité: au-delà de la formule chimique du produit, la part de zinc lié doit être quantifiée et la nature des liaisons du zinc au ligand doit être caractérisée.
- La solubilité et l'intégrité : la part de zinc soluble en milieu aqueux et l'intégrité des liaisons précédemment identifiées doivent être vérifiées.

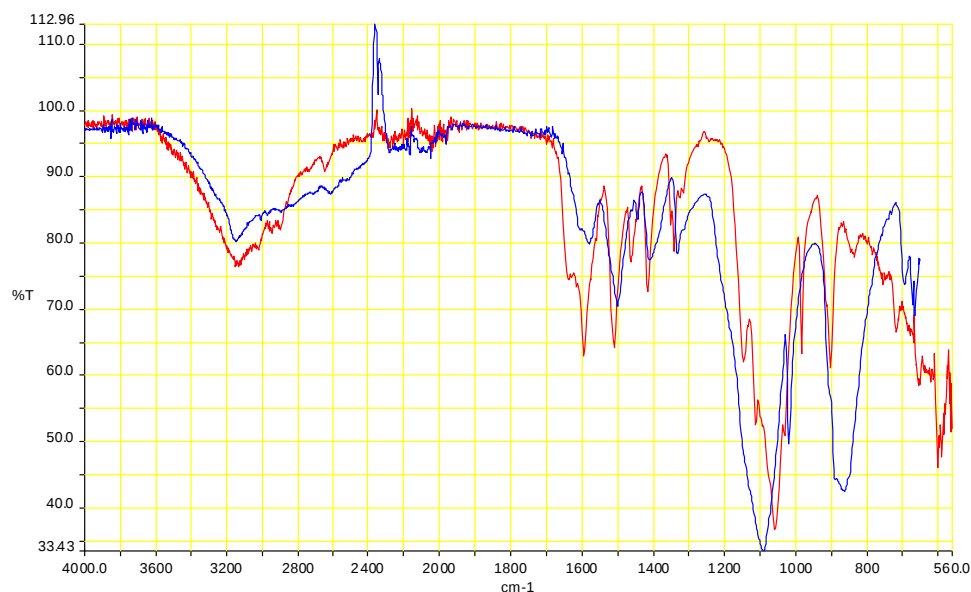
Selon l'Association of American Feed Control Officials (2001) et l'Union européenne (European Community, 2003), certaines classes de sources de zinc sous forme organique sont définies par des caractéristiques physico-chimiques, telles que le poids moléculaire ou des rapports molaires entre métal et ligand. Ces obligations légales devraient être vérifiables.

a) Identité

Spectroscopie proche infrarouge (ou near infrared spectroscopy, NIR)

La méthode proposée pour la caractérisation d'oligo-éléments sous forme organique par Hynes et Kelly (1995), consiste à mesurer la longueur d'onde des photons émis par l'énergie dégagée des vibrations d'électrons d'une molécule, dans le spectre proche infrarouge (800 et 2500 nm). Cette méthode, comparable à une empreinte digitale, permet de détecter qualitativement et de manière non destructive, si des liaisons entre métal et ligand sont présentes dans un produit à l'état solide. La méthode n'étant ni spécifique, ni quantitative, elle est limitée à la comparaison des spectres obtenus avec un lot de zinc par rapport à un témoin. Elle permet, par exemple, de vérifier si une source de zinc est un mélange physique de ses matières premières (sulfate de zinc et acide aminé) ou si les deux matières premières ont réagi chimiquement lors du processus de fabrication (Figure 9).

Figure 9 Comparaison du spectre d'un chélate de glycine de zinc (en rouge) avec un mélange équimolaire de glycine et de sulfate de zinc (en bleu).



Diffraction aux rayons X

La méthode permet de déterminer la distance entre chaque atome d'une molécule. La molécule doit se présenter sous forme cristalline, caractérisée par une disposition atomique constante et régulière. Les rayons X provoquent un déplacement des électrons par rapport au noyau de l'atome, dégageant une onde d'oscillations électromagnétiques. Cette longueur d'onde des rayons X représente les distances inter atomiques. La diffraction aux rayons X est la méthode par excellence pour définir l'identité chimique d'une molécule sous forme cristalline. Dans le cas de molécules dites amorphes (non cristalline) la diffraction aux rayons X peut également être utilisée (Hynes et Kelly, 1995), mais n'apporte pas plus d'informations que la spectroscopie infrarouge.

Les méthodes d'identification des liaisons proposées permettent de différencier des sources de zinc au moyen d'échantillons de référence. Elles permettent également de définir sans équivoque l'identité chimique d'une structure cristalline.

L'identification de molécules contenant du zinc mises en solution est aussi possible. Vacchina *et al.* (2009) ont présenté les premiers résultats de la détermination de l'identité et de l'intégrité d'un chélate de glycine de zinc cristallin en milieu aqueux. Ces auteurs ont utilisé un chromatographe en phase liquide à haute performance (HPLC) avec ICP MS couplé à un spectromètre de masse moléculaire (ESI MS/MS). L'HPLC avec ICP MS permet de vérifier l'identité de la molécule et L'ESI MS/MS permet de vérifier l'intégrité moléculaire. Cette méthode est plus sensible et moins longue que l'utilisation de la résonance magnétique nucléaire mentionnée par Hynes et Kelly (1995). Ce travail sera décrit plus amplement dans le

chapitre 2.3.6 qui décrit la source de zinc sous forme organique utilisée pour nos études expérimentales.

b) Les méthodes permettant de vérifier la solubilité du zinc et l'intégrité structurelle des sources en milieu aqueux

Solubilité du zinc

Cette méthode ne se limite pas aux sources de zinc sous forme organique. Elle peut également procurer des informations pour différencier des sources d'oxydes de zinc, par exemple. Pour les sources de zinc sous forme organique, les méthodes utilisées consistent à diluer la source de zinc dans un milieu aqueux, d'incuber, puis de filtrer le mélange. La concentration de zinc et éventuellement celle de l'azote est analysée sur le filtre (fraction considérée comme insoluble) et dans le filtrat (fraction considérée comme soluble). En milieu aqueux, la stabilité d'un complexe métallique dépend principalement du pH, du milieu et de la présence d'agents liants (Mortimer, 1987). Selon Brown et Zeringue (1994), le zinc de cinq sources sous forme organique était soluble à 100% à pH 2, mais cette proportion diminuait à pH 5 de façon d'autant plus importante que la concentration du produit dans le milieu était élevée. Selon Leach *et al.* (1997), le zinc de six sources de zinc sous forme organique était soluble à des taux très variables (de 5% à 90%) dans l'eau déionisée (pH 7). Cao *et al.* (2000) ont étudié la solubilité de huit sources de zinc sous forme organique à pH 2, 5 et 7. Les résultats à pH 2 et 5 étaient similaires à ceux de Brown et Zeringue (1994). Les proportions de zinc solubles à pH 7 variaient entre 17% et 75%, conformément aux résultats de Leach *et al.* (1997). En résumé, la solubilité du zinc de sources de zinc sous forme organique est réduite et la variabilité de celle-ci entre sources et augmentée par un accroissement du pH.

Brown et Zeringue (1994) recommandent aussi de calculer le rapport N / Zn sur le filtre et dans filtrat. Cette méthode permet, si ce rapport varie de la source d'origine, de déterminer avec certitude que métal et ligand ont été dissociés, mais ne permet pas de déterminer si le métal était lié au ligand dans la source à l'origine, ni après incubation en milieu aqueux. Ainsi, des analyses complémentaires du filtrat (fraction soluble) ont été proposées pour permettre de vérifier l'intégrité du composé en milieu aqueux.

Méthodes visant à vérifier l'intégrité des sources en milieu aqueux

Les méthodes proposées ont pour but de mieux caractériser le zinc présent dans la fraction soluble. Elles consistent toutes à mesurer, dans le filtrat, soit la teneur en zinc ionisé, soit la teneur en zinc lié.

Leach *et al.* (1997) ont analysé, par polarographie (électrode à gouttes tombantes de mercure), la part d'ions libres dans la fraction soluble. Cette fraction ionisée représentait 40%

à 90% du zinc soluble pour les sources de zinc sous formes organiques étudiées par les auteurs. Rapportée à la teneur totale en zinc, la part de zinc non-ionisée soluble, donc soluble et sous une forme liée était située entre 1% et 35%. Les auteurs ajoutent que la solubilité n'est pas corrélée avec la part de zinc non-ionisée soluble. Ces mesures par polarographie permettent de calculer une grandeur appelée quotient de chélation, fondé sur la quantité d'énergie nécessaire pour dissocier la source de zinc de son amalgame de mercure par rapport à un sulfate de zinc (Holwerda *et al.*, 1995). Des valeurs de quotient de chélation entre respectivement 0-10, 10-100 100-1000 et >1000 sont considérées comme caractéristiques de liaisons respectivement faibles, moyennes, fortes et très fortes.

Une autre méthode consiste à séparer par ultrafiltration les composés présents dans le filtrat selon leur taille moléculaire. Hynes *et al.* (1990) ont déterminé que respectivement 72% et 60% du zinc soluble (à pH 7) issus de deux protéinates ne traversaient pas la membrane de 500 Daltons. Helle et Kampf (2008) ont analysé neuf produits autorisés sous la dénomination de chélate de zinc et d'acides aminés, hydraté (European Community, 2003). Ces auteurs ont déterminé à pH 3, que plus de 85% du zinc soluble et une part variable de l'azote soluble (entre 5% et 90%, selon le produit) traversaient une membrane de 1000 Daltons. Un produit avec une différence importante entre la part de zinc et d'azote soluble qui traverse la membrane, présenterait peu de zinc lié.

Brown et Zeringue (1994) et Cao *et al.* (2000) ont utilisés la chromatographie à filtration sur gel. Le temps d'exclusion du métal libre et du métal lié présents dans la phase soluble permet de les différencier. Entre pH 2 et 5, le déplacement du zinc sur la colonne du chromatographe était similaire entre toutes les sources de zinc, qu'elles soient organiques ou sous forme de sulfate, ce qui indique que le zinc de ces sources était dissocié (Cao *et al.*, 2000). En revanche, ces auteurs ont mesuré à pH 7, que moins de 6% du zinc était lié pour les sources organiques contenant des acides aminés et entre 10 et 13% pour celles contenant des peptides ou des protéines.

L'intégrité des sources de zinc sous forme organique étudiées en milieu aqueux à l'aide des méthodes décrites tend à montrer que l'abaissement du pH conduit à la dissociation du zinc. La variabilité des résultats intra-expérience entre sources de zinc sous forme organique semble importante et aucun auteur n'a clairement pu mentionner si une classe de produits (AAFCO, 2001 ; European Community 2003) se distingue d'autres classes.

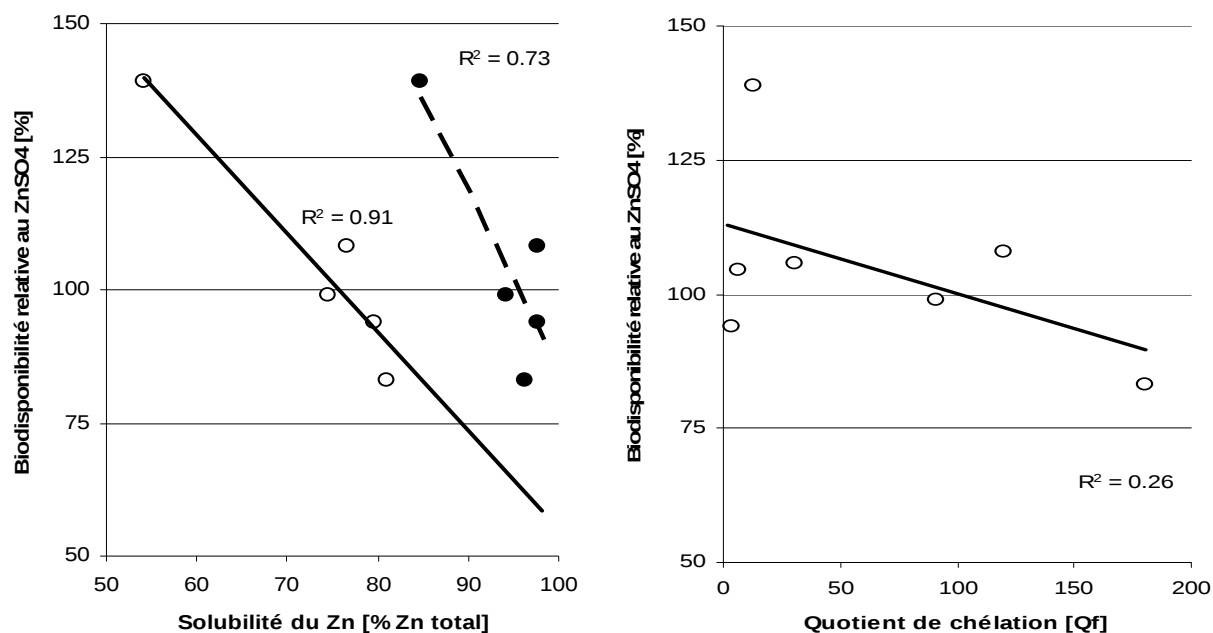
De façon plus marginale Heinrichs et Conrad (1983) ont proposé d'étudier le développement de populations microbiennes (soit *butyrivibrio fibrisolvins* ou population mixte issue du rumen) sur un milieu semblable à l'environnement du rumen, mais contenant comme seule source d'azote, celle provenant des produits testés. Le développement des micro-organismes était ralenti lorsqu'ils étaient cultivés sur le milieu contenant de l'azote provenant de zinc

méthionine par rapport à un milieu contenant la même quantité d'azote, mais provenant d'urée (sans zinc ajouté). Les auteurs ont conclu que l'azote provenant du zinc méthionine ne pouvait être utilisée par la population microbienne, suggérant l'intégrité de la source. Les auteurs n'ont pas communiqué le niveau d'incorporation des produits étudiés et le zinc peut également être toxique pour les micro-organismes lorsqu'il est présent à doses élevées (chapitre 2.1.6).

c) Corrélations entre la solubilité ou l'intégrité structurelle et la biodisponibilité

Deux études de biodisponibilité de zinc sur poulet de chair ont été effectuées avec des sources sous forme organique dont la solubilité du zinc à pH 2 et 5 et le quotient de chélation (Qf) avaient été déterminés (Cao *et al.*, 2000 ; Huang *et al.*, 2009). La corrélation entre ces analyses chimiques et la biodisponibilité relativement au ZnSO_4 , sur le critère de la concentration de zinc dans le tibia est illustrée à la Figure 10. Contre toute attente, les sources les plus disponibles étaient celles qui présentaient les valeurs de solubilité les plus faibles. La relation entre la biodisponibilité du zinc et le quotient de chélation est très faible. A ce jour, aucune méthode *in vitro* simple ne permet de prédire valablement les phénomènes qui se produisent *in vivo*.

Figure 10 Biodisponibilité relative du zinc de différentes sources de zinc¹ sous forme organique en fonction de leur solubilité à pH 2 (ligne traitillée) et 5 (ligne continue) et de leur quotient de chélation (d'après Cao *et al.*, 2000 ; Huang *et al.*, 2009).



¹ Mesurée chez le poulet de chair comme la réponse de la teneur en zinc du tibia à un apport croissant de zinc. La source de référence est le sulfate de zinc.

Il est possible que les milieux aqueux choisis pour pratiquer les méthodes de solubilité / intégrité évoquées plus haut ne permettent pas de rendre compte de la complexité du milieu gastro-intestinal. A cet égard, certains auteurs ont suggéré d'introduire les sources de zinc dans un aliment avant d'en déterminer la solubilité (Platt *et al.*, 1987 ; Steffen et Clydesdale, 1993 ; Siener *et al.*, 2001) et / ou d'étudier le produit dans un liquide digestif (Dintzis *et al.*, 1995 ; Susaki *et al.*, 1999 ; Ashida *et al.*, 2000). Chez le porcelet sevré, Dintzis *et al.* (1995) et Ashida *et al.* (2000) ont observé une solubilité du zinc plus élevée dans des digesta prélevés dans l'estomac (pH 4,5 ; solubilité du zinc 69%) que dans l'iléon (pH ~7.0 ; solubilité du zinc 26%) et le colon (pH 6.8 ; solubilité du zinc 0.5%). Ces données sont illustrées à la Figure 11. Suzaki *et al.* (1999) ont mesuré la solubilité du zinc dans l'iléon et la teneur en zinc du tibia en fonction de l'apport alimentaire de zinc chez le porcelet sevré. Avec un apport alimentaire de zinc croissant, la présence de zinc soluble dans l'iléon (calculée par la multiplication de la solubilité avec la teneur en zinc alimentaire) a augmenté de manière similaire à celle du zinc dans le tibia (Figure 12). Ces auteurs ont étudié deux sources de zinc avec l'apport de 150 mg Zn / kg d'aliment où la solubilité du zinc et la teneur en zinc du tibia se sont différenciés de façon comparable entre les sources. Contrairement aux études de solubilité et d'intégrité du zinc *in vitro* (Cao *et al.*, 2000 ; Huang *et al.*, 2009), les données de solubilité du zinc *in vivo* de Suzaki *et al.* (1999) semblent positivement corrélées avec sa biodisponibilité. Cependant, les résultats sont encore peu nombreux et la relation entre la solubilité d'une source de zinc à différents niveaux du tube digestif et sa biodisponibilité mérite d'être étudiée plus amplement.

Figure 11 Solubilité du zinc dans le tractus digestif du porc en fonction du pH du milieu (d'après Dintzis *et al.*, 1995; Ashida *et al.*, 2000).

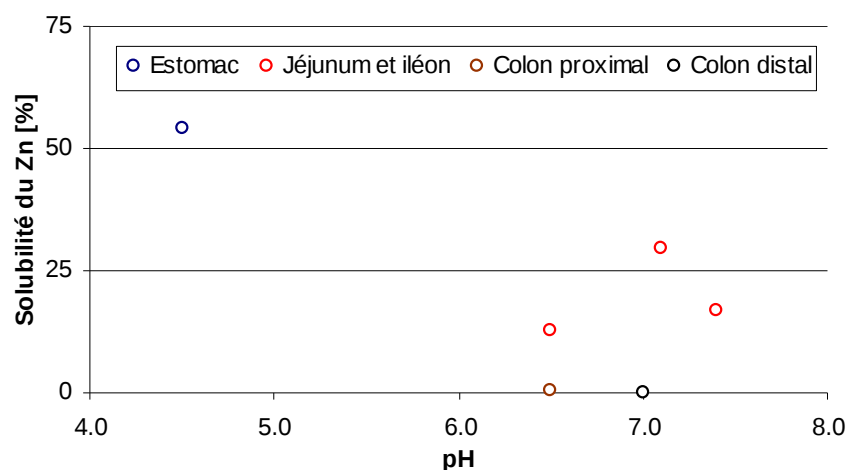
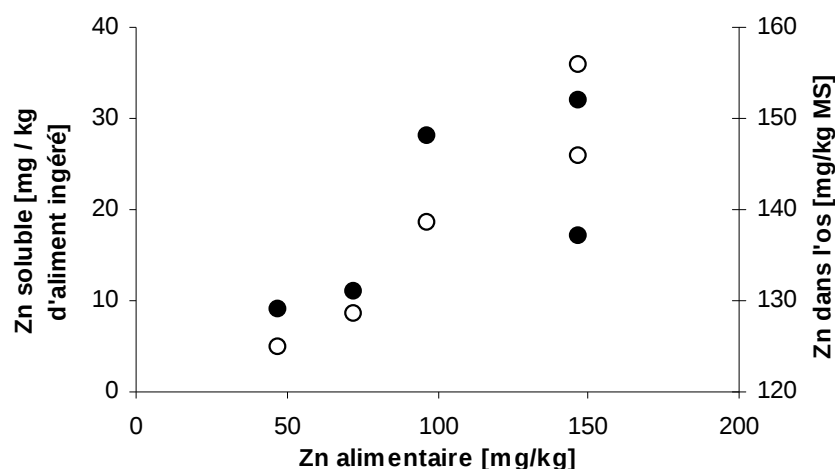


Figure 12 Evolution du zinc soluble dans l'iléon (en blanc) et de la teneur en zinc de l'os (en noir) en fonction de la teneur en zinc de l'aliment apporté à des porcelets sevrés (d'après Susaki et al., 1999).



2.4.5. Estimation *in vivo* des sources de zinc sous forme organique : importance du dispositif expérimental

De nombreuses publications rapportent des travaux pour lesquels l'objectif affiché est d'évaluer l'intérêt de sources organiques de zinc dans l'alimentation des porcs et des poulets. L'objectif peut être de déterminer la biodisponibilité relative de sources organiques de zinc, ou plus simplement de faire la démonstration de la possibilité d'utiliser une source donnée. Les différences entre ces études reposent souvent sur le niveau d'apport de zinc dans l'aliment et sur les critères de réponse choisis. Dans les lignes qui suivent, nous ne discuterons pas la pertinence des critères de réponse choisis qui le seront au chapitre 2.4. En revanche nous nous attacherons à décrire quelques types de protocole fréquemment rencontrés dans la littérature et de commenter l'adéquation entre le dispositif choisi et les conclusions tirées par les auteurs ou les utilisateurs de ces études.

Le premier type d'études consiste à comparer la réponse de différents indicateurs du statut en zinc à l'apport croissant de zinc sous la forme à étudier et sous une forme de référence (souvent le sulfate). En général, trois niveaux d'apport, identiques pour les deux sources, et ne permettant pas la couverture des besoins, sont pratiqués. La réponse attendue est linéaire et la biodisponibilité relative de la source à étudier peut être calculée comme décrit au chapitre 2.2.2. Les principaux critères de réponse à l'apport croissant de zinc sont le zinc absorbé, les teneurs en zinc plasmatiques et osseuses, certaines activités enzymatiques, comme l'activité de la PA mesurée dans le plasma. A l'INRA, Ce type de protocole a été mis en œuvre chez le poulet de chair par Mohanna et Nys (1999a) et chez le porcelet sevré par Revy *et al.*, (2002).

D'autres dispositifs ont été mis en œuvre de façon à démontrer qu'une source inorganique de zinc peut partiellement être remplacée par la source organique à étudier sans détérioration des performances (performances de croissance, morbidité, mortalité) ou du statut en zinc des animaux (teneur en zinc de l'os et de certains organes). La plupart du temps, le niveau d'apport de zinc pratiqué est conforme aux recommandations locales. Ce type d'études expérimentales, mis en œuvre chez le poulet de chair par Hudson *et al.* (2004) et chez le porcelet sevré par Kessler *et al.* (1996) apporte peu de renseignement sur la source à étudier si ce n'est une disponibilité non détériorée de façon significative par rapport à la source de référence. Il s'agit en définitive d'essais de démonstration visant à promouvoir l'utilisation des sources organiques de zinc sans augmentation trop sensible du coût de l'aliment.

D'autres études, assez nombreuses, comparent la réponse de porcelets sevrés à des aliments contenant, 3000 mg de zinc / kg sous forme d'oxyde ou 250 à 300 mg de zinc / kg sous forme organique. Souvent, les critères de réponse tels que les performances de croissance, la morbidité, la mortalité, la qualité des carcasses ne sont pas affectés par le traitement, alors que la teneur en zinc des fientes ou des fèces, selon l'espèce, sont augmentées. En l'absence de témoin négatif, qui permettrait de démontrer l'effet facteur de croissance de l'apport de 3000 mg de zinc sous forme d'oxyde / kg d'aliment et d'un aliment expérimental comparant les deux sources de zinc à des concentrations équivalentes, l'information apportée par ce type d'étude est mince : la réduction des apports alimentaires de zinc ne conduit pas à des variations notables des performances quand les niveaux d'apports restent au dessus du besoin et permet de réduire les rejets. Or, souvent, la conclusion qui est tirée de ces études (ou au moins suggérée et reprise dans le discours commercial) est que la source organique de zinc, apportée à un niveau physiologique, permet d'obtenir un effet facteur de croissance équivalent à l'apport de 3000 ppm de zinc sous forme d'oxyde, tout en ayant un effet bénéfique sur l'environnement et sans augmentation du coût de l'aliment. Le même type de dispositif est parfois mis en œuvre, sur poulets et porcelets sevrés, pour comparer des aliments supplémentés avec du zinc sous forme de sulfate à un niveau conforme à la réglementation européenne antérieure à 2003 (250 mg de zinc / kg d'aliment) à des aliments supplémentés avec une source organique de zinc à un niveau de 150 mg / kg d'aliment, conforme à la réglementation en vigueur (European Community, 2003). La seule conclusion possible de ce type d'étude est la même que précédemment, et tout aussi peu informative. Or, en dépit d'un dispositif non adapté, certains auteurs et discours commerciaux spéculent sur une meilleure biodisponibilité de la source organique de zinc qui expliquerait le maintien des performances et la réduction des rejets, en dépit de la réduction des apports.

2.4.6. Conclusion sur la caractérisation des sources de zinc sous forme organique et l'importance du dispositif expérimental *in vivo*

Jusqu'à présent, rares sont les sources de zinc sous forme organique qui ont fait l'objet d'une identification et pour lesquelles l'intégrité en milieu aqueux a été vérifiée. Le terme de « zinc sous forme organique » repose souvent uniquement sur la formule chimique du produit. La diversité des dispositifs expérimentaux *in vivo* pour étudier le zinc sous forme organique et la qualité des interprétations des résultats mène à une certaine confusion quant à la valeur alimentaire de ces sources. Pour utiliser les sources organiques de zinc en alimentation animale, il est nécessaire de leur attribuer cette valeur alimentaire. La seule façon de le faire consiste de mettre en œuvre les dispositifs adéquats permettant d'estimer leur biodisponibilité relative.

3. Etudes expérimentales

3.1. Objectifs de recherche

L'objectif de cette thèse est d'étudier la biodisponibilité de sources organiques de zinc et d'explicitier les conditions dans lesquelles il pourrait être avantageux de les utiliser dans l'alimentation des porcs et des poulets. L'étude bibliographique que nous avons menée indique que les interactions entre les composés alimentaires et les sources ajoutées de zinc pourraient être à l'origine des différences de biodisponibilité entre sources organiques et inorganiques. Elle montre par ailleurs que les phytates sont sans doute les composés les plus réactifs vis-à-vis du zinc. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier la source organique de zinc dans des aliments présentant des teneurs variables en phytates ou présentant des activités phytasiques différentes. Dans toutes ces expérimentations, la source inorganique de zinc était le sulfate heptahydraté.

La partie expérimentale de cette thèse est menée sur trois espèces animales en croissance (rat, poulet et porcelet) à l'aide de deux sources de zinc supplémentées (sulfate de zinc heptahydraté ; chélate de zinc de glycine).

La source organique de zinc choisie est, selon les termes de la législation européenne (European Community, 2006), un chélate de zinc et de glycine (B-TRAXIM® 2C Zn, Pancosma, Genève, Suisse, 230 g Zn / kg, ZnGly). Cette source, issue d'un outil de production industriel, a le grand avantage de posséder des propriétés physiques permettant l'identification de ses liaisons atomiques. Cette identification permet de garantir que le zinc contenu dans le produit est totalement lié à la glycine. Mais elle permet surtout, en cas de réponse *in vivo* similaire entre les deux sources de zinc, de ne pas imputer l'explication à une éventuelle défaillance qualitative de la source de zinc sous forme organique étudiée. La caractérisation physico-chimique de la source de zinc sous forme organique choisie est présentée au chapitre 3.2.

Dans le chapitre 3.3 est décrite la première expérimentation *in vivo*. Elle visait à comparer l'apport de zinc alimentaire sous forme ZnGly avec ZnSO₄ dans les meilleures conditions possible pour favoriser un effet antagoniste entre zinc et phytates alimentaire. Les meilleures conditions d'études ont été définies ainsi :

- Proportion maximale de zinc alimentaire issu des sources étudiées.
- Présence d'acide phytique dans l'aliment
- Apport en zinc alimentaire insuffisant pour permettre à l'animal une régulation homéostatique du zinc.

Cette première expérience était une étape « GO / NO GO » du projet d'étude. Elle a été conduite à l'Université de Freising-Weihenstephan (Allemagne), qui possède l'expertise de l'étude des flux de zinc chez le rat en croissance et chez le rat adulte. Cette expérience a donc été mise en place pour vérifier, chez le rat en croissance préalablement marqué au ^{65}Zn , si les flux entrant et sortant de zinc provenant de ZnGly et de ZnSO_4 se différenciaient. Les sources de zinc étudiées ont été introduites, à des niveaux ne permettant pas la maximisation du zinc plasmatique, dans un aliment pauvre en zinc natif et supplémenté avec du phytate de sodium. Dans le cas d'une amélioration des flux de zinc de la source sous forme organique relatif au sulfate, la confiance au produit étudié serait accrue et la mise en place des expériences *in vivo* prévues sur les espèces cibles seraient encouragés.

La seconde étude expérimentale, présentée au chapitre 3.4, a consisté à comparer la source organique de zinc à la source inorganique chez les espèces cibles (porcelet sevré et poulet), recevant des aliments à même de mettre en évidence l'impact des interactions entre phytates et zinc ajouté sur sa disponibilité. Les études ont été conduites à l'Institut National de Recherche Agronomique (St-Gilles et Nouzilly, France). Les aliments, à base de céréales, présentaient des teneurs en phytates variables et étaient additionnés ou non de phytase microbienne (3-phytase provenant d'*Aspergillus niger*, Natuphos®, BASF, Ludwigshafen, Allemagne). Contrairement à l'étude précédente, les phytates présents dans l'aliment étaient naturels et l'aliment de base contenait des quantités substantielles de zinc natif. Le choix des deux modèles animaux, porcelet sevré et poulet en croissance, outre leur intérêt pour la pratique, était motivé par le fait que :

- Une meilleure disponibilité des sources organiques de zinc avait été observée chez le poulet mais jamais chez le porc, sans qu'on puisse déterminer si ces résultats étaient liés à la composition des aliments (comme par exemple, la concentration de calcium plus élevée dans les aliments pour poulets par rapport aux aliments pour porcs, selon Wedekind *et al.*, 1994b) ou un effet propre de l'espèce.
- Il était établi que l'effet de la phytase microbienne sur la disponibilité du zinc était plus important chez le porc que chez le poulet (Jondreville *et al.*, 2005, 2007a). Il semblait alors, qu'un effet spécifique pouvait expliquer les différences entre porcs et poulets.

Les critères de réponse à l'apport alimentaire de zinc, phytates et phytases ont été les teneurs en zinc de l'os et du plasma, choisis en raison de leur fiabilité comme indicateurs du statut en zinc. De plus, afin de tenter d'expliquer les phénomènes sous-jacents, nous avons mesuré la solubilité du zinc aux niveaux gastrique et intestinal.

Dans le chapitre 3.5, nous avons mené une analyse de littérature, selon des techniques d'analyse quantitative, en vue de déterminer si l'usage de sources organiques de zinc présente un avantage dans l'alimentation du porc et du poulet par rapport aux sources inorganiques. Il s'agissait de faire le point sur les données récentes, publiées en nombre depuis la revue de Jongbloed *et al.* (2002).

3.2. Présentation des caractéristiques physico-chimiques de la source organique de zinc choisie (ZnGly)

Le produit utilisé (ZnGly) a été développé par l'entreprise Pancosma sur le site de production de Genève (Suisse). Il a été commercialisé en 2002 sous la gamme de produits B-TRAXIM® 2C. La gamme B-TRAXIM® 2C comprend quatre minéraux (Cu, Fe, Mn et Zn) sous forme organique avec l'utilisation de l'acide aminé glycine comme ligand. Ainsi, le produit est un glycinate de zinc (Figure 1) et correspond à la définition « Complexe de zinc et d'acide aminé spécifique » selon l'AAFCO (2001) et à la définition « Chélate de zinc de glycine, hydraté » selon la commission Européenne (2006). Le produit est exempt d'autres matériaux pouvant causer la diminution de sa teneur en zinc ou de modifier les propriétés physiques du produit. Diluer le produit avec de la silice, par exemple, permet de standardiser la teneur en zinc selon les vœux de la clientèle et / ou permet de limiter les risques de mottage.

a) Caractéristiques usuelles

Produit : B-TRAXIM® 2C Zn, glycinate de zinc.

Code de produit : 9522

N°lot : 50554

Date de fabrication : Juillet 2003

Couleur : blanchâtre

Teneur en Zn : 22.9%

Teneur en Gly : 27.1%

pH : 4.8 (5 g / l H₂O déionisée, 25°C)

Figure 1 Glycinate de zinc (B-TRAXIM[®] 2C).



b) Analyses de propriétés physiques supplémentaires

Les propriétés physiques de ZnGly suivantes ont été étudiées (Oguey et Durosoy, unpublished):

- Capacité de compression : Perte de volume relative à son volume initial lorsque le produit est mis sous vibration. Cette procédure réduit le volume d'air entre les particules qui se rapprochent lors de la vibration. Une perte de volume trop élevée (> 20%) est indésirable, car sa fluidité est réduite lorsque le produit est transféré de cellules en cellules par exemple. La perte de volume dans les sacs ou big bags entre leur remplissage à l'usine et leur arrivée chez le client peut également être un problème (stabilité des sacs sur les palettes lors de transports, ...)

Résultat : 16%

- Angle de repos : Un produit fluide s'étend sur une surface et présente un angle de repos faible. Une bonne fluidité du produit est désirée (angle de repos < 45°) pour éviter que du produit reste dans les sacs, par exemple.

Résultat : 35°

- Hygroscopicité : L'hygroscopicité est mesurée par la prise de poids (exprimée en %) lorsque le produit est exposé à un environnement humide et tempéré pendant une durée déterminée. Le risque de mottage du produit ou de fixation aux murs de l'usine est limité lorsque l'hygroscopicité est faible.

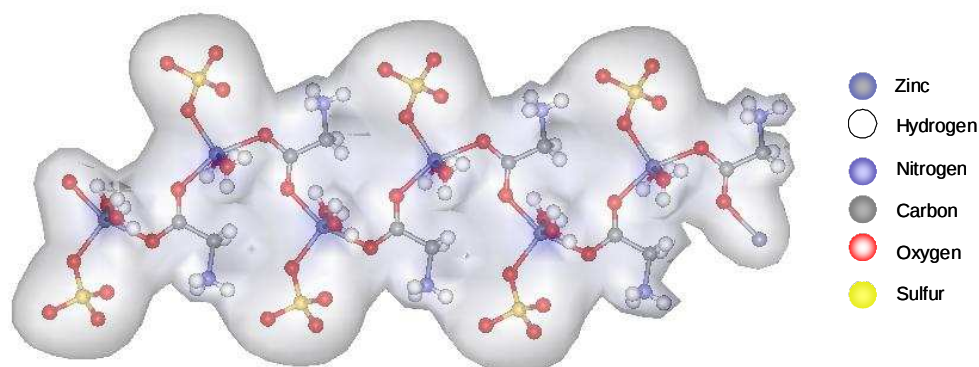
Résultat : <1%

Les résultats de ces tests physiques permettent de répondre aux exigences minimales de l'industrie (prémixeurs et moulins).

c) Identité et intégrité de ZnGly:

Un lot de production industriel a été défini comme produit de référence puis a été analysé par diffraction aux rayons X en collaboration avec le Département de Cristallographie de l'université de Neuchâtel, Suisse (Oguey *et al.*, 2008). L'identité de ZnGly démontre que chaque atome de zinc est lié à la glycine (Figure 2).

Figure 2 Schéma de la molécule du glycinate de zinc (B-TRAXIM[®] 2C).



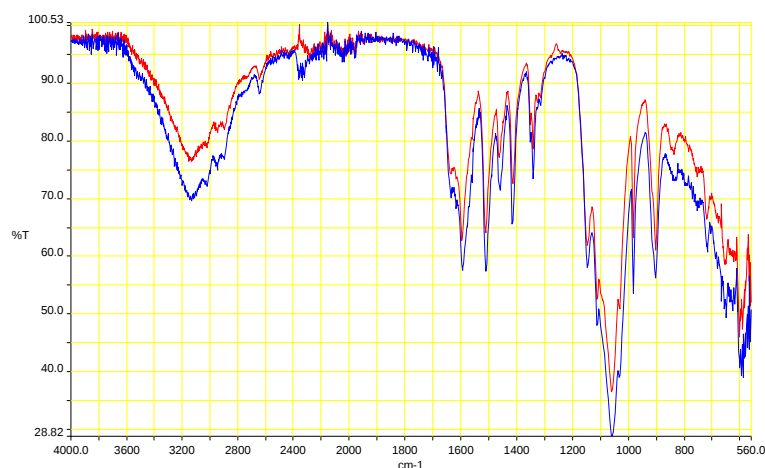
Formule chimique: $[\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2)(\text{H}_2\text{O})(\text{SO}_4)]_n$

Numéro CAS: 536974-54-6

Masse atomique : 290.50 uma ou 290.52 dalton

Le lot de fabrication ZnGly (n°50554) utilisé dans le cadre de l'expérience *in vivo* sur poulet de chair et porcelet (chapitre 3.4) a été analysé par Spectroscopie proche infrarouge, afin de vérifier si le lot correspondait au spectre du lot de référence (Figure 3). L'appareil utilisé pour cette analyse a été un FT-IR 16 PC de Perkin-Elmer avec un système de sampling « Golden Gate » de Perkin-Elmer (Oguey, unpublished).

Figure 3 Comparaison du spectre du glycinate de zinc lot n° 50554 (en rouge) avec le spectre du lot de référence.



Le spectre de ZnGly n°50554 présente des pics d'énergie aux mêmes longueurs d'ondes et à la même intensité que le produit de référence, ce qui garantit l'identité de notre lot expérimental.

Comme indiqué dans le chapitre 2.3.6, l'identité et l'intégrité d'un chélate de glycine de zinc cristallin peuvent être vérifiées en milieu aqueux (Vacchina *et al.*, 2009). L'utilisation de la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) avec ICP MS couplé à un spectromètre de masse moléculaire (ESI MS/MS) a permis de vérifier que ZnGly restait sous forme liée en milieu aqueux. L'HPLC avec ICP MS permet de vérifier l'identité de la molécule et l'ESI MS/MS permet de vérifier l'intégrité moléculaire. Les caractéristiques isotopiques du zinc permettaient de confirmer que, lorsque le produit est dilué dans de l'eau à pH 7, le métal de ZnGly reste lié à la glycine sous forme de $[\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2)(\text{H}_2\text{O})(\text{SO}_4)]$ ou de $[\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2)(\text{SO}_4)]_2$. Le pH de la solution a ensuite été graduellement abaissé jusqu'à pH 2 par étapes d'une unité de pH. Les paramètres mesurés ont été les caractéristiques isotopiques du zinc et la quantité de glycine libre. La concentration de $[\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2)(\text{SO}_4)]_2$ est restée inchangée. Dès que le pH a atteint la valeur de 5, la concentration de $[\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2)(\text{H}_2\text{O})(\text{SO}_4)]$ a graduellement diminué pour atteindre 55% du niveau initial à pH 2. Dès un pH de 4, la concentration de glycine libre a graduellement augmenté pour atteindre 140% du niveau initial à pH 2. Ces résultats indiquent qu'à partir d'un pH de 4, seule une partie des liaisons entre le zinc et la glycine restent intactes. Les résultats de l'identification de ZnGly indiquent qu'environ 80% à 90% des liaisons Zn-ligand sont restées intactes en milieu aqueux avec un pH, compris entre 4 et 7, représentatif des milieux gastrique du porcelet et intestinaux du poulet et du porcelet (Létourneau-Montminy, 2009).

Les connaissances acquises sur l'identité et l'intégrité de ZnGly sous forme pure ou solubilisée, qui attestaient de son caractère organique, nous ont conduits à la choisir comme modèle pour nos expérimentations *in vivo*.

3.3. Bioavailability of zinc glycinate in comparison with zinc sulphate in the presence of dietary phytate in an animal model with ^{65}Zn labeled rats.

ORIGINAL ARTICLE

Bioavailability of zinc glycinate in comparison with zinc sulphate in the presence of dietary phytate in an animal model with ^{65}Zn labelled rats

P. Schlegel¹ and W. Windisch²

1 Pancosma S.A., Le Grand-Saconnex/GE, Switzerland, and

2 BOKU, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria

Correspondence

Prof. Dr. Wilhelm Windisch, Department of Food Science and Technology, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Gregor Mendel-Strasse 33, A-1180 Vienna, Austria.
E-mail: wilhelm.windisch@boku.ac.at

Received: 4 February 2005;

accepted: 23 May 2005

First published online: 1 December 2005

Summary

The objective of this study was to quantify the bioavailability of zinc (Zn) from sulphate and glycinate as representatives of inorganic and organic zinc sources. The semi-synthetic basal diet contained 2 $\mu\text{g/g}$ of native Zn and was fortified with pure sodium-phytate (8 g/kg) in order to simulate conditions of common cereal-based meals. The basal diet was supplemented with either 53 $\mu\text{g/g}$ of Zn from sulphate (control) or 10 $\mu\text{g/g}$ of Zn from either sulphate (ZnSulphate) or glycinate (ZnGly). Twenty-four ^{65}Zn -labelled, growing rats weighing 133 g were allotted to the three diets (eight animals per treatment) and were kept pair-fed to ZnSulphate for 15 days. Zn contents in blood plasma, femur and whole body, as well as, plasma alkaline phosphatase activities were reduced compared with control indicating a zinc deficiency in ZnSulphate and ZnGly treatment. This allowed their differentiation in zinc bioavailability. True absorption of dietary Zn was significantly higher in ZnGly than in ZnSulphate (51% vs. 44%) while losses of endogenous faecal Zn and urinary Zn were not affected to a quantitatively relevant extent (mean: 17% and 2% of intake). This resulted in a +30% significantly improved Zn retention for ZnGly (33% vs. 25%) and a lower severity on Zn deficiency symptoms compared with ZnSulphate. Metabolic utilization accounted for 95% of absorbed dietary Zn for both Zn sources. Overall, the bioavailability of zinc glycinate was significantly superior by 16% to zinc sulphate (49% vs. 42%), mainly because of a higher absorptive potential at presence of a strong anti-nutritive component (phytate) in the diet.

Introduction

The bioavailability of supplemented zinc in monogastrics is mainly dependent on the chemical composition of the source used and its absorbability from the intestinal tract, which mainly depends on the reaction with dietary anti-nutritive components (e.g. Kirchgeßner et al., 1993; Ammermann et al., 1995). Dietary trace element formulations therefore often

contain organic zinc compounds as their bioavailability is considered to be superior to inorganic Zn sources like oxides or sulphates. However, there is only little quantitative data available on Zn bioavailability in terms of complete zinc fluxes from the diet across the intestinal tract up to the final retention in tissues including their separation from refluxes of Zn from endogenous sources, for example, by isotope techniques. Another methodological problem is the

fact that Zn fluxes are controlled by homeostatic regulation, which prevent the organism from an overflow with Zn by reduction of Zn absorption from the intestinal lumen, once the metabolic requirement for Zn is met (Weigand and Kirchgesner, 1978; Windisch and Kirchgesner, 1994, 1995). Consequently, Zn bioavailability can be quantified only at insufficient Zn supply when homeostatic counter-regulations are not active (Kirchgesner et al., 1993). Further difficulties arise from various interactions between the supplemented Zn formulation and strong chelators in the diet, of which especially phytate is highly abundant in common feed to monogastric agricultural livestock (swine, poultry). Recently, however, an animal model to induce Zn deficiency of controlled severity has been established on the base of a purified diet enriched with phytate at amounts reflecting cereal-based meals (Windisch and Kirchgesner, 1999a,b; Windisch, 2001, 2003). With this model it should be possible to simulate the interactions between Zn supplements and other dietary constituents, and hence to study the bioavailability of inorganic and organic Zn sources on a quantitative basis. In the present study, the inorganic Zn sulphate was tested against an industrially produced organic zinc glycinate complex, which was present in a pure crystalline structure (H. Stöckli-Evans, unpublished data) which therefore referred to a chemical identity. This organic zinc source could thus serve as a model to any other undefined organic zinc source.

Material and Methods

The present study comprised a pre-period (7 days) and a subsequent experimental period (15 days). During the pre-period, 24 rats [Sprague-Dawley (CrI:CD), Charles River, Sulzfeld, Germany] with an initial average body weight of 102 g were individually placed into metabolism cages. The climatic conditions were standardized (air temperature of 25 °C, relative humidity of 60%, light/dark cycle of 11:13 hours). The animals had free access to deionized water supplemented with 0.014% NaCl.

Rats were fed a semi-synthetic zinc diet based on purified casein, corn starch, sucrose, vegetal fat and cellulose containing 2 µg/g of native Zn (Table 1). Zn from Zn sulphate was added at amounts of 53 µg/g and also other minerals and vitamins were supplemented according to recommendations for growing rats (National Research Council, 1995). In order to simulate common cereal-based feeds, the semi-synthetic diet was enriched with pure phytate

Table 1. Composition of the basal diet

Component	Content (%)
Casein	20.00
Corn starch	34.70
Sucrose	28.00
Cellulose	3.00
DL methionine	0.20
Sunflower oil	1.00
Coconut fat	7.50
Vitamin mix*	0.25
Mineral mix†	4.55
Phytate‡	0.80

*Vitamins per kg of diet: 5000 IU all-trans retinol, 1000 IU cholecalciferol, 150 mg α-tocopherolacetate; 5 mg menadione-Na-bisulphite; 5 mg thiaminmononitrate; 10 mg riboflavin; 6 mg pyridoxine-hydrochloride; 20 mg Ca-D-pantothenate; 50 mg nicotinic acid; 1000 mg choline chloride; 1000 µg folic acid; 200 µg biotine; 25 µg cyanocobalamin.

†Minerals per kg of diet: 16.22 g CaCO₃; 17.60 g KH₂PO₄; 2.0 g Na₂HPO₄; 1.73 g KCl; 8.37 g MgCl₂·6H₂O; 0.496 g FeSO₄·7H₂O; 0.117 g CuSO₄·5H₂O; 0.207 g ZnSO₄·7H₂O; 0.307 g MnSO₄·H₂O; 1.2 mg NaF; 4.48 g NiSO₄·6H₂O; 0.504 mg Na₂MoO₄·H₂O; 0.667 mg Na₂SeO₃·5H₂O; 0.513 mg CrCl₃·6H₂O; 2.616 mg KI

‡Dodecasodiumphytate

(dodecasodium phytate; Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Germany) at the amount of 8 g/kg (Windisch and Kirchgesner, 1999a,b; Windisch, 2001, 2003). Furthermore, radioactive Zn was added (7 Bq ⁶⁵Zn per µg of total Zn) in order to label the animals (alimentary labelling technique, e.g. Windisch and Kirchgesner, 1994). The diet was fed restrictively at amounts of 13 g/animal/day between 9 and 10 AM in the morning and eventual left-overs were fed between 3 and 4 PM in the afternoon.

At the end of the 7 day pre-period, the dietary inclusion of ⁶⁵Zn was stopped. The animals were distributed into eight animal blocks of similar body weight (average: 133 g) and were allocated within block to three dietary treatments, which were composed by adding different amounts and sources of Zn to the semi-synthetic diet described above.

Treatment	Added Zn source	Zn addition (µg/g)	Total dietary Zn (µg/g)
1. control	Zn sulphate	53	55
2. ZnSulphate	Zn sulphate	10	12
3. ZnGly	Zn glycinate complex*	10	12

*B-TRAXIM® 2C G/Zn; Pancosma S.A., Le Grand Saconnex, Geneva, Switzerland. Chemical formula: [Zn(H₂O)₄(SO₄)₂](C₂H₃NO₂)₂Zn [H₂O]₄](C₂H₃NO₂)₂ n; CAS no 536974-57-9.

The different diets were fed for the following 15 days (experimental period). As low Zn supply in

treatments 2 and 3 (ZnSulphate, ZnGly) might have affected feed intake negatively, all animals were pair-fed to the average *ad libitum* feed intake of the ZnSulphate group. This method allowed equal zinc intake for treatments 2 and 3. Housing conditions were maintained as during the pre-period.

Individual daily faecal and urinary excretions were collected. At the end of the study (day 15), the animals were killed by decapitation under anaesthesia (diethyl ether) after not being fed for 24 h. The total individual blood was collected into heparinized tubes and separated into blood plasma and blood cells by centrifugation (3000 g). The right femur was dissected from every killed animal. The faecal and urine samples from experimental days 9 to 15 were pooled for each individual. These samples, as well as a sample of each treatment feed, the dissected femora and the residual animal bodies (including the residuals of the blood after separation of blood plasma) were mineralized in platinum vessels in a muffle furnace at 480 °C for 48 h. The ash was transferred into 0.3 N HCl solutions and analysed with the blood plasma samples for Zn (AAS 300; Perkin Elmer, Beaconsfield, UK) and ⁶⁵Zn (1282 Compugamma CS, Berthold, Munich, Germany). Blood plasma was analysed for the activity of alkaline phosphatase (commercial test kit; Boehringer, Mannheim, Germany). The individual Zn balance was calculated from Zn-intake and Zn-excretions via faeces and urine during experimental days 9 to 15. The true absorption of dietary Zn and faecal excretion of endogenous Zn was quantified by the isotope-dilution method modified for the alimentary labelling technique (Windisch and Kirchgessner, 1994). Metabolic utilization of absorbed Zn was estimated as proportion of endogenous faecal excretion plus retention to absorbed dietary Zn and bioavailability was defined as product of true absorption (% of intake) and metabolic utilization (%) (Kirchgessner et al., 1974, 1993; Bao et al., 1997).

The data was submitted to a two-factorial analysis of variance with 'treatment' and 'animal block' as factor levels. The mean values of the three treatments were tested for statistical difference by a multiple comparison procedure (Student-Newman-Keuls test). An additional linear contrast was performed between treatments 2 and 3 (ZnSulphate, ZnGly) in order to compare both Zn sources under the same condition of dietary Zn supply. The following result tables present the mean values of the treatment groups, the statistics of the linear contrasts and the pooled standard error (SE) derived from the respective analysis of variance. Data is statistically different with $p < 0.05$.

Results

The analysed zinc contents of the three treatment diets were 55.0 mg/kg for control, 11.6 mg/kg for ZnSulphate, 11.8 mg/kg for ZnGly respectively.

During the entire experiment, no visible indications of health problems occurred. Final body weight did not differ statistically between treatments (188 g on average; Table 2). The *ad libitum* feed intake of the ZnSulphate group decreased from 13 g/day to approximately 9 g/day within 4 days of treatment. This group served as basis for daily pair-feeding and hence the quantity of feed offered and consumed was equal among all animals [9.3 g per head and experimental day 9 to 15 (Zn balance period)].

As presented in Table 3, control animals consumed 516 µg Zn per day and lost 405 µg/day Zn through faeces, of which 48 µg/day were of endogenous origin. The respective apparent and true Zn absorption accounted for 22% and 31% respectively. The urinary zinc excretion was low (4 µg/day) and Zn retention averaged 107 µg/day (21% of Zn intake).

Animals treated with low Zn diets (ZnSulphate, ZnGly) consumed less Zn (108 µg/day) and excreted lower amounts of Zn via faeces (75 µg/day total including 18 µg/day of endogenous origin) than the

Treatment: dietary Zn source:	1: control:	2: ZnSulphate:	3: ZnGly:	
dietary Zn content	55 µg/g	12 µg/g	12 µg/g	SE
Body weight (g)	193	188	188	5
Alkaline phosphatase activity in blood plasma (U/l)	219 ^a	120 ^b	139 ^b	26
Blood plasma Zn (µg/ml)	1.36 ^a	0.71 ^b	0.76 ^b	0.12
Femur Zn (µg/g dry matter)	156 ^a	88 ^b	90 ^b	12
Whole body Zn (µg/g)	26.5 ^a	18.4 ^b	18.7 ^b	2.0

^{a,b,c}Comparison of three treatments: means without common superscripts are statistically different ($p < 0.05$)

Table 2. Final body weight and parameter of Zn supply status

Table 3. Balance, absorption, metabolic utilization and bioavailability of Zn

Treatment:				
dietary Zn source:	1: control:	2: ZnSulphate:	3: ZnGly:	
dietary Zn content	55 µg/g	12 µg/g	12 µg/g	SE
Zn intake (µg/day)	516	108	109	-
Faecal Zn				
Total (µg/day)	405 ^a	78 ^b	74 ^b	9
Endogenous (µg/day)	48 ^a	18 ^b	18 ^b	6
Apparent Zn absorption				
µg/day	111 ^a	29 ^b	38 ^b	9
% of intake	21.5 ^c	27.0 ^{b*}	34.7 ^{a*}	4.1
True Zn absorption				
µg/day	159 ^a	48 ^b	56 ^b	9
% of intake	30.8 ^c	44.2 ^{b*}	50.8 ^{a*}	3.9
Urinary Zn				
µg/day	4 ^a	3 ^b	2 ^b	1
% of intake	0.7 ^b	2.4 ^a	2.2 ^a	0.5
Retention of Zn				
µg/day	107 ^a	27 ^{b*}	35 ^{b*}	8
% of intake	20.7 ^b	24.7 ^{a*}	32.5 ^{a*}	3.9
Metabolic utilization (%)†	-	94.7 [*]	95.7 [*]	0.8
Bioavailability (%)‡	-	41.8 [*]	48.6 [*]	3.6

^{a,b,c}Comparison of three treatments: means without common superscripts are statistically different ($p < 0.05$)

^{*}Linear contrast: 'ZnSulphate' and 'ZnGly' are statistically different ($p < 0.05$)

†Metabolic utilization (%) = (Zn retention + endogenous faecal Zn)/true Zn absorption × 100

‡Bioavailability (%) = true Zn absorption (%) × metabolic utilization (%)
- Calculation not performed for control group (precondition of Zn deficiency not met)

control. In relation to Zn intake, the rates of apparent and true Zn absorption were significantly higher than in control animals (9 and 19 percentage units respectively). Urinary zinc losses were slightly reduced (3 µg/day) and average Zn retention rates exceeded the control level significantly by 8 percentage units. In daily amounts, however, Zn retention was severely depressed (33 µg/day) compared with control (107 µg/day). ZnSulphate and ZnGly depressed alkaline phosphatase (AP) activity (Table 2) and Zn content in blood plasma by 46% and 41% compared with the control group. Also Zn concentrations in femora and whole body were significantly reduced (43% and 30%).

Within low Zn diets (treatments 2 and 3), the Zn balance data of ZnGly treatment were superior to those of ZnSulphate (Table 3): At equal Zn intake, ZnGly animals lost significantly less Zn through faeces (65% vs. 73%). This effect was caused by 13% reduced excretions of (undigested) dietary Zn, while faecal Zn losses from endogenous sources remained constant. Consequently, apparent and true Zn

absorption rates were significantly higher in ZnGly than in ZnSulphate (35% vs. 27%; 51% vs. 44%). Urinary Zn losses were slightly lower in the ZnGly group (2 µg/day vs. 3 µg/day) and Zn retention was significantly improved (absolute values: 35 µg/day vs. 27 µg/day; percentage of Zn intake: 33% vs. 25%). Overall, the total Zn retained by ZnGly increased therefore by 30% compared with ZnSulphate. Metabolic utilization of absorbed dietary Zn accounted for 95% on average with statistically evident but quantitatively small superiority of ZnGly by 1 percentage unit compared with ZnSulphate. Zn bioavailability was significantly higher in ZnGly than in ZnSulphate (49% vs. 42%). The use of Zn from glycinate resulted in numerically improved AP activities (+16%) and tissue Zn concentrations (+7%, +3%, +2%) compared with Zn from sulphate (Table 2).

Discussion

The bioavailability of the essential nutrient Zn denotes the maximum rate, to which a dietary Zn formulation can provide the organism with physiologically utilizable Zn. In quantitative terms, this may be defined as maximum rate of true Zn absorption (influx of dietary Zn into the organism) multiplied by the maximum possible rate of metabolic utilization (Kirchgesner et al., 1974, 1993). The latter may be estimated roughly by the proportion of absorbed dietary Zn, which is used for Zn retention and excretion of endogenous faecal Zn (see also Bao et al., 1997). As the extent of Zn absorption and excretion is under control of Zn homeostasis, the bioavailability of a dietary Zn source should be quantified at insufficient Zn supplies. Under this condition, true Zn absorption and metabolic utilization of absorbed dietary Zn reaches its maximum (Kirchgesner et al., 1993). In general, Zn bioavailability depends mainly on the maximum rate of true absorption.

Previous studies on the absorptive potential of dietary Zn from chloride, sulphate, fumarate and histidine revealed quite high rates of true absorption in the range of 95% and more, when measured under condition of insufficient Zn supply (e.g. Weigand and Kirchgesner, 1979; Windisch and Kirchgesner, 1994). Similar results were obtained also for various sources of dietary Ca (Bao et al., 1997). In these studies, however, the diets consisted solely of purified components without any antagonists to mineral absorption (e.g. phytate). It may therefore be hypothesized that in case of antagonistic-free diets,

the absorptive potential and hence the bioavailability of zinc remains high and seems not being significantly affected by the chemical form of the supplemented zinc source. Variations in bioavailability, for example, between inorganic and organic Zn sources are more likely to be caused by a different extent to which the chemical formulation interacts with other dietary constituents, especially with other anti-absorptive components.

In diets to monogastric agricultural livestock and humans, phytate is one of the most important anti-absorptive agent because of its potential to form insoluble compounds with zinc, calcium and other multivalent cations under pH conditions present in the small intestine (e.g. O'Dell, 1989; Lönnerdal, 2000; Révy et al., 2003) and its high abundance (all seeds and by-products of seed processing). Phytate may thus severely depress the maximum absorptive potential of dietary Zn as has been demonstrated recently in a dose-response study under condition of insufficient Zn supply (Windisch and Kirchgesner, 1999a,b). Adding pure phytate to a semi-synthetic diet may therefore serve as a suitable model to test the bioavailability of different Zn sources to monogastric species under field conditions. This has been performed in the present study, where dietary phytate additions reflected the respective contents in cereal-based rations. Furthermore, the present dietary model has been repeatedly shown its suitability to induce Zn deficiency (e.g. Windisch and Kirchgesner, 1999a,b; Windisch, 2003), which is another prerequisite to quantify Zn bioavailability.

In the present study, diets supplemented with 10 µg/g of Zn from either sulphate or glycinate (treatments 2 and 3) resulted in significantly reduced Zn status parameter, such as AP activity in blood plasma, Zn concentrations in plasma, femur and whole body compared with the control treatment. These effects clearly demonstrated the presence of Zn deficiency and thus the absence of homeostatic counter-regulations in the ZnSulphate and ZnGly groups. True Zn absorption and metabolic utilization may therefore be attributed directly to the bioavailability of these two dietary Zn sources in rations rich in phytate.

Maximum rate of true Zn absorption ranged at 44% for dietary Zn originating from sulphate. Similar values were obtained also in a previous study based on a phytate-enriched, semi-synthetic diet (Windisch and Kirchgesner, 1999a). The low absorptive potential compared with the almost complete absorption rates observed in previous studies using purified diets without strong anti-absorptive

agents demonstrates again the detrimental effect of phytate on Zn bioavailability. Also with Zn glycinate as dietary Zn source, absorption rates were severely depressed, but not at the same extent than with zinc sulphate. Compared with Zn from sulphate, the apparent absorption rates and true absorption rates were significantly improved by 28.5% and by 14.9% respectively. Obviously, the anti-absorptive action of phytate is less pronounced in Zn supplied as glycinate. This is presumably because of the fact that glycinate is itself a complex agent, which competes with phytate for inorganic Zn and may thus increase the concentration of soluble and hence absorbable Zn directly at the intestinal micro-villi.

In the Zn-deficient treatment groups (ZnSulphate, ZnGly), the losses of endogenous faecal Zn were similar to other isotope studies using diets enriched with phytate (Windisch and Kirchgesner, 1999a; Windisch, 2001, 2003). The excreted quantities, however, exceeded substantially the levels observed at purified diets without additions of strong chelators (e.g. Weigand and Kirchgesner, 1978; Windisch and Kirchgesner, 1994). This confirms the concept that Zn is actively secreted from endogenous sources into the gastrointestinal tract (presumably as part of the digestive functions) and then is largely re-absorbed along the same routes as Zn of dietary origin, while endogenous faecal Zn reflects those quantities of secreted Zn which escaped re-absorption (Windisch and Kirchgesner, 1995, 1999a). In this context, the relatively high excretion level of endogenous faecal Zn demonstrates that the anti-absorptive action of phytate refers also to re-absorption of endogenously secreted Zn.

The type of dietary Zn source did not affect the level of endogenous faecal Zn excretion in Zn-deficient animals. As these amounts of Zn reflected endogenously secreted Zn, which could not be re-absorbed (mainly due to phytate), it may be concluded that dietary Zn source did not alter the utilization of absorbed Zn for secretion into the digestive tract. Also urinary Zn excretions were generally quite low and fluctuations between treatment groups were quantitatively negligible. This explains the slightly higher rates of metabolic utilization of Zn from glycinate compared with sulphate, as the almost constant urinary Zn losses were distributed among a higher amount of absorbed dietary Zn. This effect, however, is of minor quantitative relevance and hence in may be concluded that absorbed dietary Zn was metabolically utilized to a high extent and fairly independent of the type of formulation, by which the Zn was ingested. Similar observations

were retrieved also at sufficient Zn supply, where dietary Zn from several organic formulations and from sulphate showed no difference in metabolic utilization once Zn homeostasis has adapted to variations in intestinal Zn supply (Windisch et al., 2003). This leads to the hypothesis that bioavailability of common Zn sources depends primarily on the extent to which the respective chemical formulation is able to provide soluble Zn at the site of absorption in the face of various anti-nutritive components in the intestinal lumen, while the metabolic use of Zn is largely independent from the original chemical formulation once the process of absorption has uncoupled the Zn from its dietary carrier.

As a consequence of higher true absorption rates at unchanged metabolic utilization, the severity of Zn deficiency was less pronounced in animals supplied with Zn from glycinate than from sulphate. This effect is obvious from the higher levels of AP activity in blood plasma, as well as, Zn concentrations in plasma, femur and whole body. Also in beef cattle, the same zinc glycinate source revealed to be superior to zinc sulphate and zinc methionine with respect to absorption, as well as, to plasma and liver Zn concentrations (Spears et al., 2004).

Further studies on rats with organic trace mineral sources (zinc chelate) showed higher tissue deposits in hair, kidney and muscle compared with zinc sulphate (Power et al., 1995; Walter et al., 2002). In other studies however, Gallaher et al. (2000) failed to exert a beneficial effect on tissue Zn concentrations comparing organic Zn sources (Zn methionine, Zn amino acid complex) with zinc sulphate in rats supplied with Zn below requirement. In the same study, zinc supplied by a zinc polysaccharide source improved the measured parameters. These authors finally concluded that the zinc status would be affected by the type of ligand used. *In vitro* zinc absorbability in rats was reduced using zinc methionine as an organic zinc source compared with zinc chloride (Hempe and Cousins, 1989). Authors concluded that probably due to a reduced binding to the mucosal systems of absorption and cellular transport, Zn from zinc methionine was less absorbed and finally less concentrated in tissues. The above-mentioned studies differentiating inorganic and organic zinc sources on rats illustrate that the type of ligand to Zn, affected the zinc bioavailability in presence of phytate in the diets.

Overall, the present study demonstrated the zinc retention and bioavailability to be respectively 30% and 16% higher ($p < 0.05$) from zinc glycinate complex compared with zinc sulphate.

This was because of a better absorbability at presence of strong anti-nutritive components in the diet (phytate). Consequently, the phenomenon of varying Zn bioavailability may be assumed to originate mainly from the interaction between the dietary Zn and other ingested anti-nutritive components; this interaction being itself mainly affected by the chemical form of the zinc source supplemented. The use of dietary Zn sources with high bioavailability raises the safety of Zn supply in the face of commonly unknown variations in dietary contents of Zn as well as of strong anti-nutritive components, and hence helps to avoid accidental episodes of marginal Zn supply.

Marginal Zn supply affects physical performances (e.g. growth, fertility, milk production) negatively. In livestock production, this situation has to be strongly limited as subclinical deficiencies bring, in the end, a negative economical effect. The use of dietary Zn sources with high bioavailability, such as zinc glycinate, raises the safety of Zn supply which is regularly compromised due to unknown variations of native Zn contents in diet's raw materials, as well as, the presence of strong anti-nutritive components (e.g. phytate).

In several countries, the environmental concern increased on behalf of zinc and copper pollution. The European Union, for example, has recently reduced maximum supply of zinc and copper for agricultural livestock. In a situation, where animal performances and therefore zinc requirements are high, where feeds are mainly based on cereal compounds variable in zinc content and high in phytate, the risk in getting the animal into subclinical zinc deficiency has increased. In such a context, the use of the highly bioavailable zinc glycinate helps to increase the security of an adequate zinc status in the animal.

References

- Ammermann, C. B.; Baker, D. H.; Lewis, A. J., 1995: *Bioavailability of Nutrients for Animals – Amino Acids, Minerals and Vitamins*. Academic Press Inc., San Diego, CA. ISBN 012-056250-2.
- Bao, S.F.; Windisch, W.; Kirchgessner, M., 1997: Ca bioavailability of different organic and inorganic calcium sources (citrate, lactate, acetate, oyster shell, β -tri-Ca-phosphate). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **78**, 154–160.
- Gallaher, D. D.; Gallaher, C. M.; Shulman, S.; McElhome, A.; Brokken, K. A.; Shurson, G., 2000: Bioavailability

- of different sources of protected zinc. *Trace Elements in Man and Animals* **10**, 293–297.
- Hempe, J. M.; Cousins, R. J., 1989: Effect of EDTA and zinc-methionine complex on zinc absorption by rat intestine. *Journal of Nutrition* **119**, 1179–1187.
- Kirchgessner, M.; Müller, H.-L.; Weigand, E.; Grassmann, E.; Schwarz, F.J.; Pallauf, J.; Roth, H.-P., 1974: Zur Definition und Bestimmung der Absorbierbarkeit, intermediären Verfügbarkeit und Gesamtverwertung von essentiellen Spurenelementen. *Zeitschrift für Tierphysiologie, Tierernährung und Futtermittelkunde* **34**, 3–17.
- Kirchgessner, M.; Windisch, W.; Weigand, E., 1993: True bioavailability of zinc and manganese by isotope dilution technique. In: U. Schlemmer (ed.) *Bioavailability '93: Nutritional, Chemical and Food Processing Implication of Nutrient Availability*, Vol. 1. Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe, pp. 213–222.
- Lönnerdal, B., 2000: Dietary factors influencing zinc absorption. *Journal of Nutrition* **130**, 1278–1383.
- National Research Council, 1995: *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*, 4th revised edn. National Academy of Sciences, Washington, DC.
- O'Dell, B.L., 1989: Mineral interactions relevant to nutrient requirements. *Journal of Nutrition* **119**, 1832–1838.
- Power, R.; Flynn, A.; Cashman, K., 1995: Tissue deposition of zinc from zinc chelate and from inorganic zinc in rats. Proceedings of the 109th meeting of British Society of Animal Science p. 470 (Abstract No. 171).
- Révy, P. S.; Jondreville, C.; Dourmad, J. Y.; Nys, Y., 2003: Le zinc dans l'alimentation du porc: oligo-éléments essentiel et risque potentiel pour l'environnement. *INRA Productions Animales* **16**, 3–18.
- Spears, J. W.; Schlegel, P.; Seal, M. C.; Lloyd, K. E., 2004: Bioavailability of zinc from zinc sulfate and different organic zinc sources and their effects on ruminal volatile fatty acid proportions. *Livestock Production Science* **90**, 211–217.
- Walter, A.; Krämer, K.; Most, E.; Pallauf, J., 2002: Zinc bioavailability from zinc lipoate and zinc sulfate in growing rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **16**, 169–174.
- Weigand, E.; Kirchgessner, M., 1978: Homeostatic adjustments in zinc digestion to widely varying dietary Zinc intake. *Nutrition and Metabolism* **22**, 101–112.
- Weigand, E.; Kirchgessner, M., 1979: Zur Absorbierbarkeit von Zink aus unterschiedlichen Verbindungen. *Zeitschrift für Tierphysiologie, Tierernährung und Futtermittelkunde* **42**, 137–147.
- Windisch, W., 2001: Homeostatic reactions of quantitative Zn metabolism on deficiency and subsequent repletion with Zn in ^{65}Zn labeled adult rats. *Trace Elements and Electrolytes* **18**, 122–128.
- Windisch, W., 2003: Development of zinc deficiency in ^{65}Zn labeled, fully grown rats as a model for adult individuals. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **17**, 91–96.
- Windisch, W.; Kirchgessner, M., 1994: Zur Messung der homöostatischen Anpassung des Zinkstoffwechsels an eine defizitäre und hohe Zinkversorgung nach alimentärer ^{65}Zn -Markierung. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **71**, 98–107.
- Windisch, W.; Kirchgessner, M., 1995: Anpassung des Zinkstoffwechsels und des Zn-Austauschs im Ganzkörper ^{65}Zn -markierter Ratten an eine variierende Zinkaufnahme. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **74**, 101–112.
- Windisch, W.; Kirchgessner, M., 1999a: Zn absorption and excretion in adult rats at Zn deficiency induced by dietary phytate additions. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **82**, 106–115.
- Windisch, W.; Kirchgessner, M., 1999b: Tissue Zn distribution and Zn exchange in adult rats at Zn deficiency induced by dietary phytate additions. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **82**, 116–124.
- Windisch, W.; Vikari, A.; Hilz, C., 2003: Homeostatic response of Zn metabolism to dietary Zn supplements from sulfat, gluconate, orotate, aspartate or histidine in ^{65}Zn labeled non-growing rats as a model to adult individuals. *Trace Elements and Electrolytes* **20**, 125–133.

3.4. Zinc availability and digestive zinc solubility in piglets and broilers fed diets varying in their phytate contents, phytase activity and supplemented zinc source.

Animal (2010), 4:2, pp 200–209 © The Animal Consortium 2009
doi:10.1017/S1751731109990978



Zinc availability and digestive zinc solubility in piglets and broilers fed diets varying in their phytate contents, phytase activity and supplemented zinc source

P. Schlegel^{1,2†}, Y. Nys³ and C. Jondreville^{4a}

¹Agroscope Liebefeld-Posieux, Research Station ALP, 1725 Posieux, Switzerland; ²INRA, AgroParisTech, UMR791 Physiologie de la Nutrition et Alimentation, 75231 Paris, France; ³INRA, UR83 Recherches Avicoles, 37380 Nouzilly, France; ⁴INRA, Agrocampus, UMR1079 Systèmes d'élevage Nutrition animale et humaine, 35590 Saint-Gilles, France

(Received 15 September 2008; Accepted 13 August 2009; First published online 19 October 2009)

The study was conducted to evaluate the effects of dietary zinc addition (0 or 15 mg/kg of Zn as inorganic or organic zinc) to three maize-soybean meal basal diets varying in their native Zn, phytic P contents and phytase activity (expressed in kg of feed: P– with 25 mg Zn and 1.3 g phytic P; P+ with 38 mg Zn and 2.3 g phytic P or P+/ENZ being P+ including 500 units (FTU) of microbial phytase per kg) in two monogastric species (piglets, broilers). Measured parameters were growth performance, zinc status (plasma, and bone zinc) and soluble zinc in digesta (stomach, gizzard and intestine). The nine experimental diets were fed for 20 days either to weaned piglets (six replicates per treatment) or to 1-day-old broilers (10 replicates per treatment). Animal performance was not affected by dietary treatments ($P > 0.05$) except that all P– diets improved body weight gain and feed conversion ratio in piglets ($P < 0.05$). Piglets fed P– diets had a better Zn status than those fed P+ diets ($P < 0.05$). In both species, Zn status was improved with supplemental Zn ($P < 0.05$), irrespective of Zn source. Phytase supplementation improved piglet Zn status to a higher extent than adding dietary Zn, whereas in broilers, phytase was less efficient than supplemental Zn. Digestive Zn concentrations reflected the quantity of ingested Zn. Soluble Zn (mg/kg dry matter) and Zn solubility (% of total Zn content) were highest in gizzard contents, which also presented lower pH values than stomach or intestines. The intestinal Zn solubility was higher in piglet fed organic Zn than those fed inorganic Zn ($P < 0.01$). Phytase increased soluble Zn in piglet stomach ($P < 0.001$) and intestine ($P = 0.1$), but not in broiler gizzard and intestinal contents. These results demonstrate (i) that dietary zinc was used more efficiently by broilers than by piglets, most probably due to the lower gizzard pH and its related higher zinc solubility; (ii) that zinc supplementation, irrespective of zinc source, was successful in improving animal's zinc status; and (iii) suggest that supplemented Zn availability was independent from the diet formulation. Finally, the present data confirm that phytase was efficient in increasing digestive soluble Zn and improving zinc status in piglets. However, the magnitude of these effects was lower in broilers probably due to the naturally higher Zn availability in poultry than in swine.

Keywords: zinc, phytate, piglet, broiler, availability

Implications

The study conducted in parallel on two species (weaned piglets and broilers) allow a better understanding in the use of dietary zinc originating from native or supplemented sources. To optimize feed formulations on Zn, this study confirms that both Zn sources were equivalent in their efficacy to provide available Zn. This, as supplemental Zn would not react with native phytate molecules. This study also illustrates, especially in pigs, the efficacy of phytase to

improve the availability of dietary native Zn. The known antagonism between dietary phytate and Zn should therefore be considered only for native Zn.

Introduction

Zinc is an essential trace mineral for swine and poultry, but also a toxic metal for the soil and environment when supplied in excess. Natural Zn concentrations in feedstuffs are generally lower than the daily Zn requirement for weaning piglets or broilers leading to the necessity of dietary Zn supplementation. Because of the high variation in dietary Zn and Zn antagonists (calcium, phytate, fibers

[†] E-mail: patrick.schlegel@alpadmin.ch

^a Present address: INRA, Nancy-Université, USC340, Animal et fonctionnalités des produits animaux, 54505 Vandœuvre-les-Nancy, France.

and so on), Zn supplementation is generally supplied with high safety margins for Zn; even when not supplied for pharmacological purposes in piglets. High safety margins in Zn lead to unbalanced manure composition relative to nitrogen (Mohanna and Nys, 1998) and to environmental concerns in areas with concentrated livestock production (Dourmad and Jondreville, 2008; Römkens *et al.*, 2008). Along with new legal limitations on dietary Zn supply (e.g. European Community, 2003), there is a need for new approaches to maximize the efficiency of Zn use to optimize productivity and minimize environmental Zn load.

Zinc is supplemented either in inorganic (oxides, sulfates and so on) or organic forms (non-ionic chemical bond between the Zn atom and the ligand, generally an amino acid). Inorganic salts are ionized in liquid environments and are suspected to react with other feed components. Zn in particular, forms insoluble complexes with phytate in the digestive tract leading to reduced Zn availability for monogastrics (O'Dell and Savage, 1960; Davies and Nightingale, 1975; Windisch and Kirchgesner, 1999). Calcium reinforces this reduced Zn availability by stabilizing phytates (Oberleas *et al.*, 1966). According to Dintzis *et al.* (1995) and Susaki *et al.* (1999), these antagonists alter Zn availability by depressing its solubility in the digestive tract. Demonstrations of increased Zn availability when feeding organic Zn sources compared to Zn sulfate in the presence of phytate were reported by Power *et al.* (1994) and Schlegel and Windisch (2006) in rats. According to these authors, organic Zn sources have a reduced reaction to dietary Zn antagonists, such as phytate, and present a solubility in the digestive tract favorable for an improved Zn absorbability. Increased Zn availability in broilers using organic Zn sources has also been reported by Wedekind *et al.* (1992) but remains unconfirmed in piglets by the same research group (Wedekind *et al.*, 1994). Referring to these studies, the authors suggested that the higher Ca content in the broiler diets, a potential Zn antagonist, may explain the increased availability of the organic source in broilers compared with piglets (Wedekind *et al.*, 1994). However, physicochemical conditions and transit time in the digestive tract of both species may also contribute to different Zn solubility in the digestive tract, and, in turn, to different Zn availability in piglets and broilers.

The aim of this study was to investigate the digestive zinc solubility and zinc availability in piglets and broilers fed diets varying in their phytate contents, phytase activity and zinc source supplementation. The experimental diets were identical for piglets and broilers to allow direct species comparison. The nine experimental diets were therefore formulated to meet the nutrient requirements, except Zn, of the most demanding species.

Material and methods

Experimental diets

Three iso-energetic, iso-nitrogenous and iso-Ca/P maize-soybean meal basal diets (P–; P+; P+/ENZ) were formulated to be differentiated in their phytic P concentration and phytase

activity and to meet or exceed all nutrient requirements of weaned piglets and broiler starters, except for Zn (Institut National de la Recherche Agronomique, 1989; Institut National de la Recherche Agronomique-Association Française de Zootechnie, 2004). Nutrients, except Zn, were therefore adjusted to meet requirements of the most demanding specie. To achieve two different concentrations of phytic P, plant feed-stuffs (soybean meal, heated wheat bran and isolated soybean protein) present in the basal diet high in phytic P (P+) were replaced with fish meal, casein, corn starch and cellulose in the basal diet low in phytic P (P–). The third basal diet (P+/ENZ) was made by incorporating 500 units (FTU) of microbial phytase per kg (phytase produced by *Aspergillus niger*, 6970 FTU/g; Natuphos[®], BASF, Ludwigshafen, Germany) into basal diet P+. Wheat bran was heated (twice 2 min at 900 W in microwave oven) to eliminate any intrinsic phytase activity. Frapin (1996) indicated that this heating treatment denatures plant phytase to a major extent. No basal diet was supplemented with Zn and their premix was Zn-free. The ingredient and chemical composition of the three basal diets P–, P+ and P+/ENZ are presented in Table 1. Nine experimental diets were formulated: each basal diet was supplemented with 0 or 15 mg Zn/kg issued from zinc sulfate heptahydrate (ZnSulf, 326 g Zn/kg feed grade) or 15 mg Zn/kg from zinc glycine chelate (ZnGly, 214 g Zn/kg; B-TRAXIM[®], Pancosma, Geneva, Switzerland) according to the defined terms in EU legislation (European Community, 2006). All experimental diets were pelleted (maximum 62°C, 2.5 mm). Piglets and broilers were fed the same experimental diets with the exception of anticoccidiostats (500 mg/kg), which were incorporated before pelleting into the experimental diets fed to broilers.

Animals and experimental procedures

Piglet experiment. One hundred and eight piglets (Pietrain × (Landrace × Large White); female: castrate 1:1) were weaned and placed by pairs into plastic/inox pens and fed, *ad libitum*, the unsupplemented experimental diet P+ for a 6-day adaptation period. Following the adaptation period, 54 piglets were allocated to six blocks on the basis of gender (three blocks of female and three of castrates), BW and litter. The 54 selected piglets were 27 ± 1-day old and weighed 8.8 ± 1.1 kg at weaning. The nine piglets from each block were placed in individual plastic/inox pens and randomly allocated to one of the nine experimental diets for 20 days. Diets were fed restrictively (3.5% of BW) divided in three daily and equal meals. Water was available *ad libitum*. Before the first and the last experimental days, a night of fasting was introduced. On the last experimental day (day 21), piglets were fed two-thirds of their previous daily consumption until 2 h before anesthesia (electric shock), which was followed by bleeding. The two climatically controlled rooms were set at a constant temperature (25°C ± 1°C).

Broiler experiment. Two hundred and twenty, 1-day-old broilers (Ross) were placed in 96 plastified cages, each containing a plastified feeder and a plastic water nipple.

Table 1 Composition of basal diets P– and P+ and P+/ENZ (as fed basis)

	P–	P+	P+/ENZ
Ingredients (g/kg)^a			
Maize	593.0	593.0	593.0
Wheat bran, heated ^b	0.0	112.5	112.5
Soybean meal, 48% crude protein	0.0	39.5	39.5
Soybean protein, isolated	0.0	123.5	123.5
Casein	106.5	30.0	30.0
Maize starch	159.2	0.0	0.0
Fishmeal	73.0	0.0	0.0
Sunflower oil	6.0	42.0	42.0
Cellulose	18.0	0.0	0.0
Monocalcium phosphate	14.2	24.5	24.5
Calcium carbonate	18.3	18.5	18.5
NaCl	2.0	3.0	3.0
L-Lysine HCl	1.1	4.0	4.0
L-Threonine	1.3	1.6	1.6
DL-Methionine	1.7	2.2	2.2
L-Tryptophan	0.7	0.6	0.6
Phytase (FTU/kg) ^c	0	0	500
Vitamin and mineral premix ^d (Zn-free)	5.0	5.0	5.0
Nutrient composition			
Dry matter (DM, g/kg) ^e	884	896	896
Crude protein (CP, N × 6.25, g/kg) ^e	213	233	233
Crude fiber (CF, g/kg) ^f	30.2	29.9	29.9
Ash (g/kg) ^e	45.5	60.5	60.5
Net energy pig (MJ/kg) ^f	10.8	10.6	10.6
Metabolizable energy broiler (ME, MJ/kg) ^f	13.4	13.3	13.3
Ca (g/kg) ^e	10.3	14.0	14.0
P (g/kg) ^e	6.6	10.4	10.4
Phytic P (g/kg) ^e	1.3	2.3	2.3
Phytase activity (FTU/kg) ^e	27	201	688
Zn (mg/kg) ^{e,g}	25	38	38
Phytic acid/Zn (mol/mol)	18	21	21
Phytic acid × Ca/Zn (mol/kg DM)	5.3	8.3	8.3

^aDiets for broilers contained 0.5 g coccidiostats/kg.^bHeated twice for 2 min at 900 W in a microwave oven.^cMicrobial phytase produced by *Aspergillus niger* (6970 FTU/g; Natuphos®, BASF, Ludwigshafen, Germany).^dVitamins supplied per kg of diet: 15 000 IU vitamin A, 3000 IU vitamin D3, 40 IU vitamin E (α-tocopherolacetate), 2 mg vitamin K3 (menadione), 2 mg vitamin B1 (thiamine), 10 mg vitamin B2 (riboflavin), 30 mg vitamin B3 (PP, niacin), 15 mg vitamin B5 (panthotenic acid), 10 mg vitamin B6 (pyridoxine), 0.2 mg vitamin B8 (biotin, H), 2 mg vitamin B9 (folic acid), 0.05 mg vitamin B12 (cyanocobalamin), 100 mg vitamin C (ascorbic acid), 800 mg choline, 30 mg Fe (FeSO4), 20 mg Cu (CuSO4), 40 mg Mn (MnO), 2 mg Co (CoSO4), 1 mg I (Ca(IO3)2), 0.3 mg Se (Na2SeO3).^eAnalyzed as described under the section Material and Methods.^fCalculated using Institut National de la Recherche Agronomique – Association Française de Zootechnie (2004).^gAnalyzed Zn concentration in P–, P+ and P+/ENZ supplemented with Zn as sulfate was 41, 54 and 54 mg/kg, respectively; analyzed Zn concentration in P–, P+ and P+/ENZ supplemented with Zn as glycinate was 42, 52 and 53 mg/kg, respectively.

Broilers were fed a standard commercially available starter diet during the first 2 days following hatching. On the second day, 180 broilers having the nearest BW to the mean were selected and allocated by BW to 10 blocks of nine

cages. Each cage contained two animals, and one from each block was randomly allocated to one of the nine experimental diets for 20 days. Feed and water was available *ad libitum*. To stimulate intake before the end of the experience, all experimental diets were removed for 5.5 h and reintroduced for the last 2.5 h before lethal injection of pentobarbital. Broilers were housed in one climatically controlled room. The temperature was progressively decreased from 33°C to 26°C. The light was permanently on during the first 2 days following hatching, then on for 23 h per day.

Data and sample collection and analysis

A sample from each treatment diet was taken and frozen (–20°C). A sample of 10 ml of drinking water was taken (daily in the piglet unit and weekly in the broiler unit) and analyzed for Zn content. Feed intake (FI) was recorded for the individual pig on a daily basis and for each broilers cage on a weekly basis. Piglets and broilers were individually weighed at the start and end of the experimental period. Blood samples were collected from each piglet at the jugular vein with heparinized 10-ml tubes on weighing days. Blood samples from each broiler were collected with heparinized 7.5-ml tubes from the alary vein before lethal injection. Blood samples were centrifuged (3000 × g, 10 min, 4°C) and plasma was frozen (–20°C). At slaughter, the right metacarpal IV from the piglets and the right tibia from the broilers were collected, autoclaved at 120°C for 20 min, cleaned from any soft tissues and were frozen (–20°C). Within 30 min following piglet slaughter, stomachal and intestinal (length of 70 cm from the pylori) contents were collected separately, lyophilized and frozen (–20°C) after their pH was measured. Within 10 min after broiler slaughter, the same process was conducted for the gizzard and the complete small intestine.

Basal diets P– and P+ were analyzed for crude protein (CP; N × 6.25), phytic P, P and Ca contents. Basal diets P–, P+ and P+/ENZ were analyzed for phytase activity. Zn was analyzed in all experimental diets, water samples, bones, plasma and digesta. Soluble Zn was analyzed in digesta. Alkaline phosphatase (AP) activity was measured in plasma. All analyses were performed in duplicate. Dry matter (DM) was measured by drying at 103°C until constant weight. Nitrogen was determined by the Kjeldahl method according to the French standard AFNOR (NFV 18-100) using a Kjelfoss apparatus (A/S N Foss Electric, Denmark). Phytic P was determined by ion-pair HPLC (Column C18, Hypersyl C 18-5 μm 200 × 2 mm, Interchim, Montluçon, France) after acidic extraction and anionic exchange purification according to the method developed by Sandberg and Adherinne (1986) and modified by Lehrfeld (1989). Phytase activity was measured colorimetrically after incubation in a sodium phytate solution (Engelen *et al.*, 1994). One phytase activity unit (FTU) is the amount of enzyme that liberates 1 μmol of inorganic P from 5.1 mmol/l solution of sodium phytate per minute at pH 5.5 and 37°C. Plasmatic AP activity was determined using the procedure from Biomérieux (Biomérieux 63609, Marcy l'Etoile, France) on Cobas Mira apparatus (Hoffman-La Roche, Nutley, NJ, USA).

Samples were treated as follows before mineral analyses: 1.0 ml of plasma, mixed with 0.5 ml HCl 3N and 0.5 ml of 40% trichloroacetic acid, was centrifuged at $3000 \times g$ for 15 min. The supernatant was collected and diluted in 3 ml of deionized water. Each bone was sectioned longitudinally, dried overnight at 103°C , weighed and then ashed at 550°C for 12 h in a muffle furnace. Ash was weighed and ground. Samples of diets and lyophilized digesta were ashed at 550°C for 8 h in a muffle furnace. Bone, feed and digesta ashes were solubilized using nitric acid 16N and hydrogen peroxide 30% on a digestion block until dry and nitric acid 0.4N for dilution before analysis. To determine the soluble Zn content in the digesta, samples were rehydrated (0.3 g lyophilized digesta for 10 ml deionized water) and stirred constantly at 38°C during 2 h. Supernatants were clarified by ultracentrifugation ($18000 \times g$, 1 h, 20°C) and separated by filtration ($45 \mu\text{m}$). The filtrated supernatant was acidified with one drop of HNO_3 16N before mineral analysis. Calcium and Zn were analyzed by flame atomic absorption spectrophotometry (SpectrAA 220 FS; Varian, Springvale, Australia). Phosphorus was analyzed by the Vanadate colorimetric method on a Cobas Mira apparatus (Hoffman-La Roche).

Statistical analysis

Data were submitted to an ANOVA followed by a comparison of means (NCSS, 2001). The individual pig and the cage of two birds were considered as experimental units. Data were analyzed as a 3×3 factorial design. The model included block, basal diet (P–, P+, P+/ENZ), supplemental Zn (0, ZnSulf, ZnGly) and basal diet $\times$ supplemental Zn. The values obtained before feeding the experimental diets to piglets were used as covariates for final plasma Zn and AP activity values. The feed consumed during the 2 h before slaughter was used as covariate for piglet digestive tract data analysis. Differences were considered significant when $P < 0.05$ and trends were noted at $P < 0.1$.

Results

Diets

The analyzed and calculated nutrient values of the three basal diets were consistent with the expected values (Table 1). The analyzed Zn and phytic P contents were higher in basal diet P+ and P+/ENZ than in basal diet P–. The analyzed phytase activity in basal diet P+ reached 200 FTU/kg, probably due to an incomplete denaturation of plant phytase by heat treatment of wheat bran. The increased phytase activity (487 FTU) in basal diet P+/ENZ, compared to basal diet P+ was consistent with the expected phytase inclusion. Analyzed Zn concentration in Zn supplemented experimental diets were according to theoretical values. Zn concentration in drinking water did not exceed values of 0.03 and 0.46 mg/l in piglet and broiler units, respectively.

Animal performance

Three non-zinc supplemented piglets (two from P– and one from P+ diets) had to be removed from the study due to

low FI. Broilers fed P– diets performed in reduced intake (-44% compared to P+ and P+/ENZ) and increased cases of morbidity, particularly leg weakness ($30\% \text{ v } 5\%$ in P+ and P+/ENZ). Such low feed intake associated with depressed growth and increased morbidity was not representative of expected broiler performance fed. This situation was most probably due to the hardness of the P-pellets, which is not related to the experimental variable. Broiler data from P-treatments were therefore removed.

Results relative to piglets are presented in Table 2. Piglet performance was affected by the basal diet ($P < 0.05$), but not by supplemental Zn ($P > 0.1$). The restricted FI was $404 \pm 16 \text{ g/day}$, irrespective of the experimental treatment, but body weight gain (BWG) and feed conversion ratio (FCR) were improved by 8.7% ($P < 0.05$) and 7.9% ($P < 0.05$), respectively, when P– diets were fed compared to P+ or P+/ENZ diets. No interaction was measured between basal diet and supplemental Zn ($P > 0.1$).

Results relative to broilers are presented in Table 3. Mean broiler performance was $56 \pm 4 \text{ g/day FI}$, $43 \pm 3 \text{ g/day BWG}$ and $1.32 \pm 0.06 \text{ FCR}$ and was neither affected by the basal diet, supplemental Zn nor by their interaction ($P > 0.1$).

Zinc status: plasma and bone characteristics

In piglets, plasma Zn concentrations and AP activity remained similar, while bone Zn level was reduced ($P < 0.001$) by 24% when feeding P+ diets compared to P– diets. Supply of phytase to P+ diets increased plasma Zn, AP activity and bone Zn ($P < 0.001$) by 104% , 157% and 105% , respectively. Dietary Zn supplementation (15 mg/kg) increased plasma AP activity by 49% ($P < 0.01$) and bone Zn by 17% ($P < 0.05$), irrespective of Zn source. Plasma Zn was increased by 15% ($P < 0.05$) with ZnSulf and by 12% ($P > 0.05$) with ZnGly.

In broilers, dietary Zn supplementation increased ($P < 0.001$) plasma Zn by 19% , irrespective of Zn source. The use of phytase increased plasma Zn ($+25\%$) only in the experimental diet without supplemental Zn. The dietary addition of ZnSulf or ZnGly increased plasma Zn by 32% and 37% , respectively, when no phytase was fed (interaction basal diet $\times$ Zn, $P < 0.05$). Plasma AP activity was not influenced by dietary treatments ($P > 0.1$). Dietary Zn supplementation increased ($P < 0.001$) bone Zn by 42% , irrespective of Zn source and phytase increased it by 11% ($P < 0.001$). Bone Zn was increased by 29% when adding phytase to non-Zn supplemented diets or by 58% when adding Zn to P+ diet or by 27% (ZnSulf) and 30% (ZnGly) when adding Zn to P+/ENZ diet (interaction basal diet $\times$ Zn, $P < 0.01$).

Digestive pH, Zn and soluble Zn contents

In piglets, mean pH values of the stomacal and intestinal contents were 5.1 ± 0.2 and 5.4 ± 0.2 , respectively, and were independent of basal diet and supplemental Zn ($P > 0.1$). Zn concentration in the stomach closely reflected Zn concentration in diets. P+ and P+/ENZ diets, containing 13 mg/kg more Zn than P– diet also led to there being 11 to 14 mg/kg DM more Zn in the stomach ($P < 0.001$).

Table 2 Effect of basal diet and zinc supplementation on growth performance, digesta, plasma and bone characteristics in piglets (main factors)

Main factors	Basal diet				Supplemented zinc			P-value ¹	r.m.s.e. ¹
	P—	P+	P+ /ENZ	P-value ¹	0	ZnSulf	ZnGly		
Performance									
Initial BW (kg)	10.4	10.2	10.6		10.5	10.4	10.2		
Final BW (kg)	17.4 ^a	16.6 ^b	17.1 ^{ab}	*	17.0	17.2	17.0	ns	0.8
Feed intake (g/day)	403	401	408		398	407	408		
Zn intake (mg/day)	15.3 ^c	19.7 ^b	20.5 ^a	***	13.9 ^y	20.9 ^x	20.6 ^x	***	1.0
BW gain (g/day)	351 ^a	320 ^b	326 ^b	*	322	339	337	ns	30
Feed conversion ratio	1.16 ^a	1.26 ^b	1.26 ^b	*	1.25	1.21	1.21	ns	0.11
Stomachal characteristics ²									
pH	5.1	5.1	5.1	ns	5.0	5.2	5.1	ns	0.2
DM (g/kg)	301	282	290	ns	284	305	284	ns	30
Zn (mg/kg DM)	41 ^c	55 ^a	52 ^b	***	38 ^y	56 ^x	54 ^x	***	3.3
Soluble Zn (mg/kg DM)	3.8 ^b	4.6 ^b	7.5 ^a	***	3.9 ^y	5.7 ^x	6.2 ^x	**	1.5
Zn solubility (%) ³	9.6 ^b	8.5 ^b	14.5 ^a	***	10.6	10.4	11.6	ns	3.0
Intestinal characteristics ²									
PH	5.3	5.4	5.4	ns	5.3	5.4	5.4	ns	0.2
DM (g/kg)	165 ^b	176 ^b	210 ^a	*	186	181	183	ns	39
Zn (mg/kg DM)	51 ^b	62 ^a	63 ^a	*	46 ^z	70 ^x	61 ^y	***	10.7
Soluble Zn (mg/kg DM)	6.4 ^b	7.8 ^b	10.2 ^a	**	7.0	8.1	9.2	0.09	2.4
Zn solubility (%) ³	13.5	13.0	16.2	0.10	15.5 ^x	11.9 ^y	15.3 ^x	*	3.6
Plasma and bone characteristics									
Plasma Zn (mg/l) ⁴	0.51 ^b	0.45 ^b	0.92 ^a	***	0.57 ^y	0.67 ^x	0.64 ^{xy}	0.05	0.11
Plasma alkaline phosphatase activity (U/l) ⁵	230 ^b	197 ^b	506 ^a	***	234 ^y	366 ^x	333 ^x	**	114
Metacarpal ash (g/kg DM)	425 ^a	389 ^b	405 ^b	**	399	407	413	ns	26
Metacarpal Zn (mg/kg DM)	54 ^b	41 ^c	84 ^a	***	54 ^y	63 ^x	62 ^x	*	11

DM = dry matter.

¹r.m.s.e. = root mean square error; *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; ns (non-significant) $P > 0.10$; two-way interaction was never significant ($P > 0.10$) except for stomachal Zn solubility ($P = 0.07$), and therefore, only main effects are presented. For each main factor, values in the same row not followed by the same letter (a, b, c for basal diet effect; x, y, z for supplemented zinc effect) differ significantly.

²Adjusted means for feed intake on last experimental day of 325 g.

³Calculated as the ratio of total to soluble Zn concentration.

⁴Adjusted means for initial plasma Zn of 0.83 mg/l.

⁵Adjusted means for initial plasma alkaline phosphatase activity of 619 U/l.

Dietary Zn supplementation of 15 mg/kg increased stomachal Zn concentration accordingly by 17 mg/kg DM ($P < 0.001$), irrespective of Zn source. Stomachal soluble Zn concentration was similar in piglets fed P- and P+ diets ($P > 0.05$), but increased ($P < 0.05$) by 63% when phytase was added to P+ diets. Supplemental Zn also increased ($P < 0.01$) stomachal soluble Zn by 46 (ZnSulf) and 59% (ZnGly). Stomachal Zn solubility (percentage of soluble Zn to total Zn concentration) was increased by P+/ENZ diet ($P < 0.001$) and by supplemental Zn in P+ and P+/ENZ diets (interaction basal diet $\times$ Zn, $P = 0.07$). Intestinal Zn concentration in piglets was increased by 12 mg/kg DM with P+ and P+/ENZ diets compared to P- diet ($P < 0.05$) and by 24 (ZnSulf) and 15 mg/kg (ZnGly) DM with Zn supplementation ($P < 0.001$). As in the stomach, intestinal soluble Zn was not dependent on the dietary phytate content ($P > 0.05$), but on the addition of phytase into P+ diets (+31%, $P < 0.01$). Intestinal soluble Zn increased by 16% when ZnSulf was supplied and by 31% when ZnGly was supplied ($P = 0.09$). Intestinal Zn solubility was higher in piglets fed Zn as ZnGly compared to those fed ZnSulf ($P < 0.05$). Zn

solubility was the highest in the intestine of piglets fed P+/ENZ, ZnGly experimental diet (18.4%).

In broilers, mean pH values of the gizzard and intestinal contents were 4.2 ± 0.3 and 6.0 ± 0.2 , respectively. Intestinal pH was slightly increased in birds fed P+/ENZ diets (+0.1 unit, $P < 0.01$). As observed in the piglet stomach, Zn concentration in the broiler gizzard was close to dietary Zn content. In the gizzard, soluble Zn was not raised by the addition of phytase to P+ diets ($P > 0.10$) as it was the case in the piglet stomach, but was increased by supplemental Zn ($P < 0.01$) by 52% (ZnSulf) and 38% (ZnGly). Compared to the Zn concentration in piglet stomach and intestine and to the gizzard, Zn concentration in the broiler intestine was twice as high (82 ± 4 mg Zn/kg for unsupplemented Zn). Intestinal total and soluble Zn concentrations were similar ($P > 0.1$) in chickens fed P+ and P+/ENZ diets, but increased with Zn supplementation by 45 ($P < 0.001$) and by 43% ($P < 0.01$), respectively, irrespective of Zn source. Intestinal Zn solubility was not influenced ($P > 0.05$) by Zn supplementation, but was reduced in the presence of phytase ($P < 0.05$). Zn solubility was highest

Table 3 Effect of basal diet and zinc supplementation on growth performance, digesta, plasma and bone characteristics in broilers

Basal diet	P+				P+/ENZ				Basal diet				Supplemented zinc				P-value ¹	r.m.s.e. ¹
	0	15	0	15	0	15	0	15	P+	P+/ENZ	0	15	ZnSulf	ZnGly	Diet	Zn	Diet × Zn	
Added ZnSulf (mg Zn/kg)	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15
Added ZnGly (mg Zn/kg)	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15	0	15
Added phytase (FTU/kg)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Performance																		
Initial BW (g)	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58	58
Final BW (g)	869	830	857	872	895	895	861	861	855	876	870	870	862	864	ns	ns	ns	65
Feed intake (g/day)	55.8	53.7	57.2	56.3	56.9	56.9	56.2	56.2	55.6	56.7	56.3	56.3	55.3	56.8	ns	ns	ns	3.5
Zn intake (mg/day)	2.14	2.88	2.95	2.32	2.93	2.93	2.96	2.96	2.65	2.71	2.19y	2.19y	2.90x	2.95x	ns	***	ns	0.17
BW gain (g/day)	42.7	40.6	42.6	42.9	44.0	44.0	42.2	42.2	42.0	43.0	42.3	42.3	42.3	42.4	ns	ns	ns	3.4
Feed conversion ratio	1.32	1.32	1.35	1.33	1.29	1.29	1.34	1.34	1.33	1.32	1.32	1.32	1.31	1.34	ns	ns	ns	0.06
Gizzard characteristics																		
pH	4.2	4.2	4.2	4.3	4.3	4.3	4.0	4.0	4.2	4.2	4.2	4.2	4.3	4.1	ns	ns	ns	0.3
DM (g/kg)	268r	268r	238rs	237rs	213s	213s	285s	285s	258	245	252	252	241	262	ns	ns	*	42
Zn (mg/kg DM)	37	40	45	34	54	54	44	44	40	44	35y	35y	47x	45x	ns	0.05	ns	10
Soluble Zn (mg/kg DM)	9.5	11.5	12.4	9.0	16.6	16.6	12.9	12.9	11.1	12.8	9.2y	9.2y	14.0x	12.7x	ns	**	ns	3.0
Zn solubility (%) ²	26.5	30.8	28.9	26.3	32.5	32.5	29.1	29.1	28.7	29.5	26.5	26.5	31.7	29.0	ns	ns	ns	8.7
Intestinal characteristics																		
PH	6.0	5.9	6.0	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	6.0 ^b	6.1 ^a	6.0	6.0	6.0	6.1	**	ns	ns	0.2
DM (g/kg)	207	202	209	212	211	211	204	204	206	209	210	210	206	207	ns	ns	ns	14
Zn (mg/kg DM)	81	117	111	82	115	115	131	131	103	110	82y	82y	116x	121x	ns	***	0.09	15
Soluble Zn (mg/kg DM)	11.2	15.9	16.1	9.3	15.7	15.7	12.4	12.4	14.4	12.6	10.5y	10.5y	15.8x	14.2x	ns	**	ns	5.4
Zn solubility (%) ²	13.9	13.8	14.4	11.9	13.3	13.3	9.4	9.4	14.0 ^a	11.6 ^b	12.9	12.9	13.6	11.9	*	ns	ns	4.3
Plasma and bone characteristics																		
Plasma Zn (mg/l)	0.91s	1.20r	1.25r	1.14r	1.20r	1.20r	1.18r	1.18r	1.12	1.17	1.02y	1.02y	1.20x	1.22x	ns	***	*	0.15
Plasma alkaline phosphatase activity (U/l)	3820	3887	3653	3872	3059	3059	2846	2846	3790	3259	3846	3846	3473	3255	ns	ns	ns	16
Tibia ash (g/kg DM)	500	498	438	483	492	492	485	485	492	487	492	492	490	486	ns	ns	ns	16
Tibia Zn (mg/kg DM)	120t	189r	190r	155s	196r	196r	202r	202r	166 ^b	184 ^a	137y	137y	193x	196x	***	***	**	13

DM = dry matter

¹r.m.s.e. = root mean square error; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ns non-significant) $P > 0.10$. For each factor, values in a same row not followed by the same letter (a, b, c for basal diet effect; x, y, z for supplemented zinc effect; r, s, t for interaction effect) differ significantly.

²Calculated as the ratio of total to soluble Zn concentration.

in the intestine of broilers fed P+, ZnGly experimental diet (14.4%).

Discussion

Animal performance and zinc status

In piglets, the increased growth and feed efficiency for the P- diet compared to P+ and P+/ENZ diets was not directly related to Zn use, as plasma and bone Zn concentrations of piglets fed P- diet were lower than those fed P+/ENZ diet. The energy value of ingredients such as casein, maize starch and fish meal in the P- diet may have been underestimated while formulating this diet and may have directly influenced the piglet growth performance. Neither supplemental Zn nor supplemental phytase had any effect on piglet growth performance. Since one of the first signs of Zn deficiency is depressed FI, animal performance may be considered as an adequate indicator for supplemental Zn availability under the condition that animals are fed *ad libitum* low Zn diets (Jongbloed *et al.*, 2002). In this study, piglets could not express any potential effect on growth performance because their feeding was restricted.

Similarly, broiler growth performance was neither affected by Zn supplementation nor supply of microbial phytase. In accordance, no improvement in growth performance of broiler starters up to 21 days of age was observed by adding zinc (Mohanna and Nys, 1999a; Burrell *et al.*, 2004; Jondreville *et al.*, 2007) or microbial phytase (Mohanna and Nys, 1999b; Jondreville *et al.*, 2007) to maize-soybean meal diets containing more than 30 mg of Zn/kg. Dietary Zn contents slightly below 40 mg Zn/kg may therefore be sufficient for optimal growth over a limited time period of 21 days. In contrary, Ao *et al.* (2007) observed improved growth performance when supplementing to broilers a maize-soybean meal diet with 500 FTU/kg phytase and/or 2 to 12 mg/kg Zn. However, it must be noted that the unsupplemented broilers had lower growth rates (29 g/day) than in this study.

The present values in piglet and broiler Zn status based on plasma Zn, AP activity and bone Zn are consistent with previous findings conducted on similar protocols within INRA laboratories (e.g. Mohanna and Nys, 1999a; Revy *et al.*, 2004) as well as other institutes (Ao *et al.*, 2007). The experimental diets were formulated to provide minimal native Zn and maximal supplemental Zn while keeping animals below homeostatic Zn regulation capacity. Consequently, the dietary treatments are expected to influence animal Zn status and present results indicate that this was clearly the case: piglets fed the P- diets had a better Zn status than the ones fed the P+ diets, despite the lower Zn concentration in the P- diets. As suggested by Fordyce *et al.* (1987), the (phytate $\times$ Ca)/Zn molar ratio is an accurate Zn availability indicator due to the presence of insoluble Zn-Ca-phytate complexes in the digestive tract. The relative lower Ca and phytate contents to Zn contents in the P- diet (phytate $\times$ Ca/Zn of 5.3 mol/kg DM) than P+ diet (phytate $\times$ Ca/Zn of 8.3 mol/kg DM) may therefore explain the better Zn status of animals fed P- diet. This study

clearly demonstrated an improved Zn status when supplying phytase to the unsupplemented P+ diet. The supply of 500 FTU/kg phytase elicited a far greater response than 15 mg supplemental Zn in piglets, whereas in broilers, 15 mg supplemental Zn was more efficient than 500 FTU/kg phytase. This confirms the previously reported higher efficacy of microbial phytase for improved Zn availability in piglets (e.g. Pallau *et al.*, 1992; Jondreville *et al.*, 2005; Revy *et al.*, 2006) than in broilers (e.g. Yi *et al.*, 1996; Mohanna and Nys, 1999b; Jondreville *et al.*, 2007). Recently, the minimal supplementation of 500 FTU/kg phytase in maize-soybean meal diets were evaluated to an equivalent of 30 mg dietary Zn as ZnSO₄ in piglets (Jondreville *et al.*, 2005) and below 15 mg dietary Zn as ZnSO₄ in broilers (Biehl *et al.*, 1995; Mohanna and Nys, 1999b; Jondreville *et al.*, 2007).

In broilers, supplemental Zn led to a greater plasma and bone Zn response when added to P+ diet than P+/ENZ diet. These results are consistent with Ao *et al.* (2007). According to Jondreville *et al.* (2007), the respective dietary content of 50 and 59 mg Zn/kg (maize-soybean meal-based diet; 33 mg/kg Zn as native Zn) maximized broiler plasma and bone Zn concentration. Thus, supplementation of P+/ENZ diet (38 mg/kg Zn) with 15 mg Zn could not improve plasma Zn and only slightly improve bone Zn as supply was already close to the requirement. The present findings also suggest that Zn requirements for optimal growth are lower than for maximized metabolic Zn use (plasma AP activity, plasma Zn) and bone mineralization.

In both species, regardless of the basal diet, both supplemented Zn sources (ZnSulf and ZnGly) resulted in similar Zn status improvements indicating a similar availability. Only numerical improvements using ZnGly compared with ZnSulf were observed, such as +9% and +4% in plasma and bone Zn, respectively, for piglets fed P+ diet, +4% in plasma Zn for broilers fed P+ diet and +3% in tibia Zn for broilers fed P+/ENZ diet. These findings are compatible with broiler data (Swiatkiewicz *et al.*, 2001) in which a Zn amino-acid complex numerically increased bone Zn by 3% and piglet data (Revy *et al.*, 2004) in which a Zn methionine even led to a small but non-significant reduction in plasma Zn and bone Zn when compared to ZnSulf. These findings are in contrast to previous research comparing the identical ZnGly source with ZnSO₄ resulted in improved plasma, liver and bone Zn on growing rats (Schlegel and Windisch, 2006) and plasma and liver Zn on growing steers (Spears *et al.*, 2004). Therefore, this study did not confirm the hypothesis of improved Zn availability using organic Zn sources relative to ZnSO₄ with increased dietary phytate concentration or reduced dietary phytase activity. In addition, this study did not confirm previous findings by Wedekind *et al.* (1992 and 1994) which showed advantages of using organic Zn sources in piglets relative to broilers due to low dietary Ca contents.

Zinc in digesta and relation to zinc availability

Measurements of pH, total Zn concentrations and soluble Zn in the digestive tract (digesta) were used to evaluate their importance in relation to Zn availability. Previous

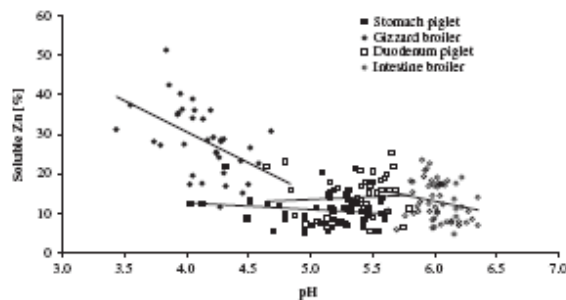


Figure 1 Effect of digesta pH on Zn solubility.

research suggested that Zn availability depends on Zn solubility in the digesta (Susaki *et al.*, 1999), whereas Zn solubility may depend on various factors including digesta pH (Cao *et al.*, 2000; Jongbloed *et al.*, 2002), dietary Zn concentration (Dintzis *et al.*, 1995; Susaki *et al.*, 1999), supplemented Zn source (Cao *et al.*, 2000) and interactions between dietary Zn and diet composition (Ammerman *et al.*, 1995; Jongbloed *et al.*, 2002).

In this study, the gastrointestinal pH increased only slightly from the piglet stomach to its intestine. This increase was more evident from the broiler gizzard to its intestine. The feeding technique before slaughter and the use of limestone as Ca source, which displays a high acid-binding capacity may have favored high pH values in the stomach and gizzard (Lawlor *et al.*, 2005). Zinc concentrations in digesta reflected dietary Zn concentration, except for the broiler intestine, which may originate from the sampling technique employed and the partial dietary DM absorption and/or endogenous Zn secretions occurring in the intestine even under drastically limited Zn supply (Windisch, 2003; Schlegel and Windisch, 2006). The percentage of Zn present in a soluble form (Zn solubility) may be related to digesta pH (Figure 1) (7% to 16%, respectively) and 10% to 18% of Zn were soluble in piglet stomach and intestine, while these percentages were 26% to 32% and 9% to 14% in the broiler gizzard and intestine, respectively. Furthermore, Zn solubility was also found to be higher as a consequence of lower pH *in vitro* (Cao *et al.*, 2000). The stomacal Zn solubility was low (54% to 84% on 100 kg BW pigs) compared to measures observed by Dintzis *et al.* (1995) even though pH was 4.5 and extraction methods for measuring soluble Zn were similar. The intestinal Zn solubility in piglets was, however, comparable with those of Dintzis *et al.* (1995) who reported values of 21% in the jejunum when feeding 24 mg/kg Zn, Susaki *et al.* (1999) with values of 11% in ileum when supplementing the diet with 25 mg/kg Zn, and those observed by Ashida *et al.* (2000) also showed values of 29% in small intestine when feeding 65 mg/kg Zn.

The importance of the digestive soluble Zn and Zn solubility on animal Zn status remains uncertain since several factors may have limited potential findings in this study: First, in broilers, the supply of soluble Zn near the

absorption sites were not the limiting factor for plasma and bone Zn due to the fact that nutritional requirements were fulfilled. Second, the methodology implemented did not differentiate soluble Zn according to the size of the compounds to which it is associated, while Zn is more readily absorbed when associated with small compounds (Shafey *et al.*, 1991). Third, the collected broiler intestinal contents may not be representative enough of digesta located close to the Zn absorption sites, probably located at the upper part of the small intestine. Nevertheless, the results from this study do present novel findings in both piglets and broilers that Zn supplementation increased the concentration of digestive Zn and soluble Zn, independently of source, resulting in increased Zn status. The absence of interaction between the basal diet and supplemental Zn on digestive soluble Zn suggests that, supplemental Zn, irrespective of its source or target specie, did not react with the dietary antagonists. This is in agreement with the response of Zn status indicators in pigs, as discussed previously. The effect of phytase on piglet Zn status was well illustrated by the positive response on the soluble Zn in stomach and intestine, proving the efficacy of phytase to hydrolyze phytic acid and to release Zn. In broilers, on the other hand, the low pH in the gizzard, the high soluble Zn contents and the absence of phytase efficiency to increase soluble Zn all indicate that phytate and Zn were already dissociated to a major extent in P+. According to Ellis *et al.* (1982), zinc-phytate complexes dissociate as soon as pH is decreased down to 4. Thus, these results suggest that the low pH in gizzard allows zinc-phytate complexes to dissociate even in the absence of phytase, whereas in the piglet stomach with higher pH, phytates must first be hydrolyzed by phytase before Zn can be released. This phenomenon would result in a physiologically higher availability of zinc in poultry than in swine, explaining the lower dietary requirements in broilers than in piglets for this trace element (40 mg/kg Zn for chickens, (Institut National de la Recherche Agronomique, 1989) and 80/100 mg/kg Zn for piglets, (National Research Council, 1998; Institut National de la Recherche Agronomique, 1989)). This phenomenon would also explain the differential efficacy of phytase for improved Zn availability in poultry and in swine.

Conclusions

The results of this study demonstrate that dietary zinc was used more efficiently by broilers than by piglets, most probably due to the lower gizzard pH and its related higher zinc solubility. The results of this study demonstrate that zinc supplementation, irrespective of zinc source, are successful in improving zinc status in both piglets and broilers, and suggest that supplemented Zn availability was independent from the diet formulation. Finally, the present data confirm that phytase was efficient in increasing digestive soluble Zn and improving zinc status in piglets. This was of a lower magnitude in broilers probably due to the naturally higher Zn availability in poultry compared with swine.

Acknowledgements

The authors are grateful to the financial support of Pancosma S. A. and to Sandrine Hillion and Anne-Marie Chagneau for their technical assistance. They also acknowledge Maryse Mills, Kléber Gérard, Jean-Marc Meslier, Frédéric Mercierand, Michel Derouet and Thierry Bordeau of the URA 83 Poultry Unit (INRA) in Nouzilly and Georges Guillemois, Raymond Vilboux and Christelle Homo of the UMR Systèmes d'élevage Nutrition animale et humaine at INRA in Saint-Gilles.

References

Ammerman CB, Baker DH and Lewis AJ 1995. Bioavailability of nutrients for animals. Amino acids, minerals and vitamins. Academic Press, San Diego, CA, USA.

As T, Pierce JL, Pescatore AJ, Cantor AH, Dawson KA, Ford MJ and Shafer BL 2007. Effects of organic zinc and phytase supplementation in a maize-soybean meal diet on the performance and tissue zinc content of broiler chicks. *British Poultry Science* 48, 690–695.

Ashida KY, Matsui T, Itoh J, Yano H and Nakajima T 2000. Zinc distribution in the small-intestinal digesta of pigs fed skim milk powder or defatted soybean flour. *Biological Trace Element Research* 74, 31–40.

Biehl RR, Baker DH and DeLuca HF 1995. α -Hydroxylated cholecalciferol compounds act additively with microbial phytase to improve phosphorus, zinc and manganese utilization in chicks fed soy-based diets. *The Journal of Nutrition* 125, 2407–2416.

Burrell AL, Dozier WA, Davis AJ, Compton MM, Freeman ME, Vendrell PF and Ward TL 2004. Responses of broilers to dietary zinc concentrations and sources in relation to environmental protection. *British Poultry Science* 45, 255–263.

Cao J, Henry PR, Guo R, Holwerda RA, Toth JP, Littell RC, Miles RD and Ammerman CB 2000. Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic zinc sources for poultry and ruminants. *Journal of Animal Science* 78, 2039–2054.

Davies NT and Nightingale R 1975. Effects of phytate on intestinal-absorption and secretion of zinc, and whole-body retention of Zn, copper, iron and manganese in rats. *The British Journal of Nutrition* 34, 243–258.

Dintzis FR, Laszlo JA, Nelsen TC, Baker FL and Calvert CC 1995. Free and total ion concentrations in pig digesta. *Journal of Animal Science* 73, 1138–1146.

Dourmad JY and Jondreville C 2008. Improvement of balance of trace elements in pig farming systems. In *Trace elements in animal production systems* (ed. P Schlegel, S Durosoy and AW Jongbloed), pp. 139–143. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

Ellis R, Morris ER and Hill AD 1982. Bioavailability to rats of iron and zinc in calcium-iron-phytate and calcium-zinc-phytate complexes. *Nutrition Research* 2, 319–322.

Engelen AJ, van der Heeft FC, Randsdorp PHG and Smit ELC 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *Journal of AOAC International* 77, 760–764.

European Community 2003. Commission regulation (EC) no. 1334/2003 of 25 July 2003 amending the conditions for authorisation of a number of additives in feedingstuffs belonging to the group of trace elements. *Official Journal of the European Union*, 26 July 2003, L187/11–15.

European Community 2006. Commission regulation (EC) no. 479/2006 of 23 March 2006 as regards to the authorisation of certain additives belonging to the group compounds of trace elements. *Official Journal of the European Union*, 23 March 2006, L86/4–7.

Fordyce EJ, Forbes RM, Robbins KR and Erdman JW Jr 1987. Phytate $\times$ calcium/zinc molar ratios: are they predictive of zinc bioavailability? *Journal of Food Science* 52, 440–444.

Rapin D 1996. Valorisation du phosphore phytique végétal chez l'oiseau: intérêt et mode d'action des phytases végétales et microbiennes. PhD, Ecole Nationale Agronomique de Rennes.

Institut National de la Recherche Agronomique 1989. L'alimentation des animaux monogastriques: porc, lapin, volailles. INRA, Paris, France.

Institut National de la Recherche Agronomique – Association Française de Zootechnie 2004. Tables of composition and nutritional value of feed materials. Pigs, poultry, cattle, sheep, goats, rabbits, horses, fish (ed. D Sauvant, JM Pérez and G Tran), INRA, Paris, France.

Jondreville C, Hayler R and Feuerstein D 2005. Replacement of zinc sulphate by microbial phytase for piglets given a maize-soya-bean meal diet. *Animal Science* 81, 77–83.

Jondreville C, Lescoat P, Magnin M, Feuerstein D, Gruenberg B and Nys Y 2007. Sparing effect of microbial phytase on zinc supplementation in maize-soya-bean meal diets for chickens. *Animal* 1, 804–811.

Jongbloed AW, Kemme PA, De Groot G, Lippens M and Meschy F 2002. Bioavailability of major and trace minerals. EMFEMA, International Association of the European Manufacturers of Major, Trace and Specific Feed Mineral Materials, Brussels, Belgium.

Lawlor PG, Lynch PB, Caffrey PJ, O'Reilly JJ and O'Connell MK 2005. Measurements of the acid-binding capacity of ingredients used in pig diets. *Irish Veterinary Journal* 58, 447–452.

Lehrfeld J 1989. High-performance liquid-chromatography analysis of phytic acid on a pH-stable, Macroporous polymer column. *Cereal Chemistry* 66, 510–515.

Mohanna C and Nys Y 1998. Influence of age, sex and cross on body concentrations of trace elements (zinc, iron, copper and manganese) in chickens. *British Poultry Science* 39, 536–543.

Mohanna C and Nys Y 1999a. Effect of dietary zinc content and sources on the growth, body zinc deposition and retention, zinc excretion and immune response in chickens. *British Poultry Science* 40, 108–114.

Mohanna C and Nys Y 1999b. Changes in zinc and manganese availability in broiler chicks induced by vegetal and microbial phytase. *Animal Feed Science and Technology* 77, 241–253.

National Research Council 1998. Nutrient Requirements of Swine, 10th revised edition. National Academy Press, Washington DC, USA.

NCSS 2001. Number Cruncher Statistical Systems. Kaysville, UT, USA.

Oberleas D, Murrer ME and O'Dell BL 1966. Dietary metal-complexing agents and zinc availability in the rat. *The Journal of Nutrition* 90, 56–62.

O'Dell BL and Savage JE 1960. Effect of phytic acid on zinc availability. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 103, 304–306.

Paillauf J, Hohler D and Rimbach G 1992. Effect of microbial phytase supplementation to a maize-soya-diet on the apparent absorption of Mg, Fe, Cu, Mn and Zn and parameters of Zn-status in piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 68, 1–9.

Power R, Flynn A and Cashman K 1994. Tissue deposition of zinc from a zinc chelate and from inorganic zinc in rats. *Animal Production* 58, 470.

Revy PS, Jondreville C, Dourmad JY and Nys Y 2004. Effect of zinc supplemented as either an organic or an inorganic source and of microbial phytase on zinc and other minerals utilisation by weanling pigs. *Animal Feed Science and Technology* 116, 93–112.

Revy PS, Jondreville C, Dourmad JY and Nys Y 2006. Assessment of dietary zinc requirement of weaned piglets fed diets with or without microbial phytase. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 90, 50–59.

Römkens PFAM, Modenaar SW, Groeneweg JE, Bonten LTC and de Vries W 2008. Copper and zinc in feed (additives): an essential burden? In *Trace elements in animal production systems* (ed. P Schlegel, S Durosoy and AW Jongbloed), pp. 115–136. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

Sandberg AS and Adherinne R 1986. HPLC method for determination of inositol tri-, tetra-, penta- and hexaphosphates in foods and intestinal contents. *Journal of Food Science* 51, 547–550.

Schlegel P and Windisch W 2006. Bioavailability of zinc glycinate in comparison with zinc sulphate in the presence of dietary phytate in an animal model with ^{65}Zn labelled rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 90, 216–222.

Shafey TM, McDonald MW and Dingle JG 1991. Effects of dietary calcium and available phosphorus concentration on digesta pH and on the availability of calcium, iron, magnesium and zinc from the intestinal contents of meat chickens. *British Poultry Science* 32, 185–194.

Spears JW, Schlegel P, Seal MC and Lloyd KE 2004. Bioavailability of zinc from zinc sulfate and different organic zinc sources and their effects on

- ruminal volatile fatty acid proportions. *Livestock Production Science* 90, 211–217.
- Susaki H, Matsui T, Ashida KY, Fujita S, Nakajima T and Yano H 1999. Availability of a zinc amino acid chelate for growing pigs. *Animal Science Journal* 70, 124–128.
- Swiatkiewicz S, Koreleski J and Zhong DQ 2001. The bioavailability of zinc from inorganic and organic sources in broiler chickens as affected by addition of phytase. *Journal of Animal and Feed Sciences* 10, 317–328.
- Wedekind KJ, Hortin AE and Baker DH 1992. Methodology for assessing zinc bioavailability: efficacy estimates for zinc-methionine, zinc sulfate, and zinc oxide. *Journal of Animal Science* 70, 178–187.
- Wedekind KJ, Lewis AJ, Gieseemann MK and Miller PS 1994. Bioavailability of zinc from inorganic and organic sources for pigs fed corn–soybean meal diets. *Journal of Animal Science* 72, 2681–2689.
- Windisch W 2003. Development of zinc deficiency in ⁶⁵Zn labelled, fully grown rats as a model for adult individuals. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 172, 91–96.
- Windisch W and Kirchgessner M 1999. Tissue Zn distribution and Zn exchange in adult rats at Zn deficiency induced by dietary phytate additions. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 82, 116–124.
- Yi Z, Kornegay ET and Denbow DM 1996. Supplemental microbial phytase improves zinc utilisation in broilers. *Poultry Science* 75, 540–546.

3.5. Bioavailability of organic zinc sources in broilers and piglets: a meta-analysis.

P. Schlegel^{1,2}, D. Sauvant², C. Jondreville³

¹ Agroscope Liebefeld-Posieux, Research Station ALP, 1725 Posieux, Switzerland

² INRA, AgroParisTech, UMR791 Modélisation Systémique de la Nutrition des Ruminants, 75231 Paris, France

³ INRA, Nancy-Université, USC340 Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux, 54505 Vandoeuvre-les-Nancy, France

Corresponding author: Patrick Schlegel. E-mail: patrick.schlegel@alp.admin.ch

Running head: Zinc bioavailability in broilers and piglets.

ABSTRACT

Zinc (Zn) is essential for swine and poultry and native Zn concentrations in feedstuffs are too low to meet the Zn requirement. Supplemented Zn in organic form is generally considered as more bioavailable than inorganic Zn. One broiler database (28 experiments, 175 observations) and one piglet database (34 experiments, 159 observations) were used to determine the relative bioavailability of Zn sources. Within dose-response effect from dietary Zn, Zn status and absorbed Zn, the GLM procedure using native, supplemented inorganic and organic Zn as independent variables presented the following: In broilers, plasma Zn and bone Zn responded linearly ($P < 0.001$) and bone Zn quadratically ($P < 0.001$) to the three Zn sources. All presented, in addition, a negative interaction between native Zn and supplemented Zn sources ($P < 0.01$). The coefficient of determination for the GLM two regressions was 0.91. The relative bioavailability of organic Zn sources versus inorganic Zn sources was 93 and 113 for plasma Zn and bone Zn, respectively. These values were not different from 100 ($P > 0.05$). In piglets, absorbed Zn, liver Zn and bone Zn responded negatively to increasing native Zn ($P < 0.10$). Absorbed Zn, plasma Zn, plasma ALP, liver Zn and bone Zn increased linearly ($P < 0.001$) with supplemental Zn. Plasma Zn and plasma ALP were quadratically reduced ($P < 0.10$) with supplemented Zn. No interaction was calculated between native Zn and supplemented Zn ($P > 0.10$). Coefficients of determinations for the GLM regressions were above 0.89 (absorbed Zn, $R^2 = 0.90$; plasma Zn, $R^2 = 0.93$; plasma ALP, $R^2 = 0.91$; liver Zn, $R^2 = 0.92$; bone Zn, $R^2 = 0.96$). The relative bioavailability of organic Zn sources versus inorganic Zn sources were 117, 85, 98, 97 and 100 for, absorbed Zn, plasma Zn, plasma ALP, liver Zn and bone Zn, respectively. These values were not different from 100 ($P > 0.05$). This meta-analysis on Zn bioavailability concludes that native dietary Zn content was highly available to broiler, similar to supplemented inorganic or organic Zn sources. In piglets however, native Zn availability was

reduced with increasing contents, most probably due to Zn antagonism from diet components such as phytate. Supplemented Zn was not affected such a way.

Keywords: Meta-analysis, bioavailability, zinc, broiler, piglet

IMPLICATIONS

Providing dietary zinc to broilers and piglets the most efficient way to limit Zn deficiency, optimize growth and limit environmental Zn load is priority. The present meta-analysis indicates that broilers have, in contrary to piglets, a good capacity to use native Zn from feedstuffs. Broilers and piglets have also a good capacity to use supplemented inorganic Zn. The supplementation of organic Zn sources presents no benefit for growth performance or mineral status in broilers or piglets, when compared to inorganic Zn sources. These results imply that the consideration of dietary native Zn contents and the proper supplementation level of Zn are key solutions for an efficient Zn use in broilers and piglets.

INTRODUCTION

Zinc is an essential trace mineral for swine and poultry and native Zn concentrations in feedstuffs are generally too low to meet the Zn requirement. This situation leads to the necessity of Zn supplementation. The feed industry supplements Zn as inorganic (oxides, sulfates ...) or organic forms (non-ionic chemical bond between the Zn atom and the ligand, mostly an amino acid or a peptide) generally considered as more available to the animal. Zinc bioavailability is defined as the maximal Zn utilization for the biological functions in the metabolism, based on the amount of ingested Zn (Windisch, 2001). Numerous studies were conducted on weaned piglets and broilers to investigate the effect of either replacing totally or partially inorganic Zn with organic Zn, replacing inorganic Zn with reduced levels of organic Zn or adding organic Zn on top of inorganic Zn sources. The choice of one from the four mentioned strategies to study the effect of organic Zn sources mostly came from a combination of various interests under various commercial and environmental contexts. Regardless of the strategy used, the animal was in any case supplemented with a defined amount of each Zn source, to which several variables were measured. This is the common denominator between all studies on this subject.

Reviews on Zn availability estimated organic and inorganic Zn sources as equivalent in the two species of interest (Ammerman *et al.*, 1995; Jongbloed *et al.*, 2002). Zinc methionine in broilers was the exception as more available (+30%) than Zn sulfate (Wedekind *et al.*, 1992). Later, Swiatkiewicz *et al.* (2001) reported an improved zinc bioavailability with an organic

source (hydrolyzed soy protein as ligand) in broilers. Two further broiler experiments reported an improved bioavailability for zinc with protein as ligand (Cao *et al.*, 2002; Ao *et al.*, 2006), but a reduced bioavailability for zinc with methionine as ligand (Cao *et al.*, 2002). The conclusions from numerous studies on supplemented organic Zn sources in broilers or piglets mostly sound positive. As typical examples, organic Zn sources permit to increase growth performance or reduce leg lesions when supplemented to a diet or reduced supplementation of organic sources instead of higher inorganic Zn supplementation leads to comparable growth performance with reduced Zn excretion. Combining data from many published studies into a meta-analysis may explain some of the inconsistencies of these effects across a variety of experimental conditions (Charbonneau *et al.*, 2006). Therefore, a meta-analysis was conducted on starter broilers and weaned piglets to investigate the bioavailability of supplemented inorganic and organic Zn sources following the methodic recommendation by Sauviant *et al.* (2008).

MATERIAL AND METHODS

Database

One broiler and one piglet database were compiled with experiments published between 1992 and July 2008 and between 1986 and December 2008, respectively and dealing with organic Zn supplementation. Following rigorous screening for appropriate subject, quality of trial design of information, data were extracted for meta-analysis. The data represented the treatment mean value within an experiment. Experiments were included into the respective specie database, if they contained at least one treatment with supplemental inorganic Zn and one treatment with supplemental organic Zn. Each experiment also needed to provide information about the animal age or body weight, about the diet and about the supplemented Zn source and level. Treatments within an experiment were only included into the database if no other feed additive (eg. amino acid, organic acid, ...) than trace minerals were studied and if no microbial phytase for piglets and less than 500 phytase unit / kg diet for broilers was used as study factors. Microbial phytase improves Zn availability to a high extent in piglets (Jondreville *et al.*, 2005) and to a low extent in broilers (Biehl *et al.*, 1995; Mohanna and Nys, 1999b; Jondreville *et al.*, 2007). There was no restriction to peer-reviewed journals. The eligible publications included also conference proceedings, book chapters and theses. In addition, three unpublished broiler studies, kindly provided by the company Pancosma, were included into the databases.

The extracted data included dietary factors, animal characteristics and animal response variables.

Information were extracted on dietary factors, such as diet type (synthetic diet, soybean meal isolate based diet, cereal/soybean meal based diet or maize/soybean meal based diet), nutritive values and all possible information about Zn supplementation. Dietary Zn contents (expressed in mg / kg diet) consisted in total Zn (DZNTOT) split into native Zn (DZNN), supplemented inorganic Zn (DZNI) and supplemented organic Zn (DZNO). DZNI was either zinc oxide or zinc sulfate with the exception of three broiler observations using zinc acetate and one broiler observation using zinc nitrate. DZNO sources had either Zn with arginine, glycine, lysine, methionine, hydrolyzed soy protein (HSProt), hydrolyzed protein (HProt), yeast protein (YProt) or polysaccharides (Polysac) as ligand. In case of missing information on DZNN, a value was estimated using the published feed ingredient formulation and the standard Zn contents of each ingredient from INRA-AFZ (2004). In case of missing information on supplemented Zn level, it was calculated with the difference between published DZNTOT and defined DZNN. When dietary Zn was expressed in dry matter (DM), a standard DM value of 890 g / kg was defined to calculate the value into fresh matter (FM) basis.

Information on animal characteristics consisted in their number per treatment, genetic, gender, age at start of the eventual adaptation period, at start and end of the experimental period and body weight (BW) at start of the experimental period. When final BW and feed intake were the only given growth performance for broilers, daily gain and gain to feed ratio were calculated using actual standard values of initial BW according to breed (Ross or Cobb). On several occasions, bone Zn contents were described on ash basis without information on bone ash content (Cao *et al.* 2000, 2002). In such a case, 450 g / kg ash content in bone DM was defined. Similarly liver Zn described in content of FM (Schiavon *et al.*, 2000), was defined at 250 g / kg DM.

Information on animal response consisted in growth performance, namely feed intake (FI), body weight gain (BWG), gain to feed (G:F), information on medication or incidence of leg abnormalities, mortality, Zn content in plasma, body or tissues (bone, liver, pancreas, spleen, intestinal wall), plasma alkaline phosphatase activity (ALP), Zn content in excreta, amount of daily excreted Zn, apparent absorbed Zn (piglets) and apparent Zn retained (in broilers). Piglet growth performance was included into the database only from ad-libitum fed animals with final BW above 11 kg and below 35 kg. Broiler growth performance from New Hampshire*Columbian breeds were not included as not representative for today's genetics. Lee *et al.* (2001) reported extreme high plasma Zn values in broilers (200% to 340% compared to mean values of the recorded data), which were not included in the present broiler database. Overall, 28 experiments involving 175 treatment means with 15'300 broilers and 34 experiments involving 159 treatment means with 5'769 piglets met the inclusion criteria. Each experiment from the broiler and piglet database is summarized in Table 1 and 2, respectively.

Mathematical models and statistical analysis

To assess the bioavailability of Zn sources, independent and dependent variables were selected for the statistical model following graphical examination of the data using Minitab (2007). The defined independent variables were: DZNTOT, DZNN, DZNI and DZNO. The defined dependent variables for piglets were: BWG, G:F, plasma Zn, plasma ALP, liver Zn, bone Zn and absorbed Zn. The defined dependent variables for broilers were: BWG, G:F, plasma Zn and bone Zn. All other records could not be used for assessing a statistical model. Reasons were their independency from DZNTOT (mortality in broilers) or the limited number of experiments (< 5 experiments) providing the data.

The regression models were defined through a graphical examination of the intra-experiment response from the dependent variables to the independent variables and with the help of the known physiological Zn regulation in monogastrics: Zn requirements are estimated at 40 mg / kg Zn for chickens (Institut National de la Recherche Agronomique, 1989) and 80 to 100 mg / kg Zn for piglets (National Research Council, 1998; Institut National de la Recherche Agronomique, 1989). Below estimated Zn requirements, Zn homeostatic regulation capacity is reduced or disabled. Under such conditions the metabolism is challenged to maximized Zn absorption and metabolic Zn use resulting in an expected dose-dependent increase of dependent variables. When Zn requirement is reached the homeostatic regulation of Zn is fully operating. Within Zn homeostasis, the dependent variables (except Zn absorbed, Zn excreted and liver Zn) are expected to remain unchanged. However, pharmacological levels of added Zn (as ZnO from 1000 mg / kg up to 3500 mg / kg) given to piglets over a short period of time improve growth performance (Poulsen and Carlson, 2008).

Based on the described Zn metabolism and on the graphical data analysis, the final regression model to evaluate DZNN, DZNI and DZNO was defined in two steps. The first step consisted in defining the Zn level needed to reach the plateau for each dependent variable using a curvilinear-plateau model (Equation 1) with the nonlinear procedure of SYSTAT (2007):

$$\text{If } DZNTOT_{wx} \leq X1, Y_{wx} = Y_{max_w} * (a + b * DZNTOT_{wx} + c * DZNTOT_{wx}^2) + \epsilon_{wx}; \text{ If } DZNTOT_{wx} > X1, Y_{wx} = Y_{max_w}$$

Where Y_{wx} is the expected outcome for the dependent variable Y observed in study w and level x of the independent variable DZNTOT; b the overall linear regressing coefficient of Y on DZNTOT; $a = 1 + 4 * c * b^2$; $c = -b / 2 * X1$; X1 the value of DZNTOT from which Y is maximized (Y_{max}) and ϵ_{wx} is the residual error. Pharmacological levels of Zn were not considered in the nonlinear procedure to evaluate piglet growth performance.

The second step consisted in evaluating DZNN, DZNI and DZNO for each dependent variable. This was evaluated using the observations having DZNTOT within the range of an existing

dose-response. Any observation including DZNI and DZNO simultaneously was not taken into consideration, as the response of the variable cannot be attributed. Any observation, within an experiment, with a DZNI level not existing for DZNO or vice-versa was not taken into account. Numerous experiments contained one treatment for DZNI and several ones for DZNO with different inclusion levels. This results in factor disconnectedness, not appropriate for a meta-analysis (Sauvant *et al.*, 2008). A GLM procedure of SYSTAT (2007) with following model (Equation 2) was used:

$$Y_{wxyz} = a + a_w + b \cdot \text{DZNN}_{wx} + c \cdot \text{DZNI}_{wy} + d \cdot \text{DZNO}_{wz} + f \cdot \text{DZNI}_{wy}^2 + g \cdot \text{DZNO}_{wz}^2 + h \cdot \text{DZNN}_{wx} \cdot \text{DZNI}_{wy} + i \cdot \text{DZNN}_{wx} \cdot \text{DZNO}_{wz} + \epsilon_{wxyz}$$

Where Y_{wxyz} is the expected outcome for the dependent variable Y observed in experiment w and levels x, y and z of the independent variable DZNN, DZNI and DZNO, respectively. Where a is the intercept, where a_w is the effect of the experiment w on the dependent variable Y, where b, c, d and f, g, h and i, j are the linear and quadratic and interaction coefficients of DZNN, DZNI and DZNO respectively and where ϵ_{wxyz} is the residual error. Three tests were run on each dependent variable to evaluate the difference between DZNI and DZNO by comparing the estimated coefficients for DZNI vs. DZNO; DZNI^2 vs. DZNO^2 and $\text{DZNN} \cdot \text{DZNI}$ vs. $\text{DZNN} \cdot \text{DZNO}$.

The relative bioavailability (RBV) from DZNO compared to DZNI was calculated from the ratio of the DZNO response slope to the DZNI response slope. When $\text{DZNN} \cdot \text{DZNI}$ and $\text{DZNN} \cdot \text{DZNO}$ were significant, the RBV was calculated for several levels of DZNN.

Differences were considered significant when $P < 0.05$ and trends were noted at $P < 0.1$.

For both equations, the experiment was introduced in the model as random effect in order to ensure a proper prediction of coefficients of the model and an accurate description of the error of prediction (Sauvant *et al.*, 2008). The coefficient of determination (R^2) and the root mean square error (r.m.s.e.) of each generated equation were calculated between the predicted and observed value from each treatment.

RESULTS

Description of the databases

The broiler dataset included experiments based on synthetic, semi-synthetic, cereal/soybean meal and maize/soybean meal based diets with dietary Zn contents ranging from 1 to 867 mg / kg. The DZNO sources consisted of 43% of the observations with a synthetic amino acid as ligand (one third as methionine), 56% with protein or peptide as ligand (one third as yeast protein, one third as hydrolyzed soy protein and one third as hydrolyzed undefined protein)

and 1% with a polysaccharide as ligand (Table 1). The piglet dataset included experiments based on cereal/soybean meal and maize/soybean meal diets with dietary Zn contents ranging from 17 to 3195 mg / kg. The DZNO sources consisted of 35% of the observations with a synthetic amino acid as ligand (two thirds as methionine), 46% with protein or peptide as ligand and 19% with a polysaccharide as ligand (Table 2).

The graphical analyzes of the data highlighted, within and between experiments, a consistent DZNTOT dependent response of the dependent variables until reaching a plateau level. Absorbed Zn and liver Zn are exceptions as they responded linearly to DZNTOT without any plateau. The nonlinear iterations (Equation 1), of the dependent variables on DZNTOT are presented in figure 1 for broilers and figure 2 for piglets.

Descriptive statistics for dependent and independent variables and Pearson correlation for independent variables were generated using the observations selected for the GLM procedure (Equation 2). The descriptive statistics of the data used for the GLM procedure are presented in Tables 3 and 4 for broilers and piglets, respectively. Some experiments did not report all variables of interest; therefore, the number of observations across variables was not constant. In broilers, the lack of BWG and G:F data below the X1 value was too limited for a proper GLM procedure and in piglets, the GLM procedure for these two dependent variables were not influenced by dietary Zn ($P > 0.10$). The meta-design, used for the GLM procedure with the other dependent variables, was fairly well balanced. Weak and non significant Pearson correlations were calculated for all dependent variables between DZNN and each of the supplemented Zn source ($P > 0.10$). The effect of the dependent variables and their interactions could be adequately assessed from the different datasets to evaluated dietary Zn availability on broilers and piglets. As observations including simultaneously DZNI and DZNO were discarded from the database, no interaction between DZNI and DZNO was calculated.

Bioavailability of Zn sources in broilers

The estimated DZNN, DZNI and DZNO dependent regressions for plasma Zn and bone Zn are presented in Table 5 and illustrated in Figure 3. Regression equations were calculated with a R^2 value of 0.91 for plasma Zn and bone Zn. The dependent variables increased linearly with increasing DZNI and DZNO ($P < 0.001$) in an extent that decreased as DZNN increased (interaction DZNN*DZNI and DZNN*DZNO, $P < 0.01$). In addition, bone Zn responded quadratically to DZNI and DZNO ($P < 0.001$). No difference ($P > 0.10$) was calculated between the coefficients for DZNI and DZNO in any of the dependent variables. As a consequence the calculated bioavailability of DZNO relative to DZNI was very close to 100%, ranging between 93% and 113% depending on the used variable.

Bioavailability of Zn sources in piglets

The estimated DZNN, DZNI and DZNO dependent regressions for plasma Zn, plasma ALP, liver Zn, bone Zn and absorbed Zn were calculated with R^2 values above 0.89 (Tables 6 and figure 4). Increase in DZNN did not increase the value of the dependent variables, in contrary; it reduced the response for absorbed Zn ($P < 0.10$), liver Zn ($P < 0.001$) and bone Zn ($P < 0.05$). The dependent variables responded linearly (absorbed Zn, plasma Zn, plasma ALP and bone Zn, $P < 0.001$ and liver Zn, $P < 0.01$) and quadratically (plasma Zn, plasma ALP, $P < 0.10$) with increasing supplemented Zn. No difference was calculated between coefficients DZNI and DZNO ($P > 0.10$). The coefficient for DZNO² was inferior to the one for DZNI² in plasma Zn ($P < 0.10$). As a consequence, the calculated bioavailability of DZNO relative to DZNI was very close to 100%, ranging between 85 and 117% for plasma Zn, plasma ALP, liver Zn, bone Zn and absorbed Zn.

DISCUSSION

Limits of interpretation

The present meta-analysis focused on the comparison of Zn bioavailability from different sources being native, inorganic and organic. Several dose-response studies on supplemented Zn using only one source were therefore not considered, meaning that the subject of animal Zn requirement cannot be discussed definitively from the used dataset. However, as an indication for broiler Zn requirement (based on curvilinear-plateau model), maximal G:F (0.69), plasma Zn (2.10 mg / l) and bone Zn (199 mg / kg DM) were reached with 30, 88 and 90 mg / kg diet, respectively. In piglets, maximal BWG (466 g/d), G:F (0.61), plasma Zn (1.03 mg / l), plasma ALP (227 U / l) and bone Zn (111 mg / kg DM) were reached with 117, 112, 117, 106 and 100 mg Zn / kg diet, respectively. These values are slightly higher than requirements by INRA (Institut National de la Recherche Agronomique, 1989) and NRC (National Research Council, 1998). However, the use of a curvilinear model overestimates the value of requirements. From equations presented in figure 1, 95% of the maximum broiler G:F, plasma Zn and bone Zn was reached with dietary Zn concentrations of respectively 21, 69 and 69 mg / kg. Dietary Zn contents of 53 and 62 mg/kg are necessary to reach the same levels for respectively plasma Zn and bone Zn using the equations without microbial phytase from Jondreville *et al.* (2007). For piglets, BWG, G:F, plasma Zn, plasma ALP and bone Zn reached 95% of the maximum value with dietary Zn concentrations of 65, <27, 96, 84 and 76 mg / kg, respectively. Revy *et al.* (2006) had plasma Zn and ALP maximized with dietary Zn contents of

respectively 92 and 86 mg / kg. Bone Zn was not maximized with dietary Zn contents up to 113 mg / kg (Revy *et al.*, 2006).

Within the 161 supplemented broiler observations, the mean supplemented Zn level was 84 ± 144 mg / kg (median: 40 mg / kg) and within the 144 supplemented piglet observations, the mean was 469 ± 814 mg / kg (median: 120 mg / kg). This indicates that most studies and especially the ones in pigs were conducted with supplemental Zn levels reaching dietary Zn contents above actual recommended Zn requirements. The reason originates from the defined hypothesis in these experiments. Organic Zn sources were either promoted to improve animal performance or Zn status when additionally supplemented to standard inorganic sources or were promoted to guarantee similar performance when replacing at lower inclusion levels, inorganic Zn sources (either in the context of inorganic Zn as growth promoter or in the context of the reviewed European Community (2003) regulations). The quantity of observations extracted from the two databases to evaluate Zn sources with the GLM procedure, shranked therefore drastically.

Bioavailability of Zn sources

DZNN typically found in maize / soybean meal diets (30 to 40 mg Zn / kg), were sufficient to reach 100% and 97% of maximal broiler and piglet G:F, respectively. Growth performance data could not be used to determine the Zn bioavailability of supplemented sources as plateau of the response variable was reached too rapidly. DZNN also fulfilled about 60% and 50% of maximal plasma Zn and bone Zn in the respective specie. In contrary to broilers, which responded positively to diets with increasing DZNN, piglets did not respond to DZNN on plasma Zn and plasma ALP and responded negatively on liver Zn, bone Zn and absorbed Zn. This absence or negative response from DZNN on piglet's Zn absorption and Zn status is most probably linked with dietary Zn antagonism. Zn contents in plant feedstuffs are positively correlated with the dietary phytic phosphorus contents (eg. Revy *et al.*, 2003). In humans, Sandström *et al.* (1987) provided data presenting reduced Zn absorbability when eating cereals with increasing phytate contents. In piglets, lower Zn availability was measured when a non supplemented Zn diet rich in native Zn and phytate was fed compared to a non supplemented Zn diet low in native Zn and phytate (Schlegel *et al.*, 2010). Due to strong Pearson correlations between DZNN and phytic P in the broiler (0.67, $P < 0.001$) and the piglet (0.41, $P < 0.001$) datasets, the subject of Zn antagonism could not be further investigated.

The two supplemented Zn sources (DZNI and DZNO) were available to broilers and to piglets as the dependent variables responded positively. The difference between supplemented Zn sources was significant ($P < 0.10$) in piglet plasma Zn. However, the significant difference in quadratic coefficients for plasma Zn was too weak (Table 6, Figure 4). The broiler bone Zn responded slightly better to DZNO than DZNI with increasing DZNN, but far away from any

significant value ($P > 0.10$). Taking into account the linear and quadratic effects on supplemented Zn and their interactions with DZNN, the relative bioavailability of DZNO can finally be considered as equal to DZNI in broilers and in piglets. This conclusion is in line with previous qualitative reviews on the subject (Ammerman *et al.*, 1995; Jongbloed *et al.*, 2002). Apparently, the improved Zn bioavailability reported by Wedekind *et al.* (1992), Swiatkiewicz *et al.* (2001), Cao *et al.* (2002) and Ao *et al.* (2006) were diluted by the other studies.

CONCLUSIONS

The present meta-analysis on Zn availability concludes that native dietary zinc contents were highly available to broiler, similar than supplemented inorganic or organic Zn sources. In piglets however, native Zn availability was reduced with increasing contents, most probably due to Zn antagonism from diet components such as phytate and organic Zn sources responded similarly to inorganic Zn sources.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Pancosma for having kindly provided the necessary data on three broiler studies.

REFERENCES

- Ammerman CB, Baker DH and Lewis AJ 1995. Bioavailability of nutrients for animals. Amino acids, minerals and vitamins. Academic Press, San Diego, USA.
- Ao T, Pierce JJ, Power R, Dawson KA, Pescatore AJ, Cantor AH and Ford MJ 2006. Evaluation of Bioplex Zn as an organic zinc source for chicks. *International Journal of Poultry Science* 5, 808-811.
- Aoyagi S and Baker DH 1993. Nutritional evaluation of copper-lysine and zinc-lysine complexes for chicks. *Poultry Science* 72, 165-171.
- Bao YM, Choct M, Iji PA and Bruerton K 2007. Effect of organically complexed copper, iron, manganese and zinc on broiler performance, mineral excretion, and accumulation in tissues. *Journal of Applied Poultry Research* 16, 448-455.
- Biehl RR, Baker DH and DeLuca HF 1995. α -Hydroxylated cholecalciferol compounds act additively with microbial phytase to improve phosphorus, zinc and manganese utilization in chicks fed soy-based diets. *Journal of Nutrition* 125, 2407-2416.

Buff CE, Bollinger DW, Ellersieck MR, Brommelsiek WA and Veum TL 2005. Comparison of growth performance and zinc absorption, retention, and excretion in weanling pigs fed diets supplemented with zinc-polysaccharide or zinc oxide. *Journal of Animal Science* 83, 2380-2386.

Burrell AL, Dozier WA, Davis AJ, Compton MM, Freeman ME, Vendrell PF and Ward TL 2004. Responses of broilers to dietary zinc concentrations and sources in relation to environmental implications. *British Poultry Science* 45, 255-263.

Cao J, Henry PR, Guo R, Holwerda RA, Toth JP, Littell RC, Miles RD and Ammerman CB 2000. Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic zinc sources for poultry and ruminants. *Journal of Animal Science* 78, 2039-2054.

Cao J, Henry PR, Davis SR, Cousins RJ, Miles RD, Littell RC and Ammerman CB 2002. Relative bioavailability of organic zinc sources based on tissue zinc and metallothionein in chicks fed conventional dietary zinc concentrations. *Animal Feed Science and Technology* 101, 161-170.

Carlson MS, Boren CA, Wu C, Huntington CE, Bollinger DW and Veum TL 2004. Evaluation of various inclusion rates of organic zinc either as polysaccharide or proteinate complex on the growth performance, plasma, and excretion of nursery pigs. *Journal of Animal Science* 82, 1359-1366.

Case CL and Carlson MS 2002. Effect of feeding organic and inorganic sources of additional zinc on growth performance and zinc balance in nursery pigs. *Journal of Animal Science* 80, 1917-1924.

Charbonneau E, Pellerin D, Oetzel GR 2006. Impact of lowering dietary cation–anion differences in nonlactating dairy cows: a meta-analysis. *Journal of Dairy Science* 89, 537–548.

Cheng J, Kornegay ET and Schell TC 1998. Influence of dietary lysine on the utilization of zinc from zinc sulfate and a zinc-lysine complex by young pigs. *Journal of Animal Science* 76, 1064-1074.

Creech BL, Spears JW, Flowers WL, Hill GM, Lloyd KE, Armstrong TA and Engle TE 2004. Effect of dietary trace mineral concentration and source (inorganic vs. chelated) on performance, mineral status, and fecal mineral excretion in pigs from weaning through finishing. *Journal of Animal Science* 82, 2140-2147.

Dozier WA, Davis AJ, Freeman ME and Ward TL 2003. Early growth and environmental implications of dietary zinc and copper concentrations and sources of broiler chicks. *British Poultry Science* 44, 726-731.

European Community 2003. Commission regulation (EC) no. 1334/2003 of 25 July 2003 amending the conditions for authorisation of a number of additives in feedingstuffs belonging to the group of trace elements. *Official Journal of the European Union*, 26 July 2003, L187/11-15.

Gebert S, Wenk C and Messikommer R 2002. Different zinc sources in the diet for broiler. In *Schriftreihe aus dem Institut für Nutztierwissenschaften, Ernährung-Produkte-Umwelt*. (eds M Kreuzer, C Wenk, T Lanzini) pp 212-215. ETH Zürich, Zürich, Switzerland.

Hahn JD and Baker DH 1993. Growth and plasma zinc responses of young pigs fed pharmacologic levels of zinc. *Journal of Animal Science* 71, 3020-3024.

van Heugten E, Spears JW, Kegley EB, Ward JD and Qureshi MA 2003. Effects of organic forms of zinc on growth performance, tissue zinc distribution and immune response of weanling pigs. *Journal of Animal Science* 81, 2063-2071.

Hill DA, Peo ER, Lewis AJ and Crenshaw JD 1986. Zinc-amino acid complexes for swine. *Journal of Animal Science* 63, 121-130.

Hollis GR, Carter SD, Cline TR, Crenshaw TD, Cromwell GL, Hill GM, Kim SW, Lewis AJ, Mahan DC, Miller PS, Stein HH and Veum TL 2005. Effects of replacing pharmacological levels of dietary zinc oxide with lower dietary levels of various organic zinc sources for weanling pigs. *Journal of Animal Science* 83, 2123-2129.

Hudson BP, Dozier WA, Fairchild BD, Wilson JL, Sander JE and Ward TL 2004. Live performance and immune response of straight-run broilers: influence of zinc source in broiler breeder hen and progeny diets and ambient temperature during the broiler production period. *Journal of Applied Poultry Research* 13, 291-301.

Hudson BP, Dozier WA and Wilson JL 2005. Broiler live performance response to dietary zinc source and the influence of zinc supplementation in broiler breeder diets. *Animal Feed Science and Technology* 118, 329-335.

Institut National de la Recherche Agronomique 1989. L'alimentation des animaux monogastriques: porc, lapin, volailles. INRA, Paris, France.

Institut National de la Recherche Agronomique – Association Française de Zootechnie 2004. Tables of composition and nutritional value of feed materials. Pigs, poultry, cattle, sheep, goats, rabbits, horses, fish. (eds D Sauvant, JM Perez and G Tran), Paris, France.

Jondreville C, Hayler R and Feuerstein D 2005. Replacement of zinc sulphate by microbial phytase for piglets given a maize-soya-bean meal diet. *Animal Science* 81, 77-83.

Jondreville C, Lescoat P, Magnin M, Feuerstein D, Gruenberg B and Nys Y 2007. Sparing effect of microbial phytase on zinc supplementation in maize-soya-bean meal diets for chickens. *Animal* 1, 804-811.

Jongbloed AW, Kemme PA, De Groote G, Lippens M and Meschy F 2002. Bioavailability of major and trace minerals. EMFEMA, International Association of the European Manufacturers of Major, Trace and Specific Feed Mineral Materials, Brussels, Belgium.

Kessler J, de Faria A and Jost M 1996. The effect of zinc proteinate and zinc polysaccharide on performance and zinc metabolism in piglets. *Agrarforschung* 3, 547-550.

Kommerer SK, Mateo RD, Lin C and Kim SW 2006. Bioavailability of zinc-amino acid chelates to zinc sulfate in broiler chickens. *Journal of Animal Science* 84, supplement 2, 115

Lee SH, Choi SC, Chae BJ, Acda SP and Han YK 2001a. Effects of feeding different chelated copper and zinc sources on growth performance and fecal excretions of weanling pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 14, 1616-1620.

Lee SH, Choi SC, Chae BJ, Lee JK and Acda SP 2001b. Evaluation of metal-amino acid chelates and complexes at various levels of copper and zinc in weanling pigs and broiler chicks. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 14, 1734-1740.

Leeson S and Caston L 2007. Using minimal supplements of trace minerals as a method of reducing trace mineral content of poultry manure. *Animal Feed Science and Technology* 142, 339-347.

Linares LB, Broomhead JN, Guaiume EA, Ledoux DR, Veum TL and Raboy V 2007. Effects of low phytate barley (*Hordeum vulgare* L.) on zinc utilization in young broiler chicks. *Poultry Science* 86, 299-308

Männer K, Simon O and Schlegel P. Effects of different iron, manganese, zinc and copper sources (sulphates, chelates, glycinate) on their bioavailability in early weaned piglets. In 9. Tagung der Schweine- und Geflügelernährung (ed M. Rodehutschord), pp 25 - 27. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle, Germany.

Minitab 2007. Minitab Version 15.1.1.0. for Windows. In Minitab Inc., State College, U.S.A.

Mohanna C and Nys Y 1999a. Effect of dietary zinc content and sources on the growth, body zinc deposition and retention, zinc excretion and immune response in chickens. *British Poultry Science* 40, 114.

Mohanna C and Nys Y 1999b. Changes in zinc and manganese availability in broiler chicks induced by vegetal and microbial phytase. *Animal Feed Science and Technology* 77, 241-253.

Mullan BP, Wilson RH, Harris D, Allen JA and Naylor A 2002. Supplementation of weaner pig diets with zinc oxide or Bioplex zinc. In *Proceedings of Alltech's 18th Annual Symposium* (ed. TP Lyons and KA Jacques), pp. 419–424. Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom.

National Research Council 1998. *Nutrient Requirements of Swine*. 10th revised edition. National Academy Press, Washington, DC, USA.

National Research Council 2005. *Mineral tolerance of Animals*. 2nd revised edition. The national Academies Press, Washington, U.S.A.

Nollet L, Van der Klis JD, Lensing M and Spring P 2007. The effect of replacing inorganic with organic trace minerals in broiler diets on productive performance and mineral excretion. *Journal of Applied Poultry Research* 16, 592-597.

Oberleas D, Muhrer ME and O'Dell BL 1966. Dietary metal-complexing agents and zinc availability in the rat. *Journal of Nutrition* 90, 56-62.

Pancosma unpublished a. Dose-response of zinc oxide and zinc methionine in broilers up to 40 days of age. Unpublished.

Pancosma unpublished b. Bioavailability of zinc sulphate and two organic zinc sources in a rich non-starch-polysaccharide cereal based diet including or not enzymes. Unpublished.

Pancosma unpublished c. Dose-response of zinc sulphate and two organic zinc sources in broiler chickens. Unpublished.

Peric L, Nollet L, Milosevic N and Zikic D 2007. Effect of Bioplex and Selplex substituting inorganic trace mineral sources on performance of broilers. *Archiv Für Geflügelkunde* 71, 122-129.

Pierce JJ, Shafer BL, Stalder KJ and Burkett JL 2005. Nutritional means to lower trace mineral excretion from swine and poultry without compromising performance. In *Animal Manure and Waste management Symposium*, pp. 1-6. San Antonio, U.S.A.

Poulsen HD and Carlson D 2008. Zinc and copper for piglets – how do high dietary levels of these minerals function? In *Trace elements in animal production systems* (eds P Schlegel, S Durosoy and AW Jongbloed), pp 151-160. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

Rao SO, Park SJ, Samford RA and Kim SW 2007. Bioavailability of zinc-amino acid chelates to zinc nitrate in broiler chickens. *Journal of Animal Science* 85, supplement 1, 318

Revy PS, Jondreville C, Dourmad JY, Guinotte F and Nys Y 2002. Bioavailability of two sources of zinc in weanling pigs. *Animal Research* 51, 315-326.

Revy PS, Jondreville C, Dourmad JY and Nys Y 2003. Zinc in pig nutrition: the essential trace element and potential adverse effect on environment. *INRA Production Animale*, 16, 3-18.

Revy PS, Jondreville C, Dourmad JY and Nys Y 2004. Effect of zinc supplemented as either an organic or an inorganic source and of microbial phytase on zinc and other minerals utilisation by weanling pigs. *Animal Feed Science and Technology* 116, 93-112.

Richert BT, Goodband RD, Nelssen JL, Tokach MD, Kats LJ and Nuzback DE 1994. Effect of chelated trace minerals on nursery pig growth performance. In *Kansas State University Swine Day 1994* (ed MA Johnson), pp. 111-114. Kansas State University, Kansas, U.S.A.

Rupic V, Ivandija L, Luterotti S and Dominis-Kramaric M 1997. Influence of inorganic and organic dietary zinc on its concentration in blood serum, bones and hair and on catalytical activity of some serum enzymes in pigs. *Acta Veterinaria Brno* 66, 75-85.

Sandström B, Almgren A, Kivistö B and Cederblad A. 1987. Zinc absorption in humans from meals based on rye, barley, oatmeal, triticale and whole wheat. *Journal of Nutrition* 117, 11, 1898-1902.

Sauvant D, Schmidely P, Daudin JJ, St-Pierre NR 2008. Meta-analyses of experimental data in animal nutrition. *Animal* 2, 1203-1214.

Schiavon S, Bailoni L, Ramanzin M, Vincenzi R, Simonetto A and Bittante G 2000. Effect of proteinate or sulphate mineral sources on trace elements in blood and liver of piglets. *Animal Science* 71, 131-139.

Schlegel P, Nys Y and Jondreville C 2010. Zinc availability and digestive zinc solubility in piglets and broilers fed diets varying in their phytate contents, phytase activity and supplemented zinc source. *Animal* 4, 200-209.

Susaki H, Matsui T, Ashida KY, Fujita S, Nakajima T and Yano H 1999. Availability of a zinc amino acid chelate for growing pigs. *Journal of Animal Science* 70, 124-128.

Swiatkiewicz S, Koreleski J and Zhong DQ 2001. The bioavailability of zinc from inorganic and organic sources in broiler chickens as affected by addition of phytase. *Journal of Animal and Feed Sciences* 10, 317-328.

Swinkels JWGM, Kornegay ET, Zhou W, Lindemann MD, Webb KE and Verstegen MWA 1996. Effectiveness of a zinc amino acid chelate and zinc sulfate in restoring serum and soft tissue zinc concentrations when fed to zinc-depleted pigs. *Journal of Animal Science* 74, 2420-2430.

Systat 2007. Systat Version 12.00.08 for Windows. In SYSTAT Software Inc., Chicago, U.S.A.

Wedekind KJ, Hortin AE and Baker DH 1992. Methodology for assessing zinc bioavailability : efficacy estimates for zinc-methionine, zinc sulfate and zinc oxide. *Journal of Animal Science* 70, 178-187.

Wedekind KJ, Lewis AJ, Giesemann MA and Miller PS 1994. Bioavailability of zinc from inorganic and organic sources for pigs fed corn-soybean meal diets. *Journal of Animal Science* 72, 2681-2689.

Windisch W, 2001. Homeostatic reactions of quantitative Zn metabolism on deficiency and subsequent repletion with Zn in ⁶⁵Zn labeled adult rats. *Trace Elements and Electrolytes* 18, 133 – 128

Woodworth JC, Tokach MD, Nelssen RD, Goodband RD, Quinn PRO, Fakler TM 2005. Interactive effects of diet complexity, zinc source and feed grade antibiotics on weanling pig growth performance. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 4, 7, 688-693.

Zacharias B, Pelletier W and Drochner W 2004. Organic copper and zinc in diets for growing pigs - a possibility to reduce environmental pollution with copper and zinc. In *Proceedings of the 13th conference of domestic animals.* (ed A Pen), pp. 257-265. Muska Sobota, Slovenia.

Table 1 Summary of the broiler experiments

n° exp	Reference	Diet type ^a	DZNN [mg/kg]	DZNTOT [mg/kg]	DZNI sources	DZNO ligands ^b	G:F	Plasma Zn	Bone Zn
1	Ao <i>et al.</i> , 2006	Maize / soy	23	23, 28, 33, 43, 63	sulfate	YProt	X		
2	Aoyagi and Baker, 1993	Soy isolate	13	13, 16, 17, 19, 21	sulfate	Lysine	X		
3	Bao <i>et al.</i> , 2007	Cereal / soy	20	20, 40, 60, 70, 100	sulfate	YProt	X		X
4	Burrell <i>et al.</i> , 2004	Maize / soy	28	28, 48, 68, 108	sulfate	HSProt	X		
5	Cao <i>et al.</i> , 2000	Maize / soy	12	52, 252, 452	sulfate	HSProt	X		X
6	Cao <i>et al.</i> , 2000	Maize / soy	48	88, 288, 488	sulfate	HProt, Polysac	X		X
7	Cao <i>et al.</i> , 2002	Maize / soy	21	21, 51, 81, 111	acetate	HProt, Methionine	X		X
8	Pancosma unp. c	Maize / soy	47	57, 67, 87, 127	sulfate	HSProt, HProt	X		
9	Dozier <i>et al.</i> , 2003	Maize / soy	35	75, 115, 155	sulfate	HProt	X		
10	Pancosma unp. b	Cereal / soy	27	42, 57	sulfate	HSProt, Glycine	X	X	
11	Pancosma unp. a	Maize / soy	44	44, 54, 64, 74, 84	oxide	Methionine	X	X	X
12	Gebert <i>et al.</i> , 2002	Cereal / soy	21	31	sulfate	HSProt, Glycine	X	X	X
13	Hudson <i>et al.</i> , 2004	Maize / soy	29	140	sulfate	HSProt	X		
14	Hudson <i>et al.</i> , 2005	Maize / soy	29	169	sulfate	HSProt	X		
15	Kommera <i>et al.</i> , 2006	Maize / soy	35	35, 75	sulfate	Methionine-Glycine, Glycine	X		
16	Rao <i>et al.</i> , 2007	Maize / soy	35	75	nitrate	Arginine, Glycine	X		
17	Lee <i>et al.</i> , 2001	Maize / soy	35	75, 115	sulfate	Methionine, HProt.	X		
18	Leeson and Caston, 2007	Cereal / soy	40	48, 57, 65, 74, 82, 100	sulfate	YProt	X		
19	Mohanna and Nys, 1999a	Cereal / soy	20	20, 30, 45, 60	sulfate	Methionine	X	X	X
20	Nollet <i>et al.</i> , 2007	Cereal / soy	55 ^c	65, 92	sulfate	HSProt	X		
21	Peric <i>et al.</i> , 2007	Maize / soy	40	60, 80, 100	oxide	HSProt	X		
22	Pierce <i>et al.</i> , 2005	Maize / soy	35	35, 60, 85, 135	sulfate	YProt	X		
23	Schlegel <i>et al.</i> , 2010	Cereal / soy	38	38, 53	sulfate	Glycine	X	X	X
24	Swiatkiewicz <i>et al.</i> , 2001	Cereal / soy	44	44, 54, 64, 84	sulfate	HSProt	X		X
25	Wedekind <i>et al.</i> , 1992	Soy isolate	13	13, 21, 28	sulfate	Methionine	X	X	X
26	Wedekind <i>et al.</i> , 1992	Synthetic	1	1, 4, 7, 10	sulfate	Methionine	X		X
27	Wedekind <i>et al.</i> , 1992	Maize / soy	45	117, 367, 617, 867	oxide, sulfate	Methionine		X	X
28	Wedekind <i>et al.</i> , 1992	Maize / soy	45	45, 50, 55, 65, 75, 85, 95	sulfate	Methionine			X

^a soy = soybean meal; cereal = other cereals than maize

^b YProt = Yeast protein; HProt = hydrolyzed protein; HSProt = hydrolyzed soybean meal protein; Polysac = polysaccharide

^c Calculated value: Analyzed total dietary zinc minus theoretically supplemented zinc

Table 2 Summary of the piglet experiments

n° exp	Reference	Diet type ^a	DZNN [mg/kg]	DZNTOT [mg/kg]	DZNI sources	DZNO ligands ^b	BWG	G:F	Plasma Zn	ALP	Liver Zn	Bone Zn	Absorbed Zn
1	Buff <i>et al.</i> , 2005	Maize/Soy/Whey	30	140, 440, 740, 1040, 2140	oxide	Polysac	X ^{c)}	X ^{c)}	X				
2	Carlson <i>et al.</i> , 2004	Maize/Soy/Whey	16	181, 306, 431	oxide	Polysac			X				
3	Carlson <i>et al.</i> , 2004	Maize/Soy/Whey	18	183, 233, 283, 383	sulfate	YProt	X ^{c)}	X ^{c)}	X				
4	Carlson <i>et al.</i> , 2004	Maize/Soy/Whey	20	185, 385, 585, 2185	oxide	YProt	X ^{c)}	X ^{c)}	X				
5	Case and Carlson, 2002	Maize/Soy/Whey	30	280, 630, 3130	oxide	HProt, Polysac	X ^{c)}	X ^{c)}	X				
6	Case and Carlson, 2002	Maize/Soy/Whey	30	280, 630, 3130	oxide	HProt, Polysac	X ^{c)}	X ^{c)}	X				
7	Case and Carlson, 2002	Maize/Soy/Whey	30	280, 630, 3130	oxide	HProt, Polysac			X				
8	Cheng <i>et al.</i> , 1998	Maize/Soy	30	30, 130	sulfate	Lysine	X	X	X		X	X	X
9	Cheng <i>et al.</i> , 1998	Maize/Soy	27	27, 127	sulfate	Lysine	X	X	X		X	X	X
10	Creech <i>et al.</i> , 2004	Maize/Soy/Whey	30	55, 180	sulfate	HProt	X	X	X	X			
11	Hahn and Baker 1993	Maize/Soy/Whey	30	130, 3130	sulfate, oxide	Methionine	X ^{c)}	X ^{c)}					
12	Hill <i>et al.</i> , 1986	Maize/Soy	27	27, 42	sulfate	Methionine	X	X					
13	Hollis <i>et al.</i> , 2005	Maize/Soy/Whey	30	123, 248, 373	sulfate	Methionine	X ^{c)}	X ^{c)}					
14	Hollis <i>et al.</i> , 2005	Maize/Soy/Whey	30	138, 638, 2138	oxide	Methionine, HProt, Polysac	X ^{c)}	X ^{c)}					
15	Kessler <i>et al.</i> , 1996	Cereal/Soy	36	36, 96	oxide	HSProt, Polysac	X	X					
16	Kessler <i>et al.</i> , 1996	Cereal/Soy	36	36, 96	oxide	HSProt, Polysac	X	X			X	X	
17	Kessler <i>et al.</i> , 1996	Cereal/Soy	36	36, 96	oxide	HSProt, Polysac	X	X			X	X	
18	Lee <i>et al.</i> , 2001 ^a	Maize/Soy	35	95, 155	sulfate	Methionine, Hprot	X	X	X				
19	Lee <i>et al.</i> , 2001 ^b	Maize/Soy	35	95, 155	sulfate	Methionine, Hprot	X	X	X				
20	Männer <i>et al.</i> 2006	Cereal/Whey	25	25, 44	sulfate	HSProt, Glycine			X				X
21	Mullan <i>et al.</i> , 2007	n.d.	35	160, 260, 410, 2660	oxide	YProt	X ^{c)}	X ^{c)}					
22	Revy <i>et al.</i> , 2002	Maize/Soy/Whey	28	28, 38, 48, 58	sulfate	Methionine			X	X	X	X	X
23	Revy <i>et al.</i> , 2004	Maize/Soy/Whey	32	32, 52	sulfate	Methionine			X	X	X	X	X
24	Richert <i>et al.</i> , 1994	Maize/Soy/Whey	30	195	oxide	not defined	X	X					
25	Rupic <i>et al.</i> , 1997	Cereal/Soy	37	37, 78, 121	sulfate	Methionine			X	X		X	
26	Schiavon <i>et al.</i> , 2000	Cereal/Soy/Whey	30	137, 305	sulfate	Hprot	X	X	X		X		
27	Schlegel <i>et al.</i> , 2010	Maize and Maize/Soy	25, 38	25, 38, 40, 53	sulfate	Glycine			X	X		X	
28	Susaki <i>et al.</i> , 1999	Cereal/Soy/Whey	47	47, 72, 97, 147	sulfate	Hprot	X		X		X	X	
29	Swinkels <i>et al.</i> , 1996	Soy isolate	17	17, 62	sulfate	Hprot			X	X	X		
30	Swinkels <i>et al.</i> , 1996	Soy isolate	17	62	sulfate	Hprot			X	X	X		
31	van Heugten <i>et al.</i> , 2003	Maize/Soy/Whey	24	104, 184, 264	sulfate	Methionine, Lysine	X	X			X		
32	Wedekind <i>et al.</i> , 1994	Maize/Soy	32	32, 40, 47	sulfate, oxide	Methionine, Lysine			X			X	
33	Woodworth <i>et al.</i> 2005	Maize/Soy/Whey	30	195, 445, 3195	oxide	Hprot	X ^{c)}	X ^{c)}					
34	Zacharias <i>et al.</i> , 2004	Cereal/Soy	35	65, 105	sulfate	not defined							X

^a soy = soybean meal; cereal = other cereals than maize; Whey = whey powder; n.d. = not defined

^b YProt = Yeast protein; HProt = hydrolyzed protein; HSProt = hydrolyzed soybean meal protein; Polysac = polysaccharide

^c Experiments using pharmacological levels of Zn (up to 3500 mg/kg diet)

Table 3 Descriptive statistics of the main broiler variables with results on the GLM procedure ^a

Data		Plasma Zn [mg/l]	Bone Zn [mg/kg DM]
n° Observations		36	66
<u>Dependent variable</u>			
	Min	0.68	45
	Max	1.99	214
	Mean	1.48	138
	SEM	0.063	6.5
<u>Independent variables</u>			
DZNTOT	Min	13	1
[mg / kg diet]	Max	84	85
	Mean	46	48
DZNN	Min	13	1
[mg / kg diet]	Max	44	45
	Mean	28	28
DZNI	Min	0	0
[mg / kg diet]	Max	40	60
	Mean	7	8
DZNO	Min	0	0
[mg / kg diet]	Max	40	60
	Mean	11	11
<u>Pearson correlations</u>			
DZNN - DZNI		0.16 n.s.	0.13 n.s.
DZNN - DZNO		0.02 n.s.	0.03 n.s.

^a From experiments number 3, 7, 10, 11, 12, 19, 23, 24, 25, 26 and 28 (see table 1).

Min: minimum value; Max: maximum value; Mean: mean value; SEM: standard error of the mean.

Table 4 Descriptive statistics of the main piglet with results on the GLM procedure ^a

Data		Plasma Zn	ALP	Liver Zn	Bone Zn	Absorbed Zn
		[mg/l]	[U/l]	[mg/kg DM]	[mg/kg DM]	[mg / kg diet ingested]
n° Observations		46	23	23	28	28
<u>Dependent variable</u>						
Min		0.15	25	92	34	5.5
Max		1.83	315	311	174	39.4
Mean		0.73	152	177	85	17.2
SEM		0.064	14.1	13.6	8.1	1.60
<u>Independent variables</u>						
DZNTOT [mg / kg diet]	Min	17	17	17	25	25
	Max	155	62	147	147	130
	Mean	70	47	70	61	66
DZNN [mg / kg diet]	Min	17	17	17	25	25
	Max	47	28	47	47	35
	Mean	29	26	27	32	30
DZNI [mg / kg diet]	Min	0	0	0	0	0
	Max	120	45	100	100	100
	Mean	18	11	22	14	18
DZNO [mg / kg diet]	Min	0	0	0	0	0
	Max	120	45	100	100	100
	Mean	23	11	22	15	19
<u>Pearson correlations</u>						
DZNN - DZNI		0.11 n.s.	-0.33 n.s.	0.12 n.s.	0.12 n.s.	0.16 n.s.
DZNN - DZNO		0.19 n.s.	-0.33 n.s.	0.12 n.s.	0.12 n.s.	0.13 n.s.

^a From experiment number 8, 9, 18, 19, 20, 22, 23, 27, 28, 29, 30, 32 and 34 (see Table 2).
Min: minimum value; Max: maximum value; Mean: mean value; SEM: standard error of the mean.

Table 5 Adjusted dependent variable response to dietary DZNN, DZNI and DZNO (mg / kg diet) in broilers ^a

Model	Plasma Zn [mg/l]		Bone Zn [mg/kg DM]	
	Coefficient	P-value	Coefficient	P-value
Intercept	0.692	***	6.44	n.s.
DZNN	0.0155	**	3.35	***
DZNI	0.0493	***	4.78	***
DZNO	0.0446	***	5.00	***
DZNI ²			-0.0333	***
DZNO ²			-0.0401	***
DZNN x DZNI	-0.000945	***	-0.0544	***
DZNN x DZNO	-0.000773	**	-0.0481	***
R ²	0.91		0.91	
r.m.s.e.	0.161		12.3	
DZNI vs DZNO	n.s.		n.s.	
DZNI ² vs DZNO ²	-		n.s.	
DZNN x DZNI vs DZNN x DZNO	n.s.		n.s.	
RBV average	93		113	
RBV with DZNN low ^b	91		108	
RBV with DZNN medium ^b	92		113	
RBV with DZNN high ^b	95		118	

^a The model was based on Equation 2. DZNN, DZNI and DZNO are expressed as mg / kg diet. Coefficients that are not presented were not significant (P > 0.10). From experiments number 3, 7, 10, 11, 12, 19, 23, 24, 25, 26 and 28 (see table 1).

^b Calculated relative bioavailability from DZNO to DZNI. The three defined DZNN levels for low, medium and high were respectively 15, 30, 40 mg / kg for plasma Zn and bone Zn.

Coeff., coefficient; R², coefficient of determination; r.m.s.e., root mean square error.

Table 6 Adjusted dependent variable response to dietary DZNN, DZNI and DZNO (mg / kg diet) in piglets^a.

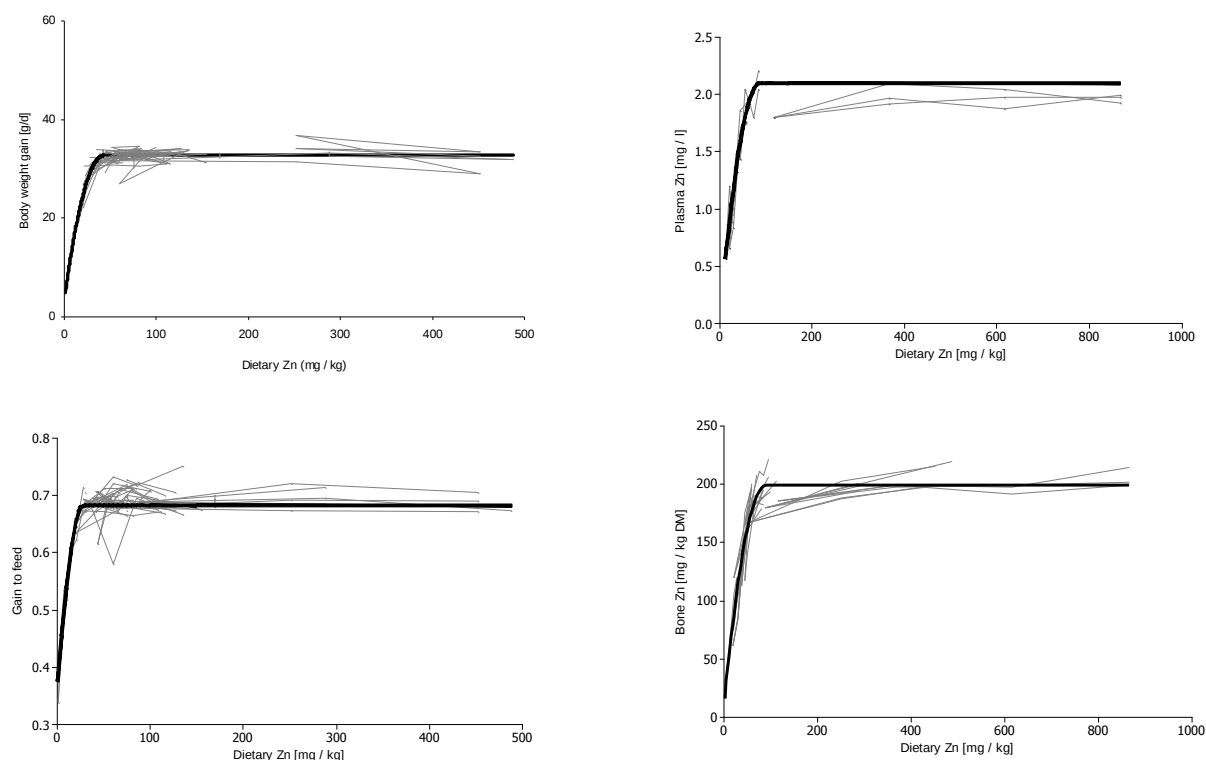
Model	Plasma Zn [mg/l]		ALP [U/l]		Liver Zn [mg/kg DM]		Bone Zn [mg/kg DM]		Absorbed Zn [mg / kg diet ingested]	
	Coeff.	P-value	Coeff.	P-value	Coeff.	P-value	Coeff.	P-value	Coeff.	P-value
Intercept	0.508	***	61.3	***	251	***	92.7	***	44.4	*
DZNN					-4.757	***	-1.051	*	-1.211	+
DZNI	0.0147	***	6.751	***	0.757	***	0.871	***	0.214	***
DZNO	0.0125	***	6.601	***	0.736	**	0.874	***	0.250	***
DZNI ²	-0.000113	***	-0.0786	+						
DZNO ²	-0.000075	*	-0.0835	*						
R ²	0.93		0.91		0.92		0.96		0.90	
r.m.s.e.	0.0943		21.0		23.8		7.42		2.98	
DZNI vs DZNO	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
DZNI ² vs DZNO ²	+		n.s.		-		-		-	
RBV ^b	85		98		97		100		117	

^a The model was based on Equation 2. Coefficients for Zn sources that are not presented were not significant. Only the intercept was significant for G:F (0.636; P < 0.001) and for BWG (433; P < 0.001). From experiment number 8, 9, 18, 19, 20, 22, 23, 27, 28, 29, 30, 32 and 34 (see Table 2).

^b Calculated relative bioavailability from DZNO to DZNI.

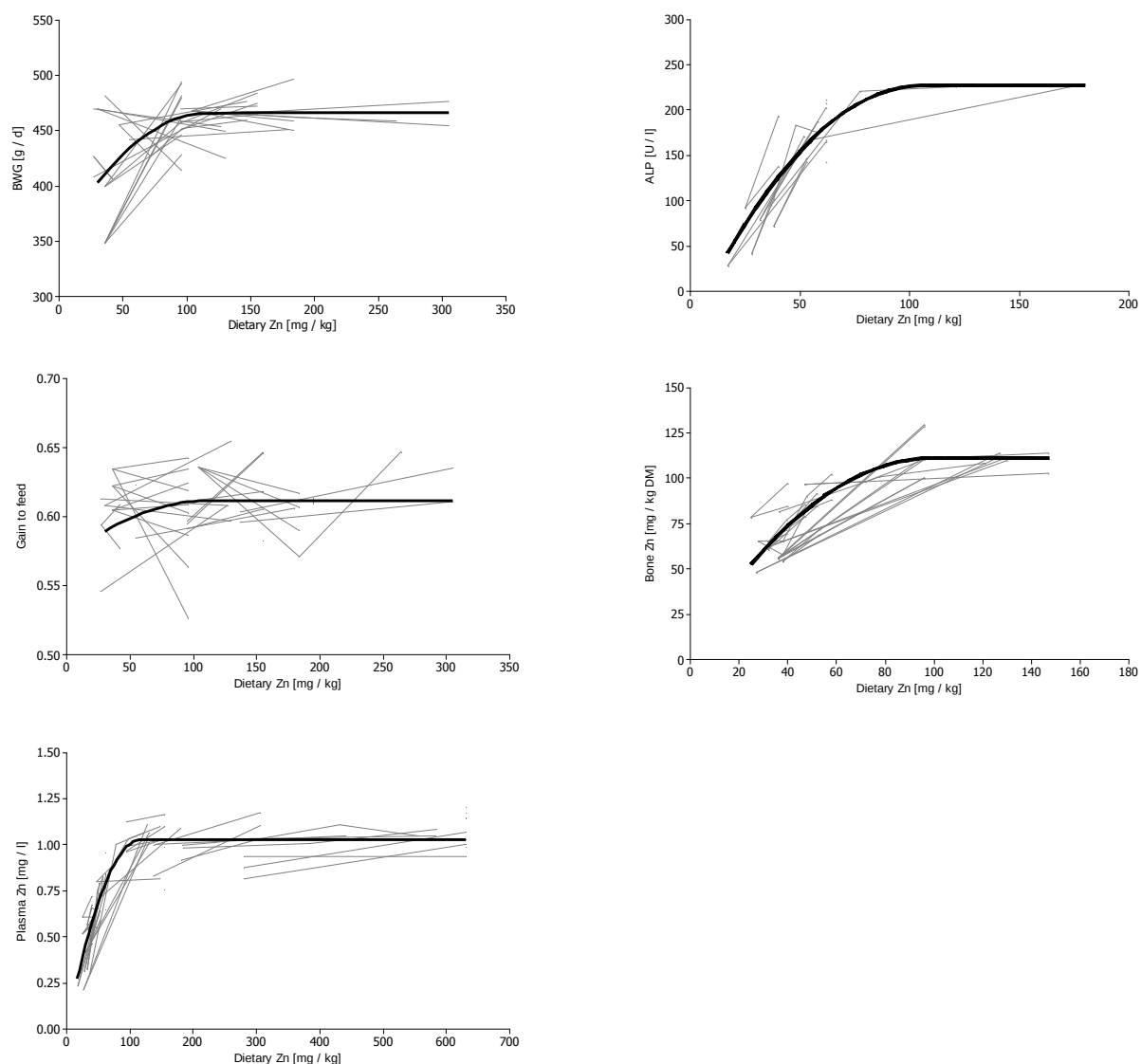
Coeff., coefficient; R², coefficient of determination; r.m.s.e., root mean square error.

Figure 1 Curvilinear-plateau response^a (thick black) and corrected within-experiment (grey) response of BWG; G:F, plasma Zn and bone Zn on total dietary Zn (DZNTOT) in broilers.



^a Regressions for DZNTOT < X1 were: BWG = $3.501 + 1.373 \cdot \text{DZNTOT} - 0.0161 \cdot \text{DZNTOT}^2$ (X1 = 43; Ymax = 32.7; R² = 0.37; r.m.s.e = 1.305); G:F = $0.354 + 0.0221 \cdot \text{DZNTOT} - 0.000363 \cdot \text{DZNTOT}^2$ (X1 = 30; Ymax = 0.69; R² = 0.28; r.m.s.e = 0.0316); Plasma Zn = $-0.0171 + 0.0482 \cdot \text{DZNTOT} - 0.000275 \cdot \text{DZNTOT}^2$ (X1 = 88; Ymax = 2.10; R² = 0.58; r.m.s.e = 0.158); Bone Zn = $12.0 + 4.17 \cdot \text{DZNTOT} - 0.0233 \cdot \text{DZNTOT}^2$ (X1 = 90; Ymax = 199; R² = 0.77 ; r.m.s.e = 13.2)

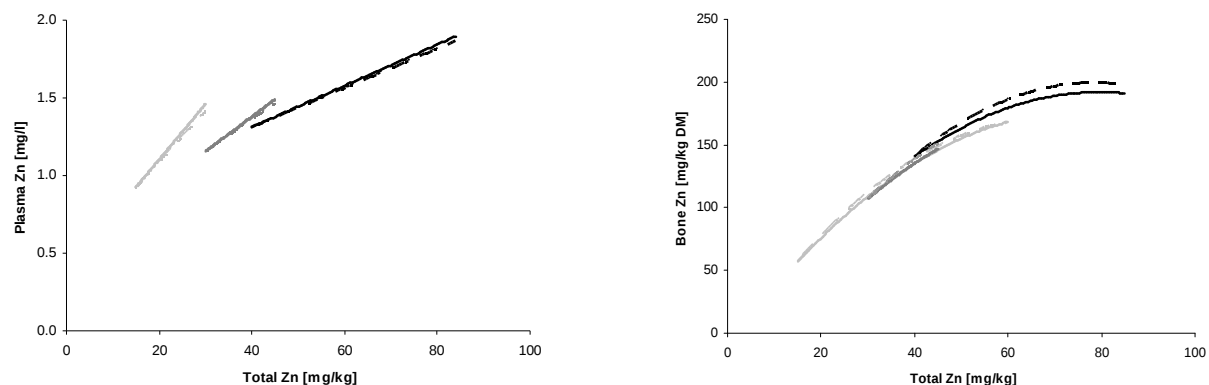
Figure 2 Curvilinear-plateau response (thick black) and corrected within-experiment (grey) response of BWG^a, G:F^a, Plasma Zn, plasma ALP and bone Zn on total dietary Zn (DZNTOT) in piglets.^b



^a Data with DZNTOT levels for growth promotional levels were excluded on these graphs.

^b Regressions for DZNTOT < X1 were: BWG = $352 + 1.96 \cdot \text{DZNTOT} - 0.00840 \cdot \text{DZNTOT}^2$ (X1 = 117; Ymax = 466; R² = 0.11; r.m.s.e = 21.6); Plasma Zn = $-0.00214 + 0.0174 \cdot \text{DZNTOT} - 0.0000749 \cdot \text{DZNTOT}^2$ (X1 = 117; Ymax = 1.03; R² = 0.35; r.m.s.e = 0.122); ALP = $-35.3 + 4.97 \cdot \text{DZNTOT} - 0.0236 \cdot \text{DZNTOT}^2$ (X1 = 106; Ymax = 227; R² = 0.19; r.m.s.e = 37.7); Bone Zn = $7.06 + 2.09 \cdot \text{DZNTOT} - 0.0105 \cdot \text{DZNTOT}^2$ (X1 = 100; Ymax = 111; R² = 0.51; r.m.s.e = 9.96)

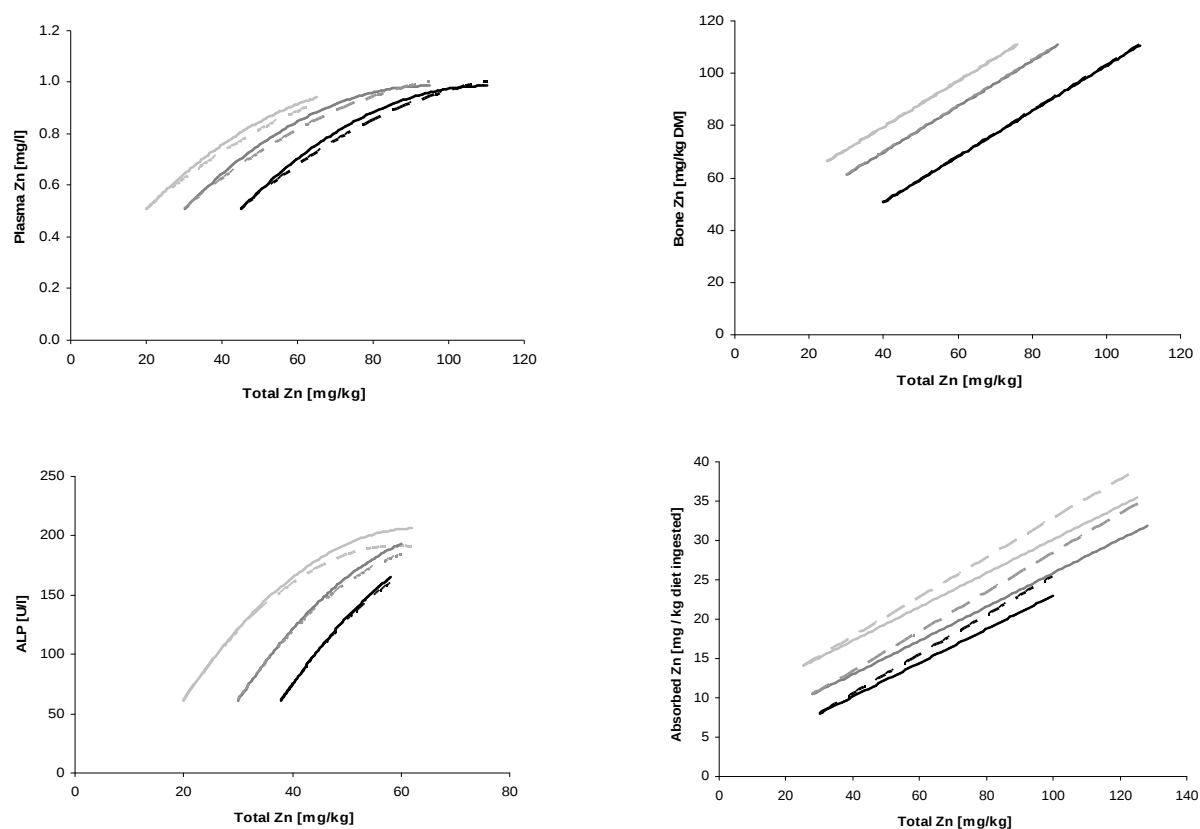
Figure 3 Response of plasma Zn and bone Zn to total dietary zinc in diets supplemented with DZNI (continuous curve) or with DZNO (dashed curve) in broilers ^{a, b}



^a From experiments number 3, 7, 10, 11, 12, 19, 23, 24, 25, 26 and 28 (see table 1).

^b DZNI and DZNO were supplemented within their range of validity to a low (light grey), medium (grey) and high (black) level of DZNN. The three defined DZNN levels were 15, 30, 40 mg / kg for plasma Zn and bone Zn.

Figure 4 Response of plasma Zn, plasma ALP, liver Zn, bone Zn and absorbed Zn to total dietary Zn in diets supplemented with DZNI (continuous curve) or with DZNO (dashed curve) in piglets ^{a, b}



^a From experiment number 8, 9, 18, 19, 20, 22, 23, 27, 28, 29, 30, 32 and 34 (see Table 2). G:F and BWG are not represented as coefficients were not significant except the intercept.

^b DZNI and DZNO were supplemented within their range of validity to either a low (light grey), medium (grey) and high (black) level of DZNN. The three defined DZNN levels were 25, 28, 30 mg / kg for absorbed Zn; 20, 30, 45 mg/kg for plasma Zn and liver Zn; 20, 30, 38 mg / kg for plasma ALP and 25, 30, 45 mg/kg for bone Zn.

4. Discussion générale

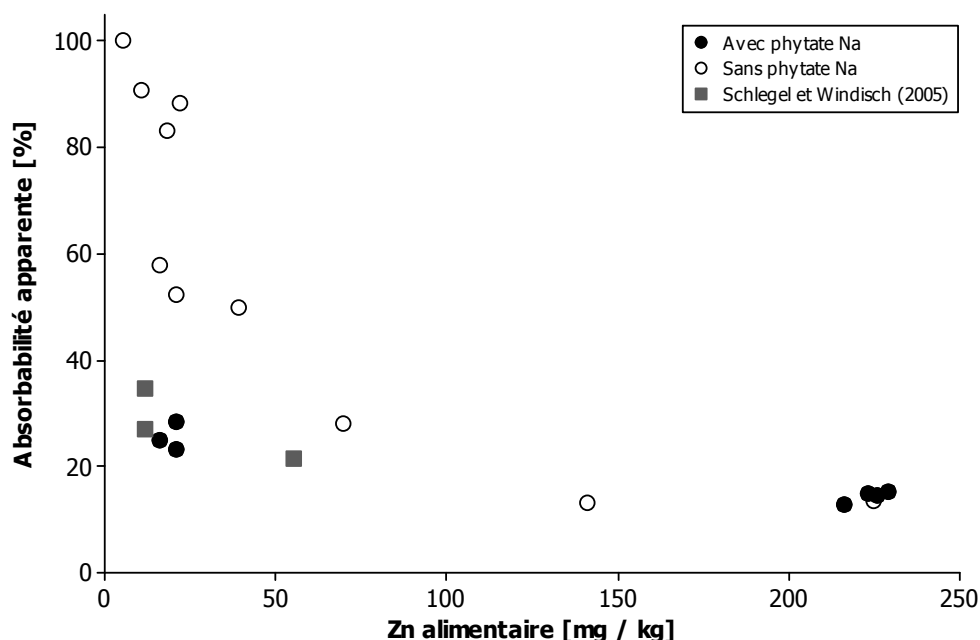
Notre travail avait pour objectif d'évaluer l'impact du remplacement d'une source inorganique de zinc par une source organique sur la disponibilité du zinc. En particulier, nous avons étudié la possible protection des formes organiques contre l'effet antagoniste des phytates. Le ligand de la source sous forme organique est supposé protéger le zinc de la formation de complexes de ces composés dans le tractus gastro-intestinal. Le zinc arriverait ainsi intact au niveau des sites d'absorption où il serait absorbé par les entérocytes, soit en l'état soit sous forme d'ion, après dissociation de son ligand. Un nombre important de sources de zinc sous forme organique est disponible sur le marché. La possibilité d'utiliser, pour cette étude, une source avec une identité définie et des liaisons entre le métal et le ligand démontrées, est un avantage clef. Ainsi, au cas où les résultats des expériences ne donneraient pas de différences entre sources de zinc étudiées, aucun doute ne peut être émis quant à une éventuelle défaillance qualitative de la source sous forme organique utilisée. Le choix s'est porté sur une source de zinc liée à de la glycine (ZnGly), car il a été prouvé, par voie analytique, que la totalité du zinc présent dans le produit est lié à l'acide aminé (chapitre 3.2).

4.1. Impact de phytates de sodium apportés dans des régimes semi-synthétiques

Le phytate de sodium est soluble et ionisable sur une large gamme de pH. Le phytate de sodium ionisé (acide phytique) dans le tractus digestif, peut facilement se lier au zinc également ionisé présent dans le milieu. Cette liaison du zinc aux phytates, si elle ne peut être rompue, rend ce dernier indisponible. L'absorbabilité apparente du zinc est réduite chez le rat en croissance lorsque du phytate de sodium est ajouté dans l'aliment semi-synthétique (Rimbach et Pallauf, 1992 ; Rimbach *et al.*, 1995). Cette réduction par rapport à un aliment semi-synthétique exempt de phytate de sodium illustre l'effet antagoniste qu'exerce le phytate de sodium sur le zinc supplémenté. Le bilan de zinc de rats en croissance (Chapitre 3.3) consiste à vérifier, si les flux en zinc se différencient entre l'apport alimentaire de ZnGly et de ZnSO₄ dans un aliment semi-synthétique (2 mg Zn / kg d'aliment) contenant du phytate de sodium (8 g / kg d'aliment). L'absence d'un aliment expérimental exempt de phytate de sodium ne permet pas de statuer sur son effet antagoniste envers le zinc. Toutefois, l'absorbabilité apparente en Zn des aliments (12 mg Zn / kg d'aliment) de notre expérience est similaire à celle d'aliments comparables de Rimbach et Pallauf (1992) et Rimbach *et al.* (1995). De plus, elle se situe nettement en dessous des valeurs observées par Weigand et Kirchgessner (1980 ; 1992), Rimbach et Pallauf (1992) et Rimbach *et al.* (1995) à l'aide d'aliments avec des teneurs similaires en zinc, mais sans phytate de sodium (Figure 1). L'apport alimentaire de 12 mg Zn / kg est suffisamment bas pour supposer une linéarité

entre l'absorption apparente en zinc et le pool de zinc absorbable. Nous pouvons ainsi déduire que l'effet antagoniste des phytates de sodium sur le zinc alimentaire était présent dans notre expérience.

Figure 1 Absorbabilité apparente du zinc chez le rat en croissance en fonction de l'ajout de phytate de sodium et de zinc ajouté sous forme de sulfate dans des aliments semi-synthétiques (d'après Weigand et Kirchgessner, 1980 ; 1992 ; Rimbach et Pallauf, 1992 ; 1997 ; Rimbach *et al.*, 1995 ; Schlegel et Windisch, 2005).



En complément des informations publiées dans le chapitre 3.3, il est important de préciser certains aspects de la méthode utilisée : l'approche méthodologique pour étudier les flux de zinc, qui incluent les mesures de pertes endogènes fécales, n'autorise pas de période de déplétion en zinc, comme c'est le cas dans les études habituelles de disponibilité (Rimbach et Pallauf 1992 ; Rimbach *et al.*, 1995). Cette méthode nécessite de marquer au préalable les animaux avec du ^{65}Zn de façon à différencier, par la suite, les flux de zinc d'origines endogène (^{65}Zn) et alimentaire (aliments expérimentaux zinc non isotopique). Une délai entre le marquage en ^{65}Zn et l'étude des flux trop long engendrerait une sécrétion en ^{65}Zn réduite et diluée avec du zinc non isotopique expérimental. Une alternative, qui permettrait une période de déplétion consiste à produire les sources de zinc étudiées avec à l'aide de ^{65}Zn , ce qui éviterait le marquage préalable des animaux. La production de ZnGly à l'aide de ^{65}Zn s'avère toutefois difficile sans outil de fabrication de laboratoire adéquat. Les moindres pertes fécales endogènes (18 vs 48 $\mu\text{g Zn / jour}$) mesurées chez les animaux soumis aux aliments expérimentaux (12 mg Zn / kg d'aliment) par rapport à celles du témoin positif (55 mg Zn / kg d'aliment) permettent, en plus des indications sur l'absorbabilité apparente réduite, de vérifier que les animaux étaient bien en situation de sub-carence en zinc. La

diminution des teneurs en zinc plasmatique, fémorale et de l'activité de la phosphatase alcaline plasmatique chez les animaux nourris avec les traitements expérimentaux par rapport à ceux recevant le régime témoin positif corrobore cette situation de subcarence.

Les résultats de cette première expérience indiquent que les flux de zinc provenant de ZnGly¹ sont numériquement améliorés pour la quantité de zinc absorbée apparente (+30%) par rapport aux flux de zinc provenant de ZnSO₄. En raison de l'égalité des pertes endogènes fécales pour les deux traitements, l'augmentation du flux réellement absorbé est moindre (+17%). Les différences entre sources sont significatives lorsqu'elles sont exprimées en proportion du zinc ingéré. Selon Weigand et Kirchgessner (1979 ; 1980 ; 1992) l'absorbabilité réelle du zinc se situe entre 94 et 100% lorsqu'un aliment est utilisé qui contient moins de 5 mg Zn sous forme native / kg, moins de 20 mg Zn supplémenté / kg et qui est exempt de phytate de sodium. En supposant que dans ce cas de figure, respectivement 70% et 100% du zinc sous forme native et ajoutée soient absorbées, ce qui correspond à 95% pour le zinc alimentaire total, notre expérience indique qu'une part importante du zinc de ZnSO₄ et de ZnGly se lie à l'acide phytique provenant du phytate de sodium ajouté. Par g de P phytique, 3.3 et 2.8 mg de Zn de respectivement ZnSO₄ et ZnGly se seraient liées. Par mole de phytate (IP6), 0.0094 et 0.0080 moles de Zn de respectivement ZnSO₄ et ZnGly se seraient liées. Ces différences entre sources de zinc supplémentées suggèrent que l'acide phytique interagit avec le zinc des deux sources pour former des complexes insolubles, mais de manière moins prononcée avec ZnGly qu'avec ZnSO₄. Les excrétions de zinc par voie endogène fécale et urinaire ne se différencient pas entre les deux sources de zinc supplémentées. La quantité supplémentaire de zinc absorbée par l'apport alimentaire de ZnGly est donc retenue et serait ainsi disponible pour les besoins physiologiques en zinc.

Les différences pour les indicateurs du statut en zinc ne varient pas. Bien qu'elles ne soient pas significatives, les teneurs en zinc plasmatique, osseux et corporel, de même que l'activité de la phosphatase alcaline plasmatique étaient numériquement augmentées lorsque les animaux recevaient ZnGly à la place de ZnSO₄ (respectivement de 7, 2, 2 et 16%). L'absence d'effet significatif, en dépit de la pertinence de ces critères pour évaluer le statut en zinc, pourrait être liée à l'absence de période de déplétion préalable à l'expérimentation. La moindre variation des critères d'évaluation des réserves (os) par rapport à ceux de l'évaluation du pool de zinc fonctionnel (plasma) est en accord avec cette hypothèse.

¹ Erreur dans chapitre 3.3, Tableau 3 : La quantité [ug / j] de zinc fécal total pour le traitement ZnGly est 71 et non 74.

4.2. Impact des phytates apportés par les matières premières d'origine végétale

Les phytates sont présents dans les aliments destinés aux poulets et aux porcelets, souvent à base de matières premières d'origine végétale. Dans les grains de blé, ils sont en partie liés, au zinc (Rodrigues-Filho *et al.*, 2005) et le sont probablement aussi dans d'autres matières premières. La relation linéaire établie par Revy *et al.* (2003) entre phosphore phytique et zinc dans les matières premières d'origine végétale suggère, si la totalité du zinc est lié aux phytates, que 1 g de P phytique lie 10 mg de Zn ou qu'une mole de phytate (IP6) lie 0,0284 moles de zinc.

Avant même de s'interroger sur l'éventuelle protection de la source de zinc organique étudiée, il est important de chercher à mieux comprendre la nature de l'interaction entre les phytates alimentaires et le zinc présent dans la ration, en distinguant le zinc présent dans les matières premières (natif) du zinc ajouté sous forme de sulfate.

4.2.1. Effet des phytates sur le zinc présent dans l'aliment chez le porc

Lors de l'étude expérimentale présentée au chapitre 3.4, nous avons observé une amélioration du statut en zinc (teneur en zinc plasmatique, teneur en zinc du métacarpe) chez les animaux ayant reçu l'aliment P- (1,3 g P phytique et 25 mg zinc / kg) par rapport aux animaux ayant reçu l'aliment P+ sans phytase ajoutée (2,3 g P phytique et 38 mg zinc / kg). Cette amélioration était encore de plus grande ampleur lorsque 500 unités de phytase microbienne étaient ajoutées à l'aliment P+. Sur la base de la teneur en zinc de l'os, l'augmentation du statut en zinc par rapport à P+ était de respectivement 32 et 105% pour P- et P+ additionné de phytase. Surtout, nos résultats suggèrent, en l'absence d'interaction entre le type d'aliment de base et le niveau de supplémentation en zinc, que l'antagonisme des phytates avec le zinc s'exerce au niveau du zinc natif et non du zinc ajouté. Cette hypothèse avait été émise par Revy *et al.* (2004 ; 2006). Ces auteurs avaient observé que la pente de la réponse de différents indicateurs du statut en zinc de porcelets sevrés au zinc ajouté sous forme de sulfate était indépendante de la présence de phytase microbienne dans l'aliment.

Notre expérimentation a été conduite dans un laboratoire de l'INRA (UMR SENAH, Saint-Gilles) au sein duquel un certain nombre d'études ont été menées avec une méthodologie similaire portant sur l'utilisation du zinc chez le porcelet sevré ont été menées. A partir de l'ensemble de ces résultats, nous avons tenté de répondre à la question de la nature de l'interaction entre zinc et phytates, en utilisant la teneur en zinc de l'os comme indicateur du statut en zinc. Les caractéristiques des 31 aliments testés lors de ces expérimentations sont

présentées au tableau 1. A trois exceptions près (Revy *et al.*, 2006 ; Jondreville *et al.*, 2005), aucun de ces aliments ne permettait de maximiser la teneur en zinc de l'os.

Tableau 1 Descriptif des aliments expérimentaux testés lors des expérimentations conduites sur porcelet sevré à l'INRA entre 2002 et 2010.

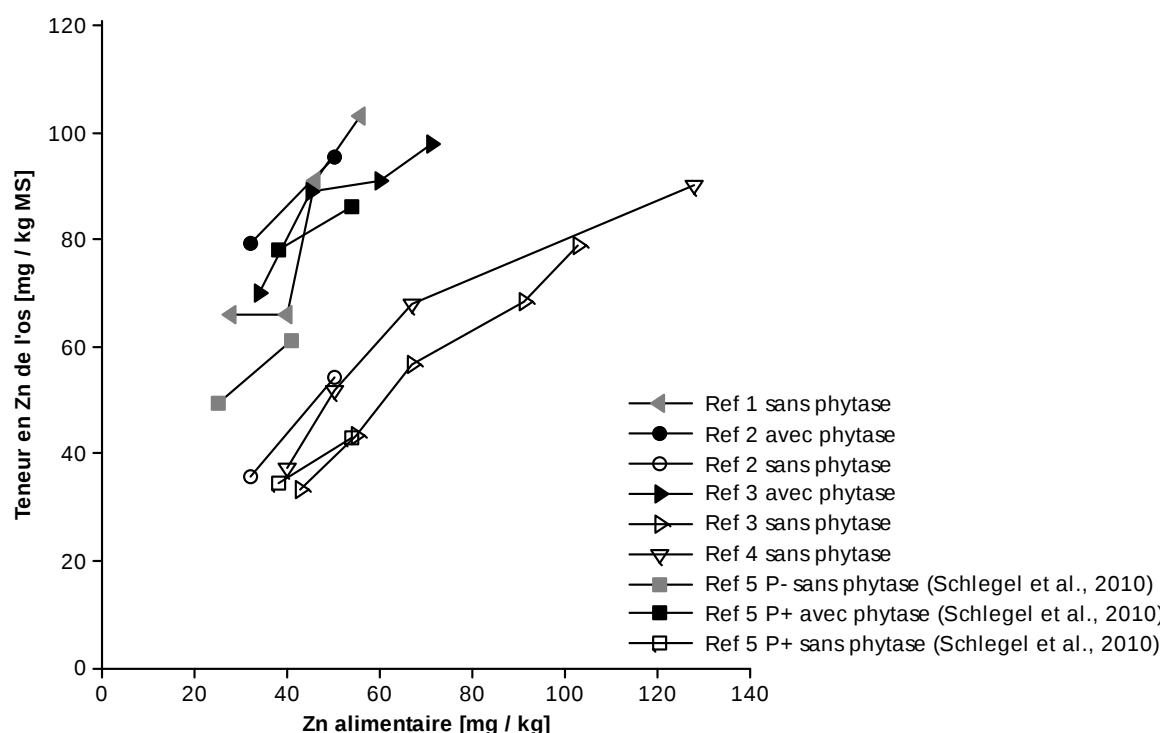
Référence	n° ref	Matières premières	P Phytique [g / kg]	Phytase végétale [U / kg]	Phytase microbienne [FTU / kg]	Zinc natif [mg / kg]	Zinc ajouté ¹ [mg / kg]
Revy <i>et al.</i> (2002)	1	Orge / Poudre de lait / isolat de soja	0.8	ND	0	28	0, 12, 18, 28
Revy <i>et al.</i> (2004)	2	Maïs / Tourteau de soja / Poudre de lait / Son de blé chauffé	2.5	116	0 1219	32	0, 18
Revy <i>et al.</i> (2006)	3	Maïs / Tourteau de soja / Poudre de lait / Son de blé chauffé	2.9	150	0 700	34	0, 11, 26, 37 9, 21, 33, 57, 69
Jondreville <i>et al.</i> , (2005)	4	Maïs / Tourteau de soja / Poudre de lait / Isolât de soja	2.1	60	0 150, 260, 510, 870	30	10, 20, 37, 98 0
Schlegel <i>et al.</i> (2010)	5	Maïs / Caséine / Amidon de maïs / Farine de poisson Maïs / Tourteau de soja / Isolat de soja / Son de blé chauffé	1.3 2.3	27 201	0 487	25 38	0, 16

¹ Phytase produite par *Aspergillus niger*

² Sulfate de zinc

La représentation graphique des résultats obtenus lors de ces expérimentations semble bien corroborer cette absence d'interaction entre phytate et zinc ajouté (Figure 2). L'impact de la phytase microbienne (références 2, 3 et 5) et de celui de la diminution de la teneur en phytates de l'aliment (références 1 et 2) ne semblent s'exercer qu'au niveau des aliments sans zinc ajouté, alors que la pente de la réponse au zinc ajouté semble indépendante de l'aliment.

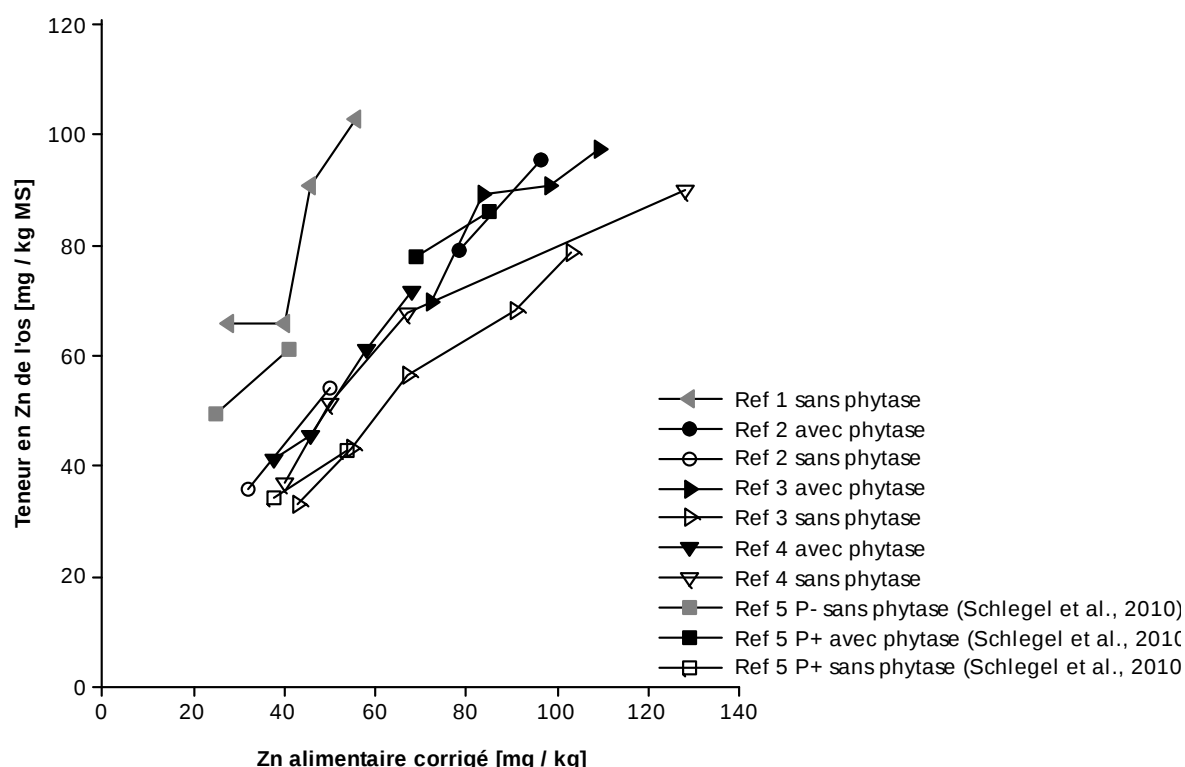
Figure 2 Teneur en zinc de l'os chez le porcelet sevré en fonction de teneur en zinc d'aliment supplémentés ou non de zinc sous forme de sulfate – synthèse des résultats obtenus à l'INRA entre 2002 et 2010.¹



¹ Les caractéristiques des aliments pour chacune des références sont présentées au tableau 1.

Les travaux de Jondreville *et al.* (2005) permettent de rendre compte de l'effet de la phytase microbienne sur la biodisponibilité du zinc dans des aliments à base de maïs et de tourteau de soja, à partir d'équations d'équivalence entre phytase ajoutée et zinc sous forme de sulfate. Cependant, l'impact de la diminution de la teneur en phytates des aliments n'est pas représenté correctement (Figure 3).

Figure 3 Teneur en zinc de l'os chez le porcelet sevré en fonction de teneur en zinc d'aliment corrigée de l'équivalence entre phytase microbienne et zinc sous forme de sulfate¹ – synthèse des résultats obtenus à l'INRA entre 2002 et 2010.²



¹ L'équation d'équivalence est : $Zn [mg] = 49,9 - 58,3 * e^{(-0,00233 * Phytase \text{ microbienne } [FTU])}$, Jondreville *et al.* 2005.

² Les caractéristiques des aliments pour chacune des références sont présentées au tableau 1.

Nous avons donc cherché à produire un modèle permettant de prédire la teneur en zinc de l'os en fonction de la supplémentation en zinc non seulement dans des aliments à base de maïs et de tourteau de soja avec ou sans phytase, mais également dans des aliments moins riches en phytates, comme ceux qui ont été utilisés par Revy *et al.* (2002) ou lors de notre expérimentation (aliment P-), ou encore dans des aliments contenant de la phytase végétale, comme ceux qui contenaient du son de blé (Revy *et al.*, 2004 ; 2006 et aliment P+ de notre étude). Notre démarche repose sur l'hypothèse de la proportionnalité entre les quantités de phosphore phytique et de zinc libérées par hydrolyse des phytates. Cette proportionnalité avait été suggérée par Jondreville *et al.* (2005) qui avaient estimé que l'augmentation de 1 g de la teneur en phosphore digestible d'un aliment était équivalente à celle de 50 mg de zinc sous forme de sulfate.

Pour rendre compte de l'hydrolyse des phytates, principalement par l'activité de la phytase végétale et / ou microbienne, une nouvelle variable appelée « phosphore phytique non hydrolysé » a été introduite dans le modèle. Cette variable est calculée comme la teneur en phosphore phytique de l'aliment diminuée de la quantité de phosphore libérée dans l'estomac par la phytase. Cette dernière grandeur a été estimée à partir d'une relation visant à prédire la teneur en phosphore digestible des aliments pour porcs en croissance à partir de leurs teneurs en phosphore phytique et non phytique et de leurs activités phytasiques végétale et microbienne (Létourneau-Montminy *et al.*, non publié). Selon ces auteurs,

$$P \text{ digestible [g]} = -0,217 + 0,00570 * PV + 0,760 * NPP + 0,208 * PPhyt + 0,156 * Phytasemic - 0,0132 * Phytasemic^2 + 0,00298 * Phytasemic^2 * PPhyt + 0,0520 * Phytaseveg - 0,0333 * Ca.$$

Avec PV, poids vif [kg] ; PPhyt, P phytique [g] ; NPP, P non phytique [g] ; Phytasemic, phytase microbienne [100 FTU] ; Phytaseveg, phytase végétale [100 U].

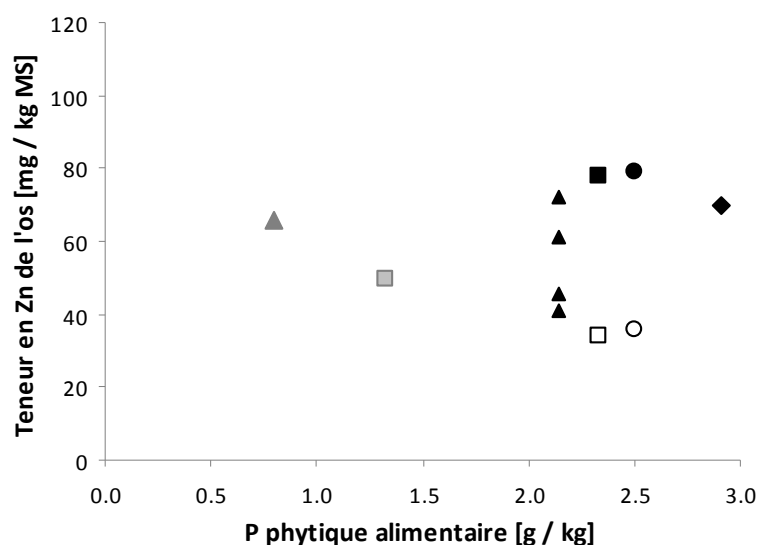
Nous avons extrait la partie de cette équation liée à l'hydrolyse des phytates (termes comprenant PPhyt, Phytaseveg et Phytasemic) pour estimer une grandeur que nous avons divisée par 0,75, représentant l'absorption de P libéré par hydrolyse (Létourneau-Montminy, 2009). Le P phytique non hydrolysé (PPhytNH) est la différence entre P phytique et cette valeur.

L'absence d'interaction entre phytate / phytase et zinc supplémenté observée préalablement, permet une analyse de leur effet spécifique sur le zinc natif. La réponse de la teneur en zinc de l'os à la teneur en PPhyt des aliments expérimentaux non supplémentés en zinc montre une grande hétérogénéité due à l'effet de l'activité phytasique alimentaire (Figure 4). En revanche, le remplacement de la variable PPhyt par la variable PPhytNH permet d'établir une relation linéaire qui démontre un effet antagoniste des phytates sur la disponibilité du zinc natif (Figure 5) :

$$Zn \text{ os [mg / kg MS]} = 91,7 (P < 0,001) - 36,1 (P = 0,001) * PPhytNH [g / kg],$$

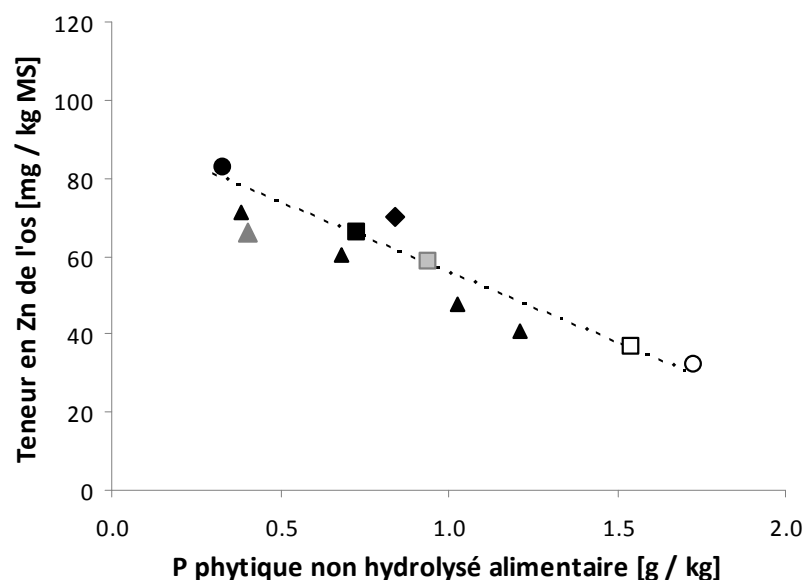
$$R^2 = 0,81, \text{ ETR} = 7,24.$$

Figure 4 Teneur en zinc de l'os de porcelets sevrés et non supplémentés en zinc en fonction de la teneur en P phytique de l'aliment – synthèse des résultats obtenus à l'INRA entre 2002 et 2010.¹



² Les caractéristiques des aliments pour chacune des références sont présentées au tableau 1.

Figure 5 Teneur en zinc de l'os de porcelets sevrés et non supplémentés en zinc en fonction de la teneur en P phytique non hydrolysé¹ de l'aliment – synthèse des résultats obtenus à l'INRA entre 2002 et 2010.²



¹ Phytate non hydrolysé [g] : $PPhyt - (0,208 PPhyt + 0,156 \text{ Phytase mic} - 0,0132 \text{ Phytase mic}^2 + 0,00298 \text{ Phytase mic}^2 \times PPhyt + 0,0520 \text{ Phytase veg}) / 0,75$. Avec PPhyt, P phytique [g] ; Phytase mic, phytase microbienne [100 FTU] ; Phytase veg, phytase végétale [100 U] (Létourneau-Montminy et al., non publié).

² Les caractéristiques des aliments pour chacune des références sont présentées au tableau 1.

Afin d'interpréter plus facilement nos données par rapport à la question posée, nous avons ensuite testé l'effet des caractéristiques alimentaires sur la teneur en zinc de l'os selon le modèle GLM suivant (Minitab, 2007):

$$\text{Zn os}_{wxy} = a + a_w + b \cdot \text{DZNN}_{wx} + c \cdot \text{DZNI}_{wy} + d \cdot \text{DZNI}_{wy}^2 + f \cdot \text{PPhytNH}_{wz} + g \cdot \text{PPhytNH}_{wz} \cdot \text{DZNN}_{wx} + h \cdot \text{PPhytNH}_{wz} \cdot \text{DZNI}_{wy} + e_{wxy}$$

où Zn os_{wxy} est la teneur en zinc de l'os [mg / kg MS] obtenue lors de l'expérience w avec un aliment contenant x [mg / kg], y [mg / kg] et z [g/kg] des variables indépendantes respectives DZNN (zinc natif), DZNI (zinc ajouté sous forme inorganique) et PPhytNH (phosphore phytique non hydrolysé), a est l'ordonnée à l'origine et a_w l'ajustement de l'ordonnée à l'origine pour chaque expérience w , b , c , d , f , g et h sont les coefficients de chaque variable indépendante et e est l'erreur résiduelle. L'effet fixe de l'expérience a été introduit dans le modèle afin de prendre en compte la variabilité inter-expérience (Sauvant et al., 2008):

Les résultats obtenus sont présentés au tableau 2. L'effet positif (DZNN, $P < 0,001$) du zinc natif sur le statut en zinc du porcelet est nettement affaibli par son interaction avec les phytates non hydrolysés (DZNN*PPhytNH, $P < 0,001$). Les phytates non hydrolysés n'interagissent pas avec le zinc ajouté (DZNI*PPhytNH, $P > 0,10$). La teneur en zinc de l'os augmente de manière linéaire (DZNI, $P < 0,001$) et quadratique (DZNI², $P < 0,001$) avec l'addition de zinc dans l'aliment. Cet effet quadratique est dû au plafonnement de la teneur en zinc de l'os lorsque l'apport alimentaire de zinc augmente. Ainsi, dans notre base de données, les phytates n'influencent la biodisponibilité du zinc que lorsqu'il est apporté par l'aliment de base, auquel les matières premières d'origine végétale contribuent largement.

L'évolution de la teneur en zinc de l'os obtenue à partir des paramètres du modèle présenté au tableau 2 est illustrée pour différents types d'aliments caractérisés par des teneurs en zinc natif, en phosphore phytique et en activité phytasique variable (Figure 6). Il est important de noter que cette relation a été établie dans le seul but de décrypter la relation entre phytates/phytase et zinc alimentaire. En particulier, l'effet quadratique du zinc ajouté n'est valable que dans le domaine de validité du modèle, qui est explicité à la figure 6. En particulier, nous ne remettons pas en cause la maximisation de la teneur en zinc de l'os pour des apports alimentaires de zinc qui excèderaient ceux de notre base de données. Toutefois, la relation que nous avons établie offre la possibilité d'adapter la supplémentation en zinc en fonction du potentiel antagoniste de l'aliment formulé.

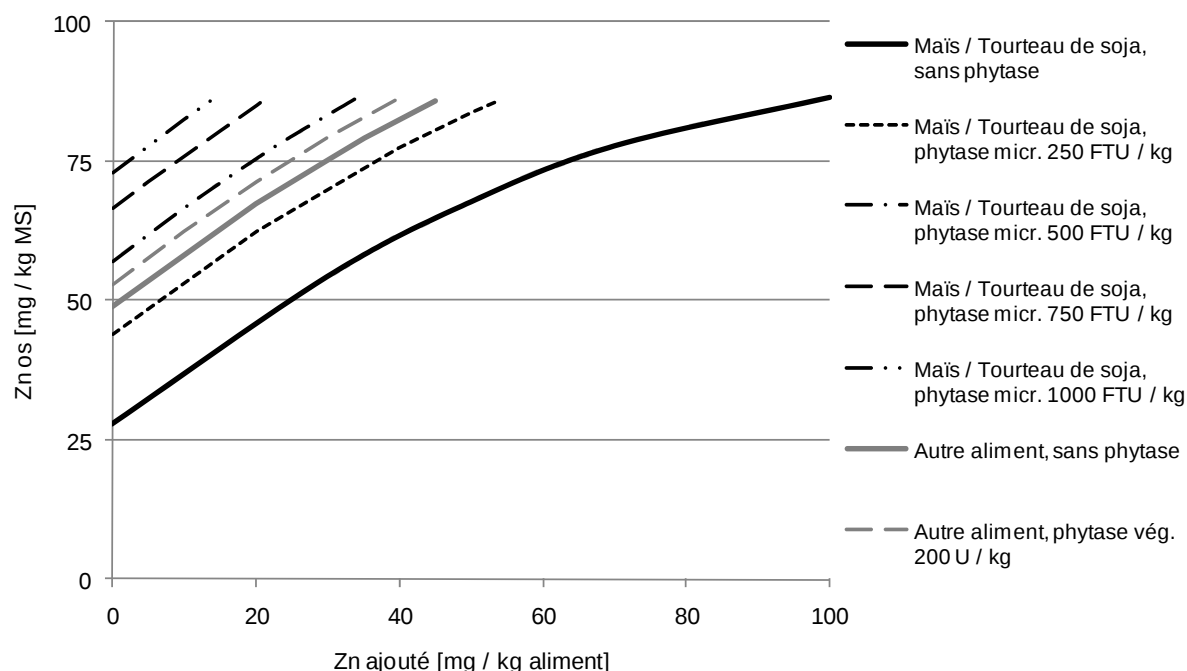
Tableau 2 Prédiction de la teneur en zinc de l'os de porcelets sevrés [mg / kg MS] en fonction des teneurs en zinc natif [mg / kg aliment], zinc ajouté sous forme de sulfate [mg / kg aliment] et P phytique non hydrolysé¹ [g / kg aliment] de l'aliment.²

	Coeff	valeur P
Constante	30.7	0.017
Zn natif	1.97	< 0,001
P Phytique non hydrolysé		NS
Zn natif * P phytique non hydrolysé	-1.15	< 0,001
Zn ajouté	1.01	< 0,001
Zn ajouté * Zn ajouté	-0.00422	0.016
Zn ajouté * P phytique non hydrolysé		NS
R ²	0.92	
ETR	5.86	

¹ Phytate non hydrolysé [g] : $PPhyt - (0,208 PPhyt + 0,156 Phytase\ mic - 0,0132 Phytase\ mic^2 + 0,00298 Phytase\ mic^2 \times PPhyt + 0,0520 Phytase\ veg) / 0,75$. Avec PPhyt, P phytique [g] ; Phytase mic, phytase microbienne [100 FTU] ; Phytase veg, phytase végétale [100 U] (Létourneau-Montminy *et al.*, non publié)

² Les caractéristiques des aliments pour chacune des références sont présentées au tableau 1

Figure 6 Prédiction¹ de la teneur en zinc de l'os de porcelets sevrés en fonction de la supplémentation en zinc sous forme de sulfate d'aliments à base de type maïs et de tourteau de soja² ou d'aliments à teneur en P phytique réduite³.



¹ L'équation est présentée au tableau 2.

² Les teneurs en P phytique et en zinc natif de l'aliment sont respectivement de 2,5 g et 30 mg / kg, l'activité phytasique végétale est considérée comme nulle.

³ Les teneurs en P phytique et en zinc natif de l'aliment sont respectivement de 1.5 g et 25 mg / kg, l'activité phytasique végétale est considérée comme 0 ou 200 U / kg.

A partir de ces relations, on peut estimer, dans un aliment à base de maïs et de tourteau de soja, une équivalence entre phytase microbienne et zinc ajouté sous forme de sulfate (Tableau 3). Ces valeurs sont plus élevées que celles estimées par Jondreville *et al.* (2005), en particulier pour les supplémentations en phytase microbienne élevées. Sans phytase ajoutée, la réduction de la teneur en phosphore phytique de 0,50 g / kg conduit à la réduction de la teneur en phosphore phytique non hydrolysée de 0,36 g / kg, compte tenu d'une hydrolyse de 20,6% de phosphore phytique en l'absence de phytase (Létourneau-Montminy *et al.*, non publié). Cette réduction est équivalente, à environ 9 mg de zinc sous forme de sulfate.

Tableau 3 Equivalence entre phytase microbienne et zinc ajouté sous forme de sulfate dans un aliment pour porcelet à base de maïs et de tourteau de soja.^{1 2}

Phytase ajoutée [U / kg aliment]	Variation de P PhytNH [g]	Equivalence Zn [mg]	Equivalence Zn [mg] ³
250	-0.5	17	17
500	-0.8	34	32
750	-1.1	48	40
1000	-1.3	60	44

¹ Calculé à partir des équations présentées au tableau 2.

² Les teneurs en P phytique et en zinc natif sont respectivement de 2,5 g et 30 mg / kg, l'activité phytasique végétale est considérée comme nulle.

³ L'équation d'équivalence (Jondreville *et al.*, 2005) est : $Zn [mg] = 59,3 - 58 \cdot \exp(-0,00127 \cdot Phyt \text{ mic})$, avec Phyt mic, phytase microbienne [FTU].

4.2.2. Effet des phytates sur le zinc présent dans l'aliment chez le poulet

Dans notre expérimentation, nous avons observé un effet plus prononcé, sur la teneur en zinc de l'os, de la supplémentation en zinc (15 mg / kg) dans l'aliment sans phytase microbienne (+58%) que dans l'aliment avec phytase microbienne (+26%). Cette interaction, compte tenu de son sens, ne peut pas être interprétée comme le résultat d'un effet antagoniste des phytates sur le zinc supplémentaire. Nous l'avons considérée comme une sortie du domaine de linéarité de la réponse de la teneur en zinc de l'os à l'apport de zinc alimentaire : l'aliment contenant de la phytase microbienne et du zinc ajouté fournissait une quantité de zinc proche de celle qui permet de maximiser la teneur en zinc de l'os. Bien que nous ne puissions pas étayer notre raisonnement à partir de l'aliment P- pour cette espèce, nos observations suggèrent, comme chez le porc, un impact négligeable des phytates sur le zinc ajouté.

Par ailleurs, l'amélioration du statut en zinc due à la phytase microbienne est moins importante chez le poulet que chez le porc (respectivement pour l'aliment non supplémenté en zinc, 29% vs 128%). Ce résultat est bien en accord avec la littérature (Jondreville *et al.*, 2007a), mais en aucun cas, il ne peut être interprété comme une moindre efficacité de cette enzyme pour hydrolyser les phytates chez le poulet. En effet, l'usage de phytase microbienne dans l'alimentation du poulet permet, comme dans celle du porc, de réduire substantiellement les apports de phosphore sous forme de phosphates (Létourneau-Montminy *et al.*, 2010b). Selon Létourneau-Montminy *et al.* (2010b), Selle et Ravindran (2007 ; 2008) environ 40-50% des phytates peuvent être hydrolysés par 500 FTU chez les deux espèces. Dès lors, l'introduction d'une variable « P phytique non hydrolysé » comme nous l'avons proposé pour le porc paraît peu pertinente. Se pose alors la question de l'impact des phytates sur le zinc natif, à laquelle notre expérimentation ne répond pas, puisque les poulets n'ont pas consommé l'aliment P-. Nous avons donc eu recours, comme pour le porc, aux expérimentations portant sur l'évaluation de l'utilisation du zinc chez le poulet conduites à l'INRA selon un protocole proche de celui que nous avons mis en œuvre. Leur liste est donnée au tableau 4. Nous y avons ajouté les résultats obtenus par Linares *et al.* (2007), qui ont étudié l'impact de l'usage d'une variété d'orge de type « low phytate » sur la disponibilité du zinc dans des conditions expérimentales proches des nôtres.

Tableau 4 Descriptif des aliments expérimentaux testés lors des expérimentations conduites sur poulet à l'INRA entre 1999 et 2010 et par Linares *et al.* (2007).

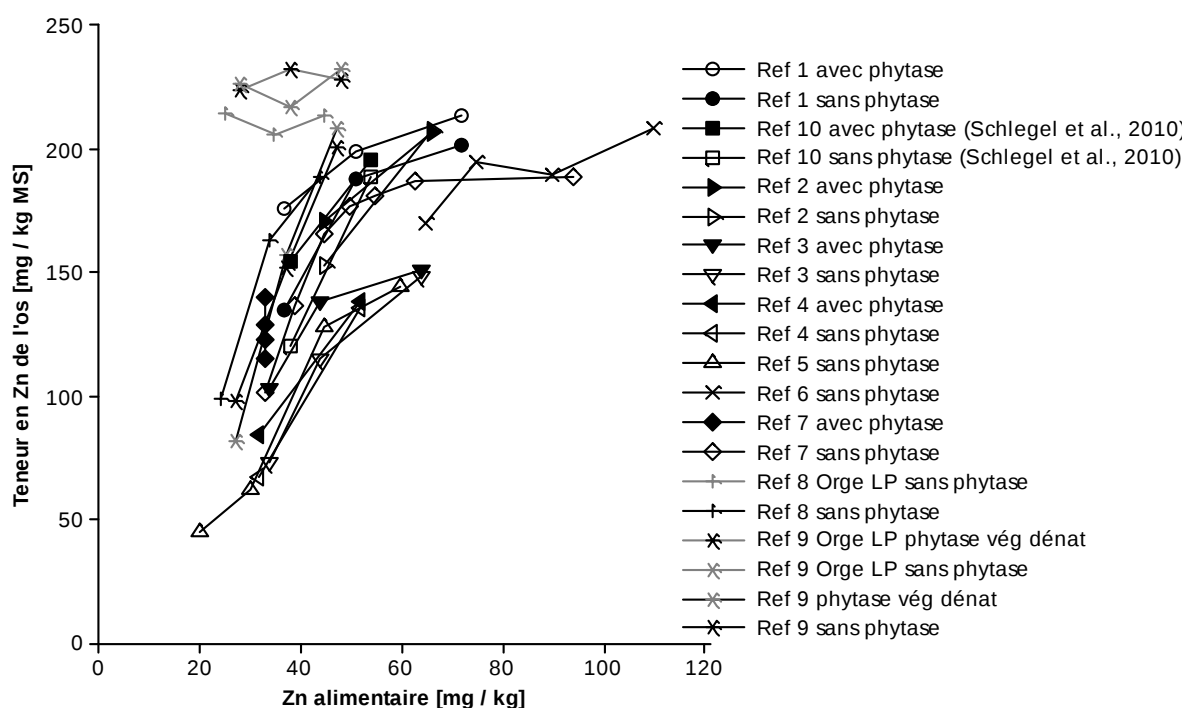
Référence	n° ref	Matières premières	P Phytique [g / kg]	Phytase végétale [U / kg]	Phytase microbienne [FTU / kg]	Zinc natif [mg / kg]	Zinc ajouté ¹ [mg / kg]
Mohanna et Nys (1999c)	1	Maïs / Tourteau de soja	2.4	40	0 800	37	0, 14, 35
Mohanna et Nys (1999b)	2	Maïs / Tourteau de soja / Isolat de soja / Son de blé chauffé	3.1	70	0 830	31	14, 35
Mohanna et Nys (1999c)	3	Maïs / Tourteau de soja / Isolat de soja / Son de blé chauffé	1.9	60	0 1310	34	0, 10, 30
Mohanna et Nys (1999b)	4	Blé / Tourteau de soja / Isolat de soja / Son de blé chauffé	2.0	110	0 480	22	10, 30
Mohanna et Nys (1999a)	5	Maïs / Tourteau de soja / Isolat de soja	1.9	ND	0	20	0, 10, 25, 40
Mohanna et Nys (1999a)	6	Maïs / Tourteau de soja / Isolat de soja	1.5	ND	0	25	40, 50, 65, 85
Jondreville et al. (2007)	7	Maïs / Tourteau de soja / Isolat de soja	2.4	40	0 280, 390, 660, 850	33	0, 6, 12, 17, 22, 30, 61 0
Linares et al. (2007)	8	Orge / Caséine / Glucose	1.4	110	0	24	0, 10, 20
		Orge LP / Caséine / Glucose	0.03	114	0	25	
Linares et al. (2007)	9	Orge / Caséine / Glucose	1.4	110 0	0	27	0, 10, 20
				114	0	28	
		Orge LP / Caséine / Glucose	0.03	0	0	28	
				0	0	28	
Schlegel et al. (2010)	10	Maïs / Tourteau de soja / Isolat de soja / Son de blé chauffé	2.3	201	0 487	38	0, 16

¹ Sulfate de zinc

Graphiquement (Figure 7), la représentation de la réponse de la teneur en zinc de l'os à l'apport alimentaire de zinc est moins facilement interprétable que chez le porcelet, en raison d'une variabilité entre expérimentations plus importante et surtout en raison de la proportion importante de traitements expérimentaux pour lesquels la teneur en zinc de l'os était

maximisée. A cet égard, il apparaît que les données qu'ont obtenues Linares *et al.* (2007) avec la variété d'orge « low phytate », si elles prouvent bien un effet négatif des phytates sur la disponibilité du zinc chez le poulet, ne peuvent être utilisées pour le quantifier, car la teneur en zinc de l'os était maximisée même sans supplémentation en zinc. L'absence de variabilité intra expérience de la teneur en zinc natif et en P phytique des aliments pour les données restantes ne nous permet pas d'évaluer leur impact sur la disponibilité du zinc.

Figure 7 Teneur en zinc de l'os chez le poulet de 21 jours en fonction de teneur en zinc d'aliment supplémentés ou non de zinc sous forme de sulfate – synthèse des résultats obtenus à l'INRA entre 1999 et 2010 et par Linares *et al.* (2007).¹



¹ Les caractéristiques des aliments pour chacune des références sont présentées au tableau 4.

Nous avons donc testé, conformément à la méthode décrite pour les porcelets sevrés (Chapitre 4.2.1), l'effet des caractéristiques suivantes de l'aliment sur la teneur en zinc de l'os : teneur en zinc ajouté sous forme inorganique (DZNI), activité phytasique végétale (Phytv), l'activité phytasique microbienne (Phytm). En plus de l'expérimentation, le modèle comprenait les variables suivantes : DZNI, $DZNI^2$, Phytv, Phytm, $Phytv \cdot DZNI$, $Phytm \cdot DZNI$, $Phytm^2$. Les résultats sont présentés au tableau 5.

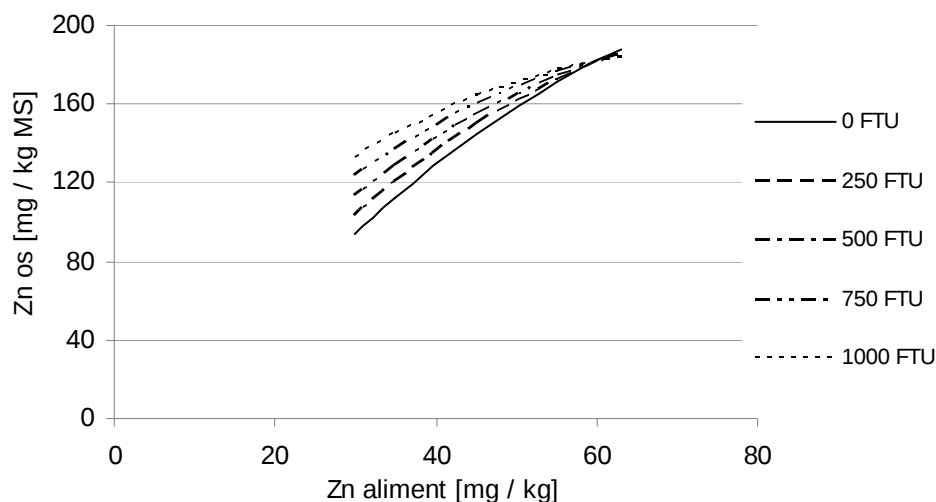
Tableau 5 Prédiction de la teneur en zinc de l'os de poulets de 21 jours [mg / kg MS] en fonction des teneurs en zinc natif [mg / kg aliment], zinc ajouté sous forme de sulfate [mg / kg aliment] et activités phytasiques végétale [100 U / kg aliment] et microbienne [100 FTU / kg aliment] de l'aliment.¹

	Coeff	Valeur P
Constante	94	< 0,001
Phytase végétale		NS
Phytase microbienne	3.94	< 0,001
Phytase microbienne * phytase microbienne		NS
Zn ajouté	3.91	< 0,001
Zn ajouté * Zn ajouté	-0.0320	< 0,001
Zn ajouté * Phytase végétale		NS
Zn ajouté * Phytase microbienne	-0.1321	0.004
R ²	0.88	
ETR	15.0	

¹ Les caractéristiques des aliments pour chacune des références sont présentées au tableau 4.

Ce modèle revient à calculer une équivalence entre phytase microbienne et zinc sous forme de sulfate d'environ 1,0 mg par 100 FTU pour un aliment sans zinc ajouté (Figure 8). La diminution de l'équivalence avec l'addition de zinc dans l'aliment n'est due qu'au plafonnement de la teneur en zinc de l'os. Cette valeur est équivalente à celle calculée dans l'expérience avec le n° de référence 7 (Jondreville *et al.*, 2007). En d'autres termes, d'après ces données, dans les aliments pour poulets, une équivalence pour le zinc libéré par la phytase microbienne de l'ordre de 5 mg de zinc sous forme de sulfate pour 500 FTU peut être prise en compte.

Figure 8 Prédiction¹ de la teneur en zinc de l'os de porcelets sevrés en fonction de la teneur en zinc² et de l'activité phytasique de l'aliment.³



¹ L'équation est présentée au tableau 5.

² La teneur en zinc natif de l'aliment est de 30 mg / kg.

³ Les caractéristiques des aliments pour chacune des références sont présentées au tableau 4.

Les régressions calculées sur porcelets et poulets indiquent que le zinc supplémenté est biodisponible et que celui-ci n'interagit pas avec les phytates présentes naturellement dans l'aliment. En dehors des expériences effectuées à l'INRA, Wedekind *et al.* (1992) ont obtenu par l'apport croissant de zinc alimentaire, une augmentation de la teneur en zinc tibiale du poulet similaire, lorsqu'un aliment semi-synthétique (exempt de phytates) et un aliment à base de maïs et de tourteau de soja ont été utilisés. Cela semble bien corroborer cette absence d'interaction entre phytate et zinc ajouté. Par contre, l'effet du zinc ajouté dans un aliment à base d'isolat de protéine de soja était moins important. L'antagonisme supposé de l'isolat de soja sur le zinc supplémenté pourrait être lié aux différentes méthodes de fabrication utilisées pour la précipitation de la fraction protéique du soja. Selon la méthode utilisée, le pH peut s'abaisser en dessous de 5. *In vitro*, les acides phytiques liés à Ca^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} et Cu^{2+} deviennent solubles à un pH inférieur à 4 – 5 (Kumar *et al.*, 2010). Le zinc lié aux phytates contenu dans le soja pourrait se libérer lors d'un procédé de fabrication des isolats avec des solutions acides. Si tel est le cas, ce type d'isolat de soja pourrait contenir des phytates permettant la liaison du zinc supplémenté lors de l'ingestion, semblable à l'effet des phytates de sodium. Les autres observations qui ont démontré une biodisponibilité réduite du zinc ajouté par l'antagonisme des phytates sont toutes basées sur des expériences effectuées à l'aide d'aliments qui contenaient des phytates ajoutés (O'Dell et Savage, 1960 ; Oberleas *et al.*, 1962 ; Rimbach et Pallauf, 1992 ; Rimbach *et al.*, 1995 ; Windisch et Kirchgessner, 1999a).

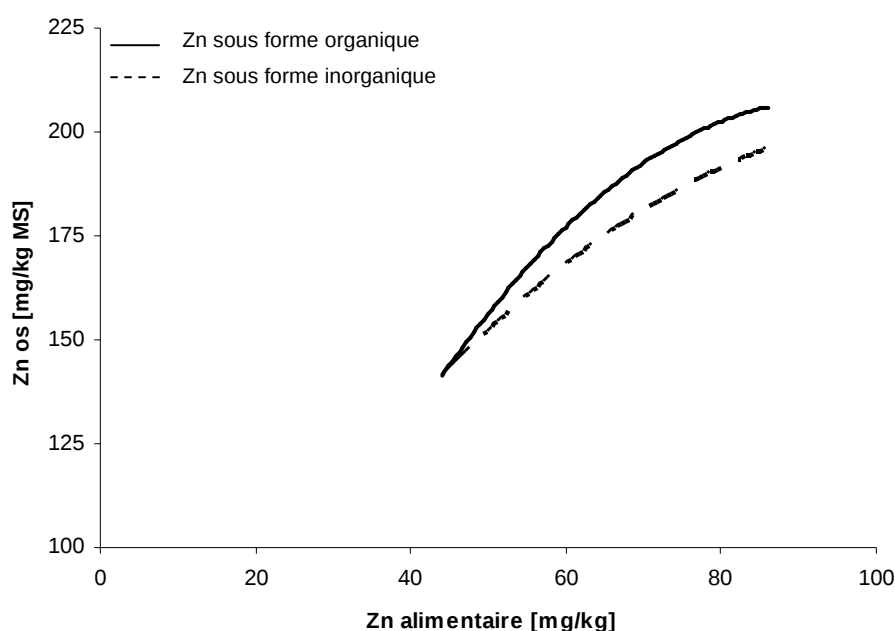
La suggestion que, l'ajout de phytate de sodium dans un aliment semi-synthétique puisse être un modèle adéquat pour étudier la biodisponibilité des sources de supplémentation en zinc chez les animaux de rente monogastrique (chapitre 3.3), s'avère finalement inapproprié.

4.2.3. Effet des sources de supplémentation en zinc sous forme organique

Lors de l'étude expérimentale présentée au chapitre 3.4, nous avons, indépendamment de l'aliment de base (P-, P+, P+ avec phytase microbienne), observé aucune amélioration du statut en zinc (teneur en zinc plasmatique, teneur en zinc de l'os) lorsque le sulfate de zinc est remplacé par la source de zinc sous forme organique (ZnGly). Les méta-analyses sur porcelets et sur poulets (chapitre 3.5) n'ont pas permis d'identifier une différence de la biodisponibilité du zinc entre les sources de zinc supplémentées sous forme organique et sous forme inorganique. La biodisponibilité comparable entre ces sources de zinc chez le poulet et le porcelet s'explique, sans doute, par l'absence d'interaction entre les phytates alimentaires et le zinc supplémenté dans des aliments à base de céréales et de tourteau d'oléagineux. Toutefois, quatre expériences ont rapporté une biodisponibilité relative du zinc améliorée sur la base de l'os avec une source sous forme organique ajoutée dans un aliment à base de céréales et d'oléagineux. Ces expériences ont été effectuées sur le poulet (Wedekind *et al.*, 1992 ; Swiatkiewicz *et al.*, 2001 ; Cao *et al.*, 2002 ; Ao *et al.*, 2006). Nous avons évalué la biodisponibilité relative du zinc sous forme organique sur la base de la teneur en zinc de l'os avec la même démarche statistique que celle décrite au chapitre 3.5. Les données de Ao *et al.* (2006) n'ont pas pu être prises en compte, car le zinc tibial n'est exprimé qu'en mg par os. La prise en compte des variables DZNI, DZNO, DZNI² et DZNO² avec l'expérience introduite dans le modèle, la teneur en zinc de l'os équivaut à : $\text{Zn os [mg / kg MS]} = 141 (P < 0.001) + 1.920 * \text{DZNI} (P = 0.002) + 2.681 * \text{DZNO} (P < 0.001) - 0.0146 * \text{DZNI}^2 (P = 0.17) - 0.0271 * \text{DZNO}^2 (P = 0,005), R^2 = 0,78, \text{ETR} = 12.26$ (Figure 9). La biodisponibilité relative de DZNO est de 126%, mais les variables DZNO et DZNO² ne sont pas différentes de, respectivement, DZNI (P = 0,16) et DZNI² (P = 0,26). Finalement, nous avons cherché, dans chacune de ces trois expériences, la ou les raisons qui ont menés les auteurs à la conclusion d'une biodisponibilité relative améliorée de la source de zinc sous forme organique. Swiatkiewicz *et al.* (2001) ont conclu, sur la base de la teneur en zinc de l'os, que la biodisponibilité relative du zinc sous forme organique est améliorée de, respectivement, 114 et 130% dans un aliment à base de blé et de tourteau de soja, avec ou sans phytase microbienne. Toutefois, la concentration de zinc de l'os se situe au niveau du plateau lorsque l'aliment est supplémenté en zinc et elle ne diffère pas significativement entre les deux sources étudiées. Chez Cao *et al.* (2002), les pentes de régression de la teneur en zinc de l'os, en fonction de la teneur en zinc alimentaire, ne diffèrent pas

significativement entre les deux sources sous forme organiques et celle sous forme inorganique. Les auteurs n'ont pas indiqué si les biodisponibilités relatives rapportées de 78 et de 116% étaient significativement différent de 100%. En outre, les poulets qui ont été nourri avec la source la plus biodisponible (116%), ont consommé 5% d'aliment en plus que les autres ($P < 0.05$). Wedekind *et al.* (1992) n'indiquent pas si les concentrations en zinc de l'os diffèrent entre sources de zinc selon leur niveau d'apport. La biodisponibilité relative du zinc (206%) est, comme celle de Ao *et al.* (2006), basée sur la teneur en zinc du tibia [mg / tibia]. Calculé sur la teneur en de zinc du tibia par kg de matière sèche, la biodisponibilité relative proposée par Wedekind *et al.* (1992) serait plus faible, car le rapport des deux unités n'est pas toujours identique entre les traitements avec le même niveau de zinc supplémenté. Ces explications nous permettent de relativiser les valeurs de biodisponibilité des sources organiques publiées de respectivement 78, 116, 130 et 206%.

Figure 9 Effet de la source et du niveau d'apport de zinc dans un aliment à base de maïs et de tourteau de soja, sur la concentration de zinc dans l'os chez le poulet (d'après Wedekind *et al.*, 1992 ; Swiatkiewicz *et al.*, 2001 ; Cao *et al.*, 2002).



Nos données indiquent que ZnGly est mieux absorbé que ZnSO_4 pour autant, qu'il y ait du phosphore phytique libre dans l'aliment. Dans les aliments à base de céréales et de tourteau d'oléagineux, les statuts en zinc du poulet et du porcelet ne dépendent pas de l'interaction entre le zinc supplémenté et l'aliment de base différencié par sa teneur en phosphore phytique. Cette absence d'antagonisme entre les phytates alimentaires et le zinc supplémenté chez le poulet et le porc, est probablement la raison principale qui fait que le zinc des sources sous forme organique ne soit pas mieux biodisponible que celui des formes

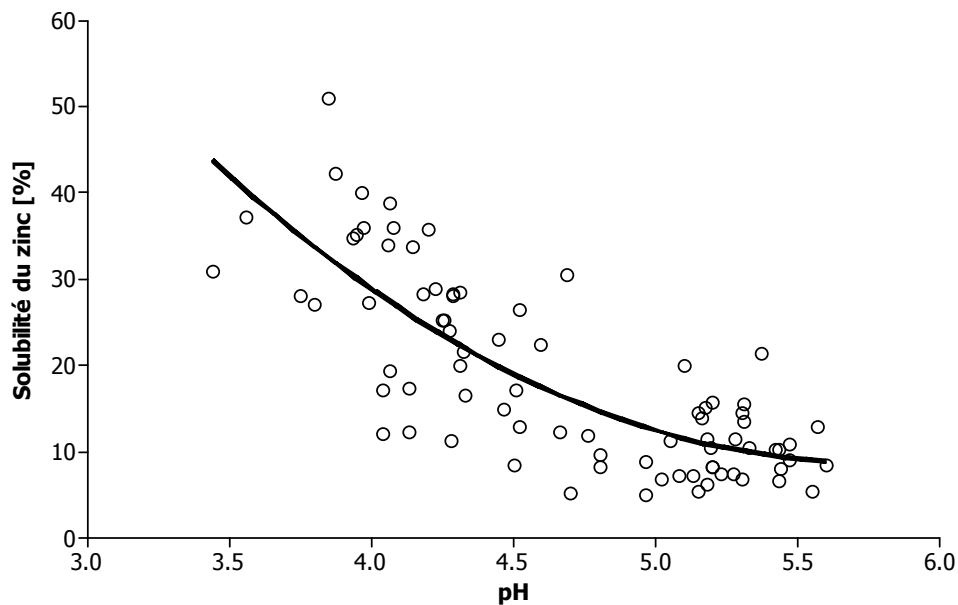
sulfates. Ainsi l'avantage potentiel de biodisponibilité de ZnGly par rapport à ZnSO₄ ne peut être exprimé sur l'animal nourri avec ces aliments. Le manque de corrélation observé par Cao *et al.* (2000) et Huang *et al.* (2009) entre l'intégrité des sources de zinc sous forme organique et leur biodisponibilité du poulet s'expliquerait également, par le manque d'interaction entre phytates alimentaires et zinc supplémenté.

4.3. Intérêt de la comparaison entre poulet et porcelet

L'intérêt de la comparaison entre deux espèces (poulet et porc) permet de préciser les connaissances sur l'effet des conditions physicochimiques du tube digestif sur la biodisponibilité du zinc alimentaire.

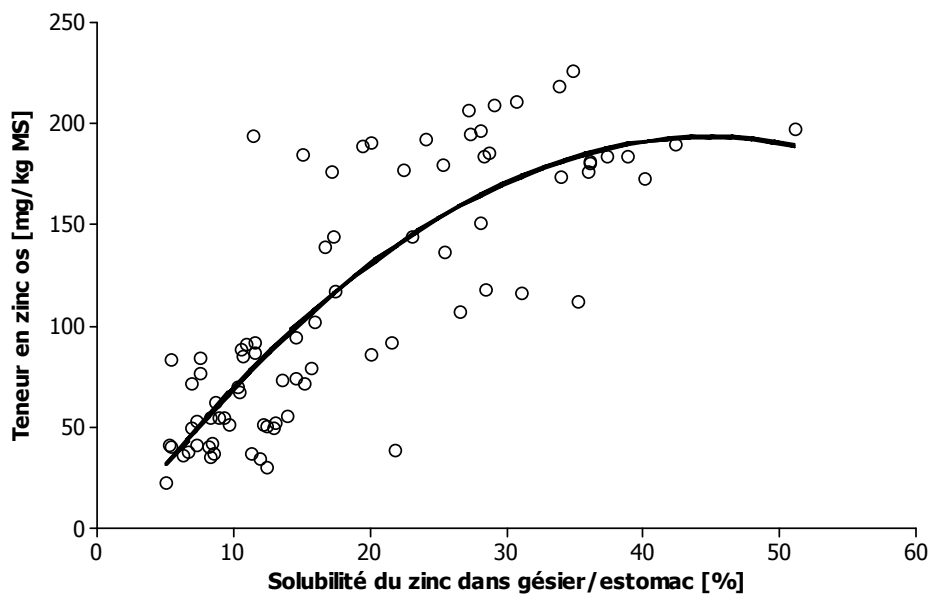
Dans l'expérience menée conjointement sur poulet et porcelet (chapitre 3.4), en plus des indicateurs du statut en zinc, nous avons abordé les phénomènes digestifs sous jacents en mesurant la solubilité du zinc dans l'estomac et dans l'intestin. Bien que l'intestin, et non l'estomac ou le gésier, soit le site d'absorption du zinc, la solubilité du zinc alimentaire (Zn_{sol}) mesurée au niveau gastrique chez les deux espèces était la mieux corrélée au niveaux de l'acidité du milieu (Figure 10) et aux indicateurs du statut en zinc (Figure 11). Cette absence de corrélation avec la solubilité mesurée dans l'intestin pourrait être liée aux artefacts dus aux conditions de prélèvement. Chez le poulet, en particulier, pour obtenir suffisamment de matériel, nous avons dû collecter les digesta contenus sur l'ensemble de l'intestin grêle. Les conditions physico-chimiques n'étaient peut-être pas celles rencontrées à proximité des sites d'absorption qui se situent dans la partie proximale de l'intestin, surtout chez des animaux en subcarence où l'absorption active est stimulée. Cependant, il semble bien que, pour les cations divalents, la biodisponibilité soit conditionnée par la phase gastrique. Des études menées pour évaluer la disponibilité de métaux lourds, tels que le plomb ou le cadmium, montrent que la disponibilité mesurée *in vivo* chez le monogastrique est bien corrélée avec la phase gastrique de tests *in vitro*, qui consiste en un abaissement du pH, et très peu avec la phase dites intestinale au cours de laquelle le pH remonte (Wang *et al.*, 2007). De même, dans le modèle du métabolisme phosphocalcique de Létourneau-Montminy (2009), le flux absorbé de calcium est conditionné par sa solubilisation dans le milieu gastrique chez le porc et le poulet.

Figure 10 Solubilité du zinc dans le gésier et l'estomac en fonction du pH du milieu¹ (d'après données brutes du chapitre 3.4).



$$^1 \text{Zn}_{\text{sol}} [\%] = 225.9 - 75.53 * \text{pH} + 6.571 * \text{pH}^2; R^2 = 0.62; P < 0.001.$$

Figure 11 Teneur en zinc de l'os du poulet et du porcelet en fonction de la solubilité du zinc dans le gésier / estomac¹ (d'après données brutes du chapitre 3.4).



$$^1 \text{Zn os} [\text{mg} / \text{kg MS}] = -12.60 + 9.199 * \text{Zn}_{\text{sol}} - 0.1027 * \text{Zn}_{\text{sol}}^2; R^2 = 0.67; P < 0.001.$$

Sous réserve des trois facteurs évoqués dans le chapitre 3.4, qui peuvent limiter l'interprétation des résultats, ces données confortent l'idée que la biodisponibilité du zinc dépend de sa solubilité (Susaki *et al.*, 1999), qui elle, dépend du pH du milieu (Cao *et al.*; 2000, Jongbloed *et al.*, 2002). Nos données suggèrent que le pH acide du gésier doit être suffisamment bas pour permettre, du moins partiellement, la solubilisation du zinc lié aux phytates qui est rapidement absorbé au niveau proximal de l'intestin grêle. En 1963 déjà, Lease a étudié, *in vitro*, la présence de zinc et de P phytique dans les fractions solubles et précipités de tourteau de soja préalablement digéré, à l'aide de pepsine dans un milieu à pH 3, puis tamponné à pH 6,8. Le part de zinc et de P phytique présent dans la fraction soluble du digesta était respectivement de 66 et de 37%. Cette simulation de digestion d'un tourteau de soja par le poulet est conforme à nos résultats, ce qui suggère que le zinc se dissocie des phytates au niveau du gésier du poulet. Le porc ne serait pas à même de libérer le zinc des phytates alimentaires, car le pH gastrique n'est pas assez bas. Ainsi, l'apport croissant de phytates alimentaires réduit la solubilité du zinc végétal chez le porc (de 12,4 à 7,4% avec respectivement P- et P+ non supplémenté en zinc) et l'hydrolyse des phytates par la phytase microbienne l'augmente (de 7,4 à 12,1% avec respectivement P+ et P+/ENZ non supplémenté en zinc). Chez le poulet, la phytase microbienne hydrolyse des phytates alimentaires exempte, du moins partiellement, de zinc ne permettant ainsi aucune amélioration de la solubilité du zinc alimentaire (26,5 à 26,8% avec, respectivement P+ et P+/ENZ non supplémenté en zinc). Ceci expliquerait l'équivalence zinc sous forme de sulfate huit fois moins élevée de la phytase microbienne (500 FTU / kg d'aliment) chez le poulet par rapport au porcelet (Jondreville *et al.*, 2005 ; 2007).

Wedekind *et al.* (1992 ; 1994a) ont rapporté une biodisponibilité relative améliorée des sources de zinc sous forme organique chez le poulet, mais pas chez le porc. Ces auteurs (Wedekind *et al.*, 1994b) suggèrent que la différence entre espèces provient du calcium, qui renforce les liaisons phytates-zinc (Oberleas *et al.*, 1966) et favoriserait ainsi l'expression de la protection des sources organiques de zinc chez cette espèce. Le calcium est effectivement présent plus abondamment dans l'aliment poulet par rapport à l'aliment porc (11 vs. 7 g / kg ; Wedekind *et al.*, 1992 ; 1994a). Dans l'expérience décrite sous le chapitre 3.4, le niveau de calcium alimentaire est identique (14 g / kg, aliment P+) chez les deux espèces, mais la solubilité du zinc au niveau du gésier et de l'estomac et la biodisponibilité du zinc varie entre traitements et espèces indépendamment de la source de zinc utilisée. Le calcium alimentaire ne peut donc être l'origine d'un effet sur la biodisponibilité du zinc. Les données ne confirment donc pas la suggestion de Wedekind *et al.* (1994b).

5. Conclusions générales

La synthèse bibliographique que nous avons produite a permis de faire le point, sur les facteurs principaux qui influencent la biodisponibilité du zinc chez l'animal monogastrique. Elle a permis de mieux connaître les possibilités de caractérisation et d'identification des sources de zinc sous forme organique, et de faire le point sur le marché et les approches utilisées par les industriels de l'alimentation animale pour l'utilisation de ces produits. La caractérisation des sources reste souvent succincte et aucune méthode *in vitro* ne semble actuellement apte à prédire la disponibilité mesurée *in vivo*. Par ailleurs, le protocole des expérimentations *in vivo* menées ne permet souvent pas de soutenir les arguments utilisés pour vanter les avantages de ces sources dans l'alimentation des porcs et des poulets. En particulier, le terme biodisponibilité est très souvent galvaudé.

L'approche expérimentale que nous avons adoptée, utilisant différents modèles de phytates et différents modèles animaux nous a permis de mieux comprendre la nature de l'interaction entre zinc alimentaire et phytates.

Tout d'abord, notre expérimentation sur rats, qui montre une amélioration de l'absorption de zinc sous forme de glycinate par rapport au sulfate en présence de phytate de sodium, suggère bien une protection, du moins partielle, de la forme organique contre cet antagoniste. Cependant, la non confirmation de cet avantage dans nos expériences sur porcelets et poulets indique que ce modèle de phytates, facilement ionisables, n'est pas apte à décrire le comportement du zinc alimentaire lorsque des matières premières d'origine végétale sont présentes dans l'aliment. L'analyse quantitative de la littérature que nous avons conduite confirme que l'amélioration possible de la biodisponibilité du zinc par l'usage de sources organiques de zinc dans l'alimentation des porcs et des poulets semble mince.

La comparaison entre porcelets et poulet a été riche en informations. Tout d'abord, nous confirmons l'effet important de la phytase microbienne chez le porc par rapport au poulet. Chez les deux espèces, cette enzyme, qui hydrolyse les phytates, favorise la libération du zinc qui y était lié dans les matières premières, mais n'agit pas sur le zinc ajouté. Cependant il semble bien que le poulet soit capable, à la faveur d'un pH gastrique plus faible que le porc, de valoriser le zinc issu des matières premières d'origine végétale, initialement liés aux phytates. En d'autres termes, chez le porc, l'hydrolyse des phytates est indispensable à la valorisation d'une partie du zinc issu des matières premières d'origine végétale, mais pas chez le poulet chez qui le zinc initialement lié aux phytates pourrait être libéré sans que l'hydrolyse enzymatique soit nécessaire. La marge de progrès possible par l'usage de phytase microbienne est donc plus importante chez le porc que chez le poulet. Ce résultat est cohérent avec les moindres besoins en zinc alimentaire, chez le poulet que chez le porc. Surtout, nos résultats confirment l'absence d'interaction entre phytates et zinc ajouté, même s'il est sous forme de sulfate. Ce résultat fragilise nettement l'hypothèse communément

admise selon laquelle les sources organiques de zinc seraient moins sujettes que les sources inorganiques à la formation de complexes insolubles avec les phytates de la ration. Ces composés étant identifiés comme les principaux antagonistes alimentaires du zinc, il semble donc illusoire de mettre en évidence un avantage significatif de sources organiques de zinc lié à une interaction alimentaire. Reste la piste de la meilleure absorption que nous n'avons pas explorée, mais qui semble assez fragile, selon notre revue de la littérature.

En ce qui concerne la mise en place de stratégies à même de réduire les rejets de zinc par la voie alimentaire (réduction des marges de sécurité), la limitation de la teneur en phytates alimentaires ou leur hydrolyse semblent donc plus appropriée que la protection du zinc ajouté. Nous confirmons que l'usage de phytase microbienne offre des possibilités importantes chez le porc, d'autant plus que cette enzyme est couramment utilisée pour limiter les rejets de phosphore. Reste à introduire dans les matrices de formulation une équivalence entre zinc et phytase, comme le suggèrent Jondreville *et al.* (2005). Cependant, la prédiction du statut en zinc à partir de ces équivalences ne vaut que pour des aliments à base de maïs et de tourteau de soja. Le modèle que nous proposons en discussion, qui fait intervenir la grandeur « P phytique non hydrolysé », est plus général car il peut s'appliquer à un panel plus vaste d'aliments. Il mérite cependant d'être consolidé par d'autres expériences. En particulier, l'impact de la réduction des phytates alimentaires par l'usage de céréales dites « low phytates » reste à évaluer. De même, la valorisation du zinc par les phytases végétales pourrait être d'avantage explorée. L'utilisation d'acides alimentaires, menant à une réduction du pH gastrique, représente un potentiel d'amélioration de la biodisponibilité du zinc alimentaire, peu étudié à ce jour. De plus, l'alimentation sous forme liquide (soupes), favorable à une hydrolyse des phytates, avant ingestion, mérite d'être étudiée dans le cadre de la recherche de voies d'amélioration de la biodisponibilité du zinc chez le porc.

La capacité naturelle du poulet à valoriser le zinc issu des matières premières d'origine végétale limite la marge de progrès. Nous proposons la prise en compte d'un équivalent phytase microbienne d'environ 1 mg de zinc sous forme de sulfate par 100 FTU. Cependant, dans un aliment à base de maïs et de tourteau de soja sans phytase ajoutée contenant 65 mg Zn / kg, le coefficient de rétention de zinc peut atteindre 20% (Mohanna et Nys, 1999a). Chez le porc, cette valeur ne peut être atteinte que lorsque l'aliment contient de la phytase (Revy, 2003).

6. Références bibliographiques

- van der Aar PJ, Fahey GC, Ricke SC, Allen SE and Berger LL 1983. Effects of dietary fibers on mineral status of chicks. *Journal of nutrition* 113, 653-661.
- Adeola O 1995. Digestive utilization of minerals by weanling pigs fed copper- and phytase-supplemented diets. *Canadian Journal of Animal Science* 75, 603-610.
- Agroscope 1994. Apports alimentaires recommandés et tables de la valeur nutritive des aliments pour les porcs.
- Ammerman CB, Baker DH and Lewis AJ 1995. Bioavailability of nutrients for animals. Amino acids, minerals and vitamins. Academic Press, San Diego, United States of America.
- Andreini C, Banci L and Bertini I 2006. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *Journal of Proteome Research* 5, 196-201.
- Ao T, Pierce JJ, Power R, Dawson KA, Pescatore AJ, Cantor AH and Ford MJ 2006. Evaluation of Bioplex Zn as an organic zinc source for chicks. *International Journal of Poultry Science* 5, 808-811.
- Ao T, Pierce JL, Pescatore AJ, Cantor AH, Dawson KA, Ford MJ and Shafer BL 2007. Effects of organic zinc and phytase supplementation in a maize-soybean meal diet on the performance and tissue zinc content of broiler chicks. *British Poultry Science* 48, 6, 690-695
- Aoyagi S and Baker DH 1993. Nutritional evaluation of copper-lysine and zinc-lysine complexes for chicks. *Poultry Science* 72, 165-171.
- Arbeitsgemeinschaft für Wirkstoffe in der Tierernährung (AWT) 2004. Markt für Futterzusatzstoffe in Deutschland. <http://www.awt-feedadditives.de/Markt.11.0.html> (accédé le 01.06.2006).
- Arnaud J and Favier A 1991. Le zinc. In *Les oligoéléments en médecine et biologie*, (ed Chappuis), pp. 344–348, Editions Tec et Doc Lavoisier, Paris, France.
- Ashida KY, Matsui T, Itoh J, Yano H and Nakajima T 2000. Zinc distribution in the small-intestinal digesta of pigs fed skim milk powder or defatted soybean flour. *Biological Trace Element Research* 74, 31-40.
- Ashmead HD, Graff DJ and Ashmead HH 1985. A secondary intestinal pathway for absorption of dipeptide-like amino acid chelates. In *Intestinal Absorption of Metal Ions and Chelates*. (ed CT Thomas), pp. 113–123, Springfield, United States of America.
- Association of American Feed Control Officials 2001. Official publication. Atlanta, United States of America.
- Bao SF, Windisch W and Kirchgessner M 1997. Ca bioavailability of different organic and inorganic calcium sources (citrate, lactate, acetate, oyster shell, β -tri-Ca-phosphate). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 78, 154-160.

Bao YM, Choct M, Iji PA and Bruerton K 2007. Effect of organically complexed copper, iron, manganese and zinc on broiler performance, mineral excretion, and accumulation in tissues. *Journal of Applied Poultry Research* 16, 448-455.

Bartlett JR and Smith MO 2003. Effects of different levels of zinc on the performance and immunocompetence of broilers under heat stress. *Poultry Science* 82, 1580-1588.

Bertrand G and Bhattacharjee RC 1934. L'action combinée du zinc et des vitamines dans l'alimentation des animaux. *Compte Rendu de l'Académie des Sciences* 198, 1823-1827.

Beutler KT, Pankewicz O and Brautigan DL 1998. Equivalent uptake of organic and inorganic zinc by monkey kidney fibroblasts, human intestinal cells, or perfused mouse intestine. *Biological Trace Element Research* 61, 19-31.

Biehl RR, Baker DH and de Luca HF 1995. α -Hydroxylated cholecalciferol compounds act additively with microbial phytase to improve phosphorus, zinc and manganese utilization in chicks fed soy-based diets. *The Journal of Nutrition* 125, 2407-2416.

Brenes A, Viveros A, Arija I, Centeno C, Pizarro M and Bravo C 2003. The effect of citric acid and microbial phytase on mineral utilization in broiler chicks. *Animal Feed Science and Technology* 110, 201-219.

Brethour JR 1984. Zinc methionine in steer finishing rations. Report of Progress N° 452, 11. Hays Branch, Kansas State University, United States of America.

Brown TF and Zeringue LK 1994. Laboratory evaluations of solubility and structural integrity of complexed and chelated trace mineral supplements. *Journal of Dairy Science* 77, 181-189.

Buff CE, Bollinger DW, Ellersieck MR, Brommelsiek WA and Veum TL 2005. Comparison of growth performance and zinc absorption, retention, and excretion in weanling pigs fed diets supplemented with zinc-polysaccharide or zinc oxide. *Journal of Animal Science* 83, 2380-2386.

Burrell AL, Dozier WA, Davis AJ, Compton MM, Freeman ME, Vendrell PF and Ward TL 2004. Responses of broilers to dietary zinc concentrations and sources in relation to environmental protection. *British Poultry Science* 45, 255-263.

Cao J, Henry PR, Guo R, Holwerda RA, Toth JP, Littell RC, Miles RD and Ammerman CB 2000. Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic zinc sources for poultry and ruminants. *Journal of Animal Science* 78, 2039-2054.

Cao J, Henry PR, Davis SR, Cousins RJ, Miles RD, Littell RC and Ammerman CB 2002. Relative bioavailability of organic zinc sources based on tissue zinc and metallothionein in chicks fed conventional dietary zinc concentrations. *Animal Feed Science and Technology* 101, 161-170.

Carlson D, Sehested J and Poulsen HD 2006. Zinc reduces the electrophysiological responses in vitro to basolateral receptor mediated secretagogues in piglet small intestinal epithelium. *Comprehensive Biochemistry and Physiology* 144, 514-519.

Carlson D, Sehested J, Feng Z and Poulsen HD 2007. Zinc is involved in regulation of secretion from intestinal epithelium in weaned piglets. *Livestock Science* 108, 45-48.

Carlson MS, Hill GM and Link JE 1999. Early- and traditionally weaned nursery pigs benefit from phase-feeding pharmacological concentrations of zinc oxide: effect on métallothionéine and mineral concentrations. *Journal of Animal Science* 77, 1199-1207.

Carlson MS, Boren CA, Wu C, Huntington CE, Bollinger DW and Veum TL 2004. Evaluation of various inclusion rates of organic zinc either as polysaccharide or proteinate complex on the growth performance, plasma, and excretion of nursery pigs. *Journal of Animal Science* 82, 1359-1366.

Case CL and Carlson MS 2002. Effect of feeding organic and inorganic sources of additional zinc on growth performance and zinc balance in nursery pigs. *Journal of Animal Science* 80, 1917-1924.

Charbonneau E, Pellerin D, Oetzel GR 2006. Impact of lowering dietary cation–anion differences in nonlactating dairy cows: a meta-analysis. *Journal of Dairy Science* 89, 537–548.

Cheng J, Kornegay ET and Schell TC 1998. Influence of dietary lysine on the utilization of zinc from zinc sulfate and a zinc-lysine complex by young pigs. *Journal of Animal Science* 76, 1064-1074.

Chesters JK 1997. Zinc. In *Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements* (eds BL O'Dell and RA Sunde), pp. 185-230. Marcel Dekker, New York, United States of America.

Conseil Fédéral 2009. Crise alimentaire et pénurie de matières premières et de ressources. <http://www.blw.admin.ch/themen/00546/index.html?lang=fr> (accédé 19.08.2009).

Cox DH and Hale OM 1977. Liver iron depletion without copper loss in swine fed excess zinc. *Journal of Nutrition* 77, 225-228.

Cragg RA, Phillips SR, Piper JM, Varma JS, Campbell FC, Mathers JC and Ford D 2005. Homeostatic regulation of zinc transporters in the human small intestine by dietary zinc supplementation. *Gut* 54, 469-478.

Creech BL, Spears JW, Flowers WL, Hill GM, Lloyd KE, Armstrong TA and Engle TE 2004. Effect of dietary trace mineral concentration and source (inorganic vs. chelated) on performance, mineral status, and fecal mineral excretion in pigs from weaning through finishing. *Journal of Animal Science* 82, 2140-2147.

Davies NT 1980. Studies on the absorption of Zn by the rat intestine. *British Journal of Nutrition* 43, 189-203.

Davies NT and Nightingale R 1975. Effects of phytate on intestinal-absorption and secretion of zinc, and whole-body retention of Zn, copper, iron and manganese in rats. *The British Journal of Nutrition* 34, 243–258.

Davis SR, McMahon RJ and Cousins RJ 1998. Metallothionein knockout and transgenic mice exhibit altered intestinal processing of zinc with uniform zinc-dependent zinc transporter-1 expression. *Journal of Nutrition* 128, 825-831.

Davis SR and Cousins RJ 2000. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *Journal of Nutrition* 130, 1085-1088.

Dewar WA, Wright PAL, Pearson RA and Gentle MJ 1983. Toxic effects of high concentrations of zinc oxide in the diet of the chick and laying hen. *British Poultry Science* 24, 397-404.

Dintzis FR, Laszlo JA, Nelsen TC, Baker FL and Calvert CC 1995. Free and total ion concentrations in pig digesta. *Journal of Animal Science* 73, 1138-1146.

Dourmad JY and Jondreville C 2007. Impact of nutrition on nitrogen, phosphorus, Cu and Zn in pig manure, and on emissions of ammonia and odours, *Livestock Science* 112, 192-198.

Dourmad JY and Jondreville C 2008. Improvement of balance of trace elements in pig farming systems. In *Trace elements in animal production systems* (eds P Schlegel, S Durosoy and AW Jongbloed), pp. 139-143. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

Downs KM, Hess JB, Macklin KS and Norton RA 2000. Dietary zinc complexes and vitamin E for reducing cellulitis incidence in broilers. *Journal of Applied Poultry Research* 9, 319-323.

Dozier WA, Davis AJ, Freeman ME and Ward TL 2003. Early growth and environmental implications of dietary zinc and copper concentrations and sources of broiler chicks. *British Poultry Science* 44, 726-731.

Eeckhout W and de Paepe M 1992. Phytase de blé, phytase microbienne et digestibilité apparente du phosphore d'un aliment simple pour porcelets. *Revue de l'Agriculture* 45, 195-207.

Eeckhout W and de Paepe M 1994. Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology* 47, 19-29.

Ellis R, Morris ER and Hill DA, 1982. Bioavailability to rats of iron and zinc in calcium-iron-phytate and calcium-zinc-phytate complexes. *Nutrition Research* 2, 319-322.

Engelen AJ, van der Heeft FC, Randsdorp PHG and Smit ELC 1994. Simple and rapid determination of phytase activity. *Journal of AOAC International* 77, 760-764.

European Community 1988. Commission Directive 88/485/EEC of 26 July 1988 amending the Annex to Council Directive 82/471/EEC concerning certain products used in animal nutrition. *Official Journal of the European Union*, 3 August 1988, L239/36-39.

European Community 2003. Commission regulation (EC) no. 1334/2003 of 25 July 2003 amending the conditions for authorisation of a number of additives in feedingstuffs belonging to the group of trace elements. *Official Journal of the European Union*, 26 July 2003, L187/11-15.

European Community 2006. Commission regulation (EC) no. 479/2006 of 23 March 2006 as regards to the authorisation of certain additives belonging to the group compounds of trace elements. Official Journal of the European Union, 23 March 2006, L86/4-7.

European Community 2009. Commission regulation (EC) no. 888/2009 of 25 September 2009 concerning the authorisation of Zinc chelate of hydroxy analogue of methionine as a feed additive for chickens for fattening. Official Journal of the European Union, 25 September 2009, L254/71-72.

Fairweather-Tait SJ 1992. Bioavailability of trace elements. Food Chemistry 43, 213-217.

Food and Agriculture Organization 2002. World agriculture: towards 2015 / 2030.

Feng J, Ma WQ, Niu HH, Wu XM and Wang Y 2010. Effects of zinc glycine chelate on growth, hematological, and immunological characteristics in broilers. Biological Trace Element Research 133, 203-211.

Feng Z, Carlson D and Poulsen HD 2006. Zinc attenuates forskolin-stimulated electrolyte secretion without involvement of the enteric nervous system in small intestinal epithelium from weaned piglets. Comparative Biochemistry and Physiology 145, 328-333.

Le Floc'h N, Jondreville C, Matte JJ and Seve B 2006. Importance of sanitary environment for growth performance and plasma nutrient homeostasis during the post-weaning period in piglets. Archives of Animal Nutrition 60, 23-34.

Fordyce EJ, Forbes RM, Robbins KR and Erdman JW 1987. Phytate x calcium / zinc molar ratios: Are they predictive of zinc bioavailability? Journal of Food Science 52, 440-444.

Fraker PJ, King LE and Laakko T 2000. The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. Journal of Nutrition 130, 1399-1406.

Frapin D 1996. Valorisation du phosphore phytique végétal chez l'oiseau: intérêt et mode d'action des phytases végétales et microbiennes. Thèse déposée à l'Ecole Nationale Agronomique de Rennes.

Gallaher DD, Gallaher CM, Shulman S, Mc Elhome A, Brokken KA and Shurson G 2000. Bioavailability of different sources of protected zinc. Trace Elements in Man and Animals 10 293-297.

Gebert S, Wenk C and Messikommer R 2002. Different zinc sources in the diet for broiler. In Schriftreihe aus dem Institut für Nutztierwissenschaften, Ernährung-Produkte-Umwelt. (eds M Kreuzer, C Wenk, T Lanzini) pp. 212-215. ETH Zürich, Zürich, Suisse.

Gesellschaft für Ernährung 2003. Ausschuss für Bedarfsnormen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie. Energie- und Nährstoffbedarf landwirtschaftlicher Nutztiere; Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Legehennen und Masthühner (Broiler). 7, DLG-Verlag, Frankfurt, Deutschland.

Gesellschaft für Ernährung 2006. Ausschuss für Bedarfsnormen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie. Energie- und Nährstoffbedarf landwirtschaftlicher Nutztiere; Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von Schweinen. DLG-Verlag GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland.

Mc Grath SP, Chaudri AM, Giller KE 1995. Long term effects of metals in sewage sludges on soils, microorganisms and plants. *Journal of Industrial Microbiology* 14, 90-104.

Hahn JD and Baker DH 1993. Growth and plasma zinc responses of young pigs fed pharmacologic levels of zinc. *Journal of Animal Science* 71, 3020-3024.

Hansen SL, Trakooljul N, Liu HC, Moeser AJ and Spears JW 2009. Iron transporters are differentially regulated by dietary iron, and modifications are associated with changes in manganese metabolism in young pigs. *Journal of Nutrition* 139, 1474-1479.

Hauter U 1994. Zinc and further mineral retention in broilers fed increasing levels of zinc and microbial phytase. Thesis. Justus-Liebig Universität. Giessen, Deutschland.

Hedeman MS, Jensen BB and Poulsen HD 2006. Influence of dietary zinc and copper on digestive enzyme activity and intestinal morphology in weaned pigs. *Journal of Animal Science* 84, 3310-3320.

Heinrichs AJ and Conrad HR 1983. Rumen solubility and breakdown of metal proteinate compounds. *Journal of Dairy Science* 66, Supplement 1, 147 (abstract).

Helle N and Kampf D 2008. The use of the protein hydrolisation degree as analytical possibility to differentiate trace element chelates of amino acids. In *Trace elements in animal production systems* (eds P Schlegel, S Durosoy and AW Jongbloed), pp. 247-249. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

Hempe JM and Cousins RJ 1989. Effect of EDTA and zinc-methionine complex on zinc absorption by rat intestine. *Journal of Nutrition* 119, 1179-1187.

Henry PR, Ammerman CB and Miles RD 1987. Effect of dietary zinc on tissue mineral concentration as a measure of zinc bioavailability in chicks. *Nutritional Reports International* 35, 15-23.

van Heugten E, Spears JW, Kegley EB, Ward JD and Qureshi MA 2003. Effects of organic forms of zinc on growth performance, tissue zinc distribution and immune response of weanling pigs. *Journal of Animal Science* 81, 2063-2071.

Hill BE, Sutton AL and Richert BT 2009. Effects of low-phytic acid corn, low phytic acid soybean meal, and phytase on nutrient digestibility and excretion in growing pigs. *Journal of Animal Science* 87, 1518-1527.

Hill DA, Peo ER, Lewis AJ and Crenshaw JD 1986. Zinc-amino acid complexes for swine. *Journal of Animal Science* 63, 121-130.

Hill DA, Ernest RP and Lewis AJ 1987a. Effect of zinc source and picolinic acid on ⁶⁵Zn uptake in an in vitro continuous-flow perfusion system for pig and poultry intestinal segments. *Journal of nutrition* 117, 1704-1707.

Hill DA, Peo ER and Lewis AJ 1987b. Influence of picolinic acid on the uptake of ⁶⁵Zinc-amino acid complexes by the everted rat gut. *Journal of Animal Science* 65, 173-178.

Hill GM, Miller ER and Stowe HD 1983. Effect of dietary zinc levels on health and productivity of gilts and sows through two parities. *Journal of Animal Science* 57, 114-122.

Hill GM, Mahan DC, Carter SD, Cromwell GL, Ewan RC, Harrold RL, Lewis AJ, Miller PS, Shurson GC and Veum TL 2001. Effect of pharmacological concentrations of zinc oxide with or without the inclusion of an antibacterial agent on nursery pig performance. *Journal of Animal Science* 79, 934-941.

Hill GM and Link, 2009. Transporters in the absorption and utilization of zinc and copper. *Journal of Animal Science* 87 Supplement E, E85-E89.

Höhler D and Pallauf J 1993. Effect of citric acid added to a maize-soya-diet with or without Zn-supplementation on the availability of minerals. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 69, 133-142.

Höhler D and Pallauf J 1994. Effects of Zn-supply and addition of citric acid to a maize-soya-diet on the nutritional efficiency and absorption of minerals in piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 71, 189-199.

Hollis GR, Carter SD, Cline TR, Crenshaw TD, Cromwell GL, Hill GM, Kim SW, Lewis AJ, Mahan DC, Miller PS, Stein HH and Veum TL 2005. Effects of replacing pharmacological levels of dietary zinc oxide with lower dietary levels of various organic zinc sources for weanling pigs. *Journal of Animal Science* 83, 2123-2129.

Holwerda R, Albin RC and Madsen FC 1995. Chelation effectiveness of zinc proteinates demonstrated. *Feedstuffs* June, 12-23.

Huang YL, Lu L, Luo XG and Liu B 2007. An optimal zinc level of broiler chicks fed a corn-soybean meal diet. *Poultry Science* 86, 2582-2589.

Huang YL, Lu L, Li SF, Luo XG and Liu B 2009. Relative bioavailabilities of organic zinc sources with different chelation strength for broilers fed a conventional corn-soybean meal diet. *Journal of Animal Science* 87, 2038-2046.

Hudson BP, Dozier WA, Fairchild BD, Wilson JL, Sander JE and Ward TL 2004. Live performance and immune response of straight-run broilers: influence of zinc source in broiler breeder hen and progeny diets and ambient temperature during the broiler production period. *Journal of Applied Poultry Research* 13, 291-301.

Hudson BP, Dozier WA and Wilson JL 2005. Broiler live performance response to dietary zinc source and the influence of zinc supplementation in broiler breeder diets. *Animal Feed Science and Technology* 118, 329-335.

Hynes MJ, Colleran D, Finn J, Headon DR and Lyons TP 1990. Quantitative chemical assessment of some mineral proteinates used in animal feeds. *Journal of Animal Science* 68, Supplement 1, 408 (abstract).

Hynes MJ and Kelly MP 1995. Metal ions, chelates and Proteinates. In *Biotechnology in the Feed Industry* (eds TP Lyons and KA Jacques), pp. 223-248. Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom.

Institut National de la Recherche Agronomique 1989. L'alimentation des animaux monogastriques: porc, lapin, volailles. INRA, Paris, France.

Institut National de la Recherche Agronomique – Association Française de Zootechnie 2004. Tables de composition et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevage. Porcs, volaille, bovines, ovins, caprins, lapins, chevaux, poissons. (eds D Sauvant, JM Perez and G Tran), Paris, France.

Jackson MJ 1997. The assessment of bioavailability of micronutrients: introduction. *European Journal of Clinical Nutrition* 51, Supplement 1, 1-2 (abstract).

Jensen-Waern M, Melin L, Lindberg R, Johannisson A, Petersson L and Wallgren P 1998. Dietary zinc oxide in weaned pigs - effects on performance, tissue concentration, morphology, neutrophil functions and faecal microflora. *Research in Veterinary Science* 64, 225-231.

Jondreville C, Revy PS, Jaffrezic A and Dourmad JY 2002. Le cuivre dans l'alimentation du porc : oligo-élément essentiel, facteur de croissance et risque potentiel pour l'Homme et l'environnement. *INRA Production Animale* 15, 247-265.

Jondreville C, Revy PS and Dourmad JY 2003. Dietary means to better control the environmental impact of copper and zinc by pigs from weaning to slaughter. *Livestock Production Science* 84, 147-156.

Jondreville C, Hayler R and Feuerstein D 2005. Replacement of zinc sulphate by microbial phytase for piglets given a maize-soya-bean meal diet. *Animal Science* 81, 77-83.

Jondreville C, Lescoat P, Magnin M, Feuerstein D, Gruenberg B and Nys Y 2007a. Sparing effect of microbial phytase on zinc supplementation in maize-soya-bean meal diets for chickens. *Animal* 1, 804-811.

Jondreville C, Genthon C, Bouguennec A, Carré B and Nys Y 2007b. Characterisation of European varieties of triticale with special emphasis on the ability of plant phytase to improve phytate P availability to chickens. *British Poultry Science* 48, 678-689.

Jongbloed AW, Kemme PA, de Groote G, Lippens M and Meschy F 2002. Bioavailability of major and trace minerals. International Association of the European Manufacturers of Major, Trace and Specific Feed Mineral Materials (EMFEMA), Bruxelles, Belgique.

Khan A, Vohra PN and Kratzer FH 1987. The effect of protein level and dietary Guar Gum and pectin on copper and zinc utilization in chicks. *Nutrition Reports International* 36, 536-543.

Katouli M, Melin L, Jensen-Waern M, Wallgren P and Moellby R 1999. The effect of zinc oxide supplementation on the stability of the intestinal flora with special reference to composition of coliforms in weaned pigs. *Journal of Applied Microbiology* 87, 564-573.

Kessler J, de Faria A and Jost M 1996. The effect of zinc proteinate and zinc polysaccharide on performance and zinc metabolism in piglets. *Agrarforschung* 3, 547-550.

Kidd MT, Qureshi MA, Ferket PR and Thomas LN 1994. Dietary zinc-methionine enhances mononuclear-phagocytic function in young turkeys zinc-methionine, immunity and salmonella. *Biological Trace Element Research* 42, 217-229.

Kielin D and Mann J 1940. Carbonic anhydrase: purification and nature of the enzyme. *Biochemistry Journal* 34, 1163-1176.

Kirchgessner M 1993. Homeostasis and homeorhesis in trace element metabolism. In *Trace Elements in Man and Animals – TEMA 8* (eds M Anke, D Meissner and CF Mills), pp. 4-21, Verlag Media Touristik Gersdorf, Deutschland.

Kirchgessner M 2004. *Tierernährung*. 11. Neu überarbeitete Auflage. DLG Verlag, Frankfurt am Main, Deutschland.

Kirchgessner M, Müller H-L, Weigand E, Grassmann E, Schwarz FJ, Pallauf J and Roth H-P 1974. Zur Definition und Bestimmung der Absorbierbarkeit, intermediären Verfügbarkeit und Gesamtverwertung von essentiellen Spurenelementen. *Zeitschrift für Tierphysiologie, Tierernährung und Futtermittelkunde* 34, 3 – 17.

Kirchgessner M and Roth FX 1988. Ergotrope Effekte durch organische Säuren in der Ferkelaufzucht und Schweinemast. *Uebersicht Tierernährung* 16, 93-108.

Kirchgessner M, Windisch W and Weigand E 1993. True bioavailability of zinc and manganese by isotope dilution technique. In *Nutritional, chemical and food processing implication of nutrient availability*. (ed U Schlemmer), pp. 213–222, Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe, Deutschland.

Kirchgessner M, Kreuzer M and Roth FX 1994. Alters- und geschlechtsbedingte Unterschiede in den Gehalte an Fe, Zn, Cu und Mn verschiedener Körperpartien sowie ihre Retention bei Mastschweinen. *Archives of Animal Nutrition* 46, 327-337.

Klasing KC 1984. Effects of inflammatory agents and interleukin-1 on iron and zinc metabolism. *American Journal of Physiology* 247, 901-904.

Kommerer SK, Mateo RD, Lin C and Kim SW 2006. Bioavailability of zinc-amino acid chelates to zinc sulfate in broiler chickens. *Journal of Animal Science* 84, supplement 2, 115 (abstract).

Kumar V, Sinha AK, Makkar HPS and Becker K 2010. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chemistry* 120, 945-959.

Kratzer FH and Vohra P 1986. *Chelates in nutrition*, CRC Press. Boca Raton, Florida, United States of America.

Krebs NF 2000. Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *Journal of Nutrition* 130, 1374-1377.

Larsen T and Sansdröm B 1993. Effect of dietary calcium level on mineral and trace element utilization from a rapeseed diet fed to ileum-fistulated pigs. *British Journal of Nutrition* 69, 211-224.

Lawlor PG, Lynch PB, Caffrey PJ, O'Reilly JJ and O'Connel MK 2005. Measurements of the acid binding capacity of ingredients used in pig diets. *Irish Veterinary Journal* 58, 447–452.

Leach GA, Patton RS and Hynes MJ 1997. Analysis techniques for chelated minerals evaluated. *Feedstuffs*, March, 13-15.

Lease JG 1963. Availability to the chick of zinc phytate complexes isolated from oil seed meals by an in vitro digestion method. *Journal of Nutrition* 93, 523-532

Lechartier G and Bellamy F 1877. Sur la présence du zinc dans le corps des animaux et des végétaux. *Compte Rendu de l'Académie des Sciences* 84, 687-690.

Lehrfeld J 1989. High performance liquid chromatography analysis of phytic acid on a pH-stable, Macroporous polymer column. *Cereal Chemistry* 66, 510-515.

Lee SH, Choi SC, Chae BJ, Acda SP and Han YK 2001a. Effects of feeding different chelated copper and zinc sources on growth performance and fecal excretions of weanling pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 14, 1616-1620.

Lee SH, Choi SC, Chae BJ, Lee JK and Acda SP 2001b. Evaluation of metal-amino acid chelates and complexes at various levels of copper and zinc in weanling pigs and broiler chicks. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 14, 1734-1740.

Leeson S and Caston L 2007. Using minimal supplements of trace minerals as a method of reducing trace mineral content of poultry manure. *Animal Feed Science and Technology* 142, 339-347.

Lei XG, Ku PK, Miller ER, Ullrey DE and Yokoyama MT 1993. Supplemental microbial phytase improves bioavailability of dietary zinc to weanling pigs. *Journal of Nutrition* 123, 1117-1123.

Leterrier C, Constantin P, le Bihan Duval E, March G and Nys Y 1998. Troubles locomoteurs et qualité osseuse chez les volailles de chair. *INRA Production Animale* 11, 125-130.

Létourneau-Montminy MP 2009. Modélisation du métabolisme phosphocalcique chez le porc et la volaille. Thèse déposée à AgroparisTech.

Létourneau-Montminy MP, Lescoat P, Narcy A, Sauvant D, Bernier JF, Magnin M, Pomar C, Nys Y and Jondreville C 2008. Effect of reduced dietary calcium and phytase supplementation on calcium and phosphorus utilisation in broilers with modified mineral status, *British Poultry Science* 49, 705-715.

Létourneau-Montminy MP, Narcy A, Magnin M, Sauvant D, Bernier JF, Pomar C and Jondreville C 2010a. Effect of reduced dietary calcium concentration and phytase supplementation on calcium and phosphorus utilization in weaned piglets with modified mineral status. *Journal of Animal Science* 88, 1706-1717.

Létourneau-Montminy MP, Narcy A, Lescoat P, Bernier JF, Magnin M, Pomar C, Nys Y, Sauvant D, Jondreville C 2010b. Meta-analysis of phosphorus utilisation by broilers receiving corn-soyabean meal diets: influence of dietary calcium and microbial phytase. *Animal*, in press.

Li BT, van Kessel AG, Caine WR, Huang SX and Kirkwood RN 2001. Small intestinal morphology and bacterial populations in ileal digesta and feces of newly weaned pigs receiving a high dietary level of zinc oxide. *Canadian Journal of Animal Science* 81, 511-516

Li X, Yin J, Li D, Chen X, Zang J and Zhou X 2006. Dietary supplementation with zinc oxide increases IGF-I and IGF-I receptor gene expression in the small intestine of weanling piglets. *Journal of Animal Science* 84, 74-75.

Li YC, Ledoux DR, Veum TL, Raboy V, Zyla K and Wikiera A 2001. Bioavailability of phosphorus in low phytic acid barley. *Journal of Applied Poultry Research* 10, 86-91.

Lichtlen P, Wang Y, Belser T, Georgiev O, Certa U, Sack R and Schaffner W 2001. Target gene search for the metal responsive transcription factor MTF-1. *Nucleic Acids Research* 29, 1514–1523.

Liuzzi JP and Cousins RJ 2004. Mammalian zinc transporters. *Annual Review of Nutrition* 24, 151-172.

Linares LB, Broomhead JN, Guaiume EA, Ledoux DR, Veum TL and Raboy V 2007. Effects of low phytate barley (*Hordeum vulgare* L.) on zinc utilization in young broiler chicks. *Poultry Science* 86, 299-308.

London Metal Exchange, 2010. www.lme.com/zinc.asp (visité le 27.04.2010).

Lonnerdal B 1989. Intestinal absorption of zinc. In *Zinc in human biology* (ed CF Mills), pp. 33-53. Springer-Verlag, Berlin, Deutschland.

Lonnerdal B 2000. Dietary factors influencing zinc absorption. *Journal of Nutrition* 130, 1378-1383.

Mahan DC and Shields RG 1998. Essential and non-essential amino acid composition of pigs from birth to 145 kilograms of body weight and comparison to other studies. *Journal of Animal Science* 76, 513-521.

Männer K, Simon O and Schlegel P. Effects of different iron, manganese, zinc and copper sources (sulphates, chelates, glycinate) on their bioavailability in early weaned piglets. In 9. Tagung der Schweine- und Geflügelernährung (ed M. Rodehutschord), pp. 25 - 27. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle, Deutschland.

Martin JJ, Strasia CA, Gill DR, Hicks RA, Ridenour K, Dolezal D and Owens FN 1987. Effect of zinc methionine on live performance and carcass merit of feedlot steers. *Journal of Animal Science* 65, Supplement 1, 500 (abstract).

Martinez MM, Hill GM, Link JE, Raney NE, Tempelman RJ and Ernst CM 2004. Pharmacological zinc and phytase supplementation enhance metallothionein mRNA abundance and protein concentration in newly weaned pigs. *Journal of Nutrition* 134, 538-544.

Mateos GG, Làzaro R, Astillero JR and Serrano P 2005. Trace minerals: what text books don't tell you. In Re-defining mineral nutrition (eds JA Taylor-Pickard and LA Tucker), pp. 21-62, Nottingham Press University, Nottingham, United Kingdom.

Matsui T, Susaki H, Tamura A, Yano H, Nakajima T, Matsuda M and Yano F 1998. The improvement of zinc availability in fermented soybean meal in growing pigs. *Animal Science and Technology* 69, 589-591.

Mavromichalis I, Peter CM, Parr TM, Ganessunker D and Baker DH 2000. Growth-promoting efficacy in young pigs of two sources of zinc oxide having either a high or a low bioavailability of zinc. *Journal of Animal Science* 78, 2896-2902.

Miller ER, Luecke RW, Ullrey DE, Baltzer BV, Bradley BL and Hoefer JA 1968. Biochemical, skeletal and allometric changes due to zinc deficiency in the baby pig. *Journal of Nutrition* 95, 278-286.

Miller LV, Krebs NF and Hambidge KM 2007. A mathematical model of zinc absorption in humans as a function of dietary zinc and phytate. *Journal of Nutrition* 137, 135-141.

Minitab 2007. Minitab Version 15.1.1.0. for Windows. In Minitab Inc., State College, United States of America.

Mohanna C and Nys Y 1998. Influence of age, sex and cross on body concentrations of trace elements (zinc, iron, copper and manganese) in chickens. *British Poultry Science* 39, 536-543.

Mohanna C and Nys Y 1999a. Effect of dietary zinc content and sources on the growth, body zinc deposition and retention, zinc excretion and immune response in chickens. *British Poultry Science* 40, 108-114.

Mohanna C and Nys Y 1999b. Changes in zinc and manganese availability in broiler chicks induced by vegetal and microbial phytase. *Animal Feed Science and Technology* 77, 241-253.

Mohanna C, Carré B and Nys Y 1999. Incidence of dietary viscosity on growth performance and zinc and manganese bioavailability in broilers. *Animal Feed Science and Technology* 77, 255-266.

Morgan DP, Young EP, Earle IP, Davey RJ and Stevenson JW 1969. Effects of dietary calcium and zinc on calcium, phosphorus and zinc retention in swine. *Journal of Animal Science* 29, 900-905.

Moore RJ, Komegay ET, Grayson RL and Lindemann MD 1988. Growth, nutrient utilization and intestinal morphology of pigs fed high-fiber diets. *Journal of Animal Science* 66, 1570-1579.

Mortimer CE 1987. *Das Basiswissen der Chemie*. Fünfte Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart, Deutschland.

Mullan BP, Wilson RH, Harris D, Allen JA and Naylor A 2002. Supplementation of weaner pig diets with zinc oxide or Bioplex zinc. In *Proceedings of Alltech's 18th Annual Symposium* (ed. TP Lyons and KA Jacques), pp. 419-424. Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom.

National Research Council 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th revised edition. National Academy Press, Washington, United States of America.

National Research Council 1995. Nutrient requirements of laboratory animals. 4th revised edition. National Academy Press, Washington, United States of America.

National Research Council 1998. Nutrient Requirements of Swine. 10th revised edition. National Academy Press, Washington, United States of America.

National Research Council 2005. Mineral tolerance of animals. 2nd revised edition. The National Academies Press, Washington, United States of America.

NCSS 2001. Number Cruncher Statistical Systems. Kaysville, United States of America .

Newton GL, Hale OM and Plank CO 1983. Effect of wheat bran in practical diets on mineral absorption by pigs at two ages. Canadian Journal of Animal Science 63, 399-408.

Nielsen FH, Sunde ML and Hoekstra WG 1966. Effect of dietary amino acid source on the zinc deficiency syndrome in the chick. Journal of Nutrition 89, 24-34.

Nollet L, van der Klis JD, Lensing M and Spring P 2007. The effect of replacing inorganic with organic trace minerals in broiler diets on productive performance and mineral excretion. Journal of Applied Poultry Research 16, 592-597.

Oberleas D, Muhrer ME and O'Dell BL 1962. Effects of phytic acid on zinc availability and parakeratosis in swine. Journal of Animal Science 21, 57-61.

Oberleas D, Muhrer ME and O'Dell BL 1966. Dietary metal-complexing agents and zinc availability in the rat. Journal of Nutrition 90, 56–62.

O'Dell BL 1989. Mineral interactions relevant to nutrient requirements. Journal of Nutrition 119, 1832-1838

O'Dell BL, Newberne PM and Savage JE 1958. Significance of dietary zinc for the growing chick. Journal of Nutrition 65, 503.

O'Dell BL and Savage JE 1960. Effect of phytic acid on zinc availability. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 103, 304–306.

O'Dell BL 1997. Mineral-ion interaction as assessed by bioavailability and ion channel function. In Handbook of Nutritionally Essential Elements (eds BL O'Dell and RA Sunde), pp. 641-659, Marcel Dekker, New York, United States of America.

Oguey S unpublished. Rapport IR sur B-TRAXIM® 2C Zn lot 50554. Unpublished.

Oguey S and Durosoy S unpublished. Physical properties of organic trace minerals. Unpublished.

Oguey S, Neels A and Stoekli-Evans H 2008. Chemical identity of crystalline trace mineral glycinate for animal nutrition. In Trace elements in animal production systems (eds P Schlegel, S Durosoy and AW Jongbloed), pp. 247-249. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

Oh SH, Nakaue H, Deagen JT, Whanger PD and Arscott GH 1979. Accumulation and depletion of zinc in chick tissue metallothioneins. *Journal of Nutrition* 109, 1720-1729.

O'Hara PJ, Newman AP and Jackson R 1960. Parakeratosis and copper poisoning in pigs fed a copper supplement. *Australian Veterinary Journal* 36, 225-229.

Olaffs K, Cossa J and Jeroch H 2000. The importance of native phytase activity in wheat on the phosphorus utilization in broilers and laying hens. *Archiv für Geflügelkunde* 64, 157-191.

Pallauf J, Höhler D, and Rimbach G 1992. Effect of microbial phytase supplementation to a maize-soya-diet on the apparent absorption of Mg, Fe, Cu, Mn and Zn and parameters of Zn-status in piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 68, 1-9.

Pallauf J, Rimbach G, Pippig S, Schindler B, Höhler D and Most E 1994. Dietary effect of phytogenic phytase and an addition of microbial phytase to a diet based on field beans, wheat, peas and barley on the utilization of phosphorus, calcium, magnesium, zinc and protein in piglets. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* 33, 128-135.

Pancosma unpublished a. Dose-response of zinc oxide and zinc methionine in broilers up to 40 days of age. Study report, unpublished.

Pancosma unpublished b. Bioavailability of zinc sulphate and two organic zinc sources in a rich non-starch-polysaccharide cereal based diet including or not enzymes. Study report, unpublished.

Pancosma unpublished c. Dose-response of zinc sulphate and two organic zinc sources in broiler chickens. Study report, unpublished.

Peric L, Nollet L, Milosevic N and Zikic D 2007. Effect of Bioplex and Selplex substituting inorganic trace mineral sources on performance of broilers. *Archiv Für Geflügelkunde* 71, 122-129.

Pierce JJ, Shafer BL, Stalder KJ and Burkett JL 2005. Nutritional means to lower trace mineral excretion from swine and poultry without compromising performance. In *Animal manure and waste management symposium*, pp. 1-6. San Antonio, United States of America.

Pimentel JL, Cook ME and Greger JL 1991. Bioavailability of zinc methionine for chicks. *Poultry Science* 70, 1637-1639.

Platt SR and Clydesdale FM 1987. Interactions of iron, alone and in combination with calcium, zinc and copper, with phytate rich, fiber rich fraction of wheat bran under gastrointestinal pH conditions. *Cereal Chemistry* 64, 102-105.

Pointillart A 1991. Enhancement of phosphorus utilization in growing pigs fed phytate-rich diets by using rye bran. *Journal of Animal Science* 69, 1109-1115.

Pointillart A 1994. Phytates, phytases : leur importance dans l'alimentation des monogastriques. *INRA Productions Animales* 7, 29-39.

Poulsen HD 1989. Zinc oxide for weaning pigs. In 40th Annual meeting of the european association for animal production (eds Anonymous), pp. 265-266. EAAP Publications, Dublin, Ireland

Poulsen HD and Larsen T 1995. Zinc excretion and retention in growing pigs fed increasing levels of zinc oxide. *Livestock Production Science* 43, 235-243.

Poulsen HD and Carlson D 2008. Zinc and copper for piglets – how do high dietary levels of these minerals function? In Trace elements in animal production systems (eds P Schlegel, S Durosoy and AW Jongbloed), pp. 151-160. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

Power R, Flynn A and Cashman K 1994. Tissue deposition of zinc from a zinc chelate and from inorganic zinc in rats. *Animal Production* 58, 470.

Prasad AS 2008. Zinc in human health: effect of zinc on immune cells. *Molecular Medicine* 14, 353-357.

Raboy V 1997. Accumulation and storage of phosphate and minerals In Cellular and molecular biology of plant seed development. (eds BA Larkins and IK Vasil), pp. 441–477. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands,.

Rao SO, Park SJ, Samford RA and Kim SW 2007. Bioavailability of zinc-amino acid chelates to zinc nitrate in broiler chickens. *Journal of Animal Science* 85, Supplement 1, 318 (abstract).

Rao SVR, Raju MVLN, Reddy MR and Pavani P 2006. Interaction between dietary calcium and non-phytate phosphorus levels on growth, bone mineralization and mineral excretion in commercial broilers. *Animal Feed Science and Technology* 131, 133–148.

Raoult F and Breton H 1877. Sur la presence ordinaire du cuivre et du zinc dans le corps de l'Homme. *Compte Rendu de l'Académie des Sciences* 85, 40.

Raulin J 1869. Etudes cliniques sur la végétation. *Annales des sciences Naturelles. Botanique, biologie végétale* 11, 93.

RASSF 2009. http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/rasff_portal_database_en.htm. (visité le 01.11.2009)

Revy PS 2003. Diminution des rejets de zinc chez le porc: estimation des besoins et voies d'amélioration de la disponibilité. Thèse déposée à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes.

Revy PS, Jondreville C, Dourmad JY, Guinotte F and Nys Y 2002. Bioavailability of two sources of zinc in weanling pigs. *Animal Research* 51, 315-326.

Revy PS, Jondreville C, Dourmad JY and Nys Y 2003. Le zinc dans l'alimentation du porc: oligo-élément essentiel et risqué potentiel pour l'environnement. *INRA Production Animale* 16, 3-18.

Revy PS, Jondreville C, Dourmad JY and Nys Y 2004. Effect of zinc supplemented as either an organic or an inorganic source and of microbial phytase on zinc and other minerals utilisation by weanling pigs. *Animal Feed Science and Technology* 116, 93-112.

Revy PS, Jondreville C, Dourmad JY and Nys Y 2006. Assessment of dietary zinc requirement of weaned piglets fed diets with or without microbial phytase. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 90, 50-59.

Rimbach G and Pallauf J 1992. Effekt einer Zulage mikrobieller Phytase auf die Zinkverfügbarkeit. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* 31, 269-277.

Rimbach G, Pallauf J, Brandt K and Most E 1995. Effect of phytic acid and microbial phytase on Cd accumulation, Zn status, and apparent absorption of Ca, P, Mg, Fe, Zn, Cu, and Mn in growing rats. *Annals of Nutrition and Metabolism* 39, 361-370.

Richert BT, Goodband RD, Nelssen JL, Tokach MD, Kats LJ and Nuzback DE 1994. Effect of chelated trace minerals on nursery pig growth performance. In *Kansas State University Swine Day 1994* (ed MA Johnson), pp. 111-114. Kansas State University, Kansas, United States of America.

Rincker MJ, Clarke SL, Eisenstein RS, Link JE and Hill GM 2005. Effects of iron supplementation on binding activity of iron regulatory proteins and the subsequent effect on growth performance and indices of hematological and mineral status of young pigs. *Journal of Animal Science* 83, 2137-2145.

Rink L and Gabriel P 2001. Extracellular and immunological actions of zinc. *Biometals*, 14, 367-383.

Roberson KD and Edwards HM 1994. Effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol and phytase on zinc utilization in broiler chicks. *Poultry Science* 73, 1312-1326.

Rodrigues-Filho UP, Vaz S Jr, Felicissimo MP, Scarpellini M, Cardoso DR, Vinhas RCJ, Landers R, Schneider JF, Mc Garvey BR, Andersen ML and Skibsted LH 2005. Heterometallic manganese/zinc-phytate complex as a model compound for metal storage in wheat grains. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99, 1973-1982.

Rodriguez P, Darmon N, Chappuis P, Candalh C, Blaton MA, Bouchaud C and Heyman M 1996. Intestinal paracellular permeability during malnutrition in guinea pigs: effect of high dietary zinc. *Gut* 39, 416-422.

Römkens PFAM, Moolenaar SW, Groenenberg JE, Bonten LTC and de Vries W 2008. Copper and zinc in feed (additives): an essential burden? In *Trace elements in animal production systems* (eds P Schlegel, S Durosoy and AW Jongbloed), pp. 115-136. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

Roselli M, Finamore A, Garaguso I, Britti MS and Mengheri E 2003. Zinc oxide protects cultured enterocytes from the damage induced by *Escherichia coli*. *Journal of Nutrition* 133, 4077-4082.

Roth FX, Windisch W and Kirchgessner M 1998. Mineral metabolism (P, K, Ca, Mg, Zn, Mn, Cu) of piglets supplied with potassium diformate (FormiTM LHS). *Agribiological Research* 51, 177-183.

Rucker RB, Lönnerdal B and Keen CL 1994. Intestinal absorption of nutritionally important trace elements. In *Physiology of the gastrointestinal tract* (ed LR Johnson), pp. 2183-2202. Raven Press, New York, United States of America.

Rupic V, Ivandija L, Luterotti S and Dominis-Kramaric M 1997. Influence of inorganic and organic dietary zinc on its concentration in blood serum, bones and hair and on catalytical activity of some serum enzymes in pigs. *Acta Veterinaria Brno* 66, 75-85.

Rust SR 1985. Effects of zinc methionine and grain processing on performance of growing-fattening steers. *Journal of Animal Science* 61, Supplement 1, 482 (abstract).

Sandberg AS and Adherinne R 1986. HPLC method for determination of inositol tri, tetra, penta and hexaphosphates in foods and intestinal contents. *Journal of Food Science* 51, 547-550.

Sandoval M, Henry PR, Ammerman CB, Miles RD and Littell RC 1997. Relative bioavailability of supplemental inorganic zinc sources for chicks. *Journal of Animal Science* 75, 3195-3205.

Sandoval M, Henry PR, Luo XG, Littell RC, Miles RD and Ammerman CB 1998. Performance and tissue zinc and metallothionein accumulation in chicks fed a high dietary level of zinc. *Poultry Science* 77, 1354-1363.

Sandoval M, Henry PR, Littell RC, Miles RD, Butcher GD and Ammerman CB 1999. Effect of dietary zinc source and method of oral administration on performance and tissue trace mineral concentration of broiler chicks. *Journal of Animal Science* 77, 1788-1799.

Sandström B, Almgren A, Kivistö B and Cederblad A 1987. Zinc absorption in humans from meals based on rye, barley, oatmeal, triticale and whole wheat. *Journal of Nutrition* 117, 1898-1902.

Sauvant D, Schmidely P, Daudin JJ and St-Pierre NR 2008. Meta-analyses of experimental data in animal nutrition. *Animal* 2, 1203-1214.

Schell TC and Kornegay ET 1996. Zinc concentration in tissues and performance of weanling pigs fed pharmacological levels of zinc from ZnO, Zn-methionine, Zn-Lysine or ZnSO₄. *Journal of Animal Science* 74, 1584-1593.

Schiavon S, Bailoni L, Ramanzin M, Vincenzi R, Simonetto A and Bittante G 2000. Effect of proteinate or sulphate mineral sources on trace elements in blood and liver of piglets. *Animal Science* 71, 131-139.

Schlegel P 2010. Organic trace mineral market in Switzerland. AllAboutFeed.net www.allaboutfeed.net/news/organic-trace-mineral-market-in-switzerland-id4365.html (visité le 27.04.2010).

Schlegel P and Windisch W 2006. Bioavailability of zinc glycinate in comparison with zinc sulphate in the presence of dietary phytate in an animal model with ⁶⁵Zn labelled rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 90, 216-222.

Schlegel P, Nys Y and Jondreville C 2010. Zinc availability and digestive zinc solubility in piglets and broilers fed diets varying in their phytate contents, phytase activity and supplemented zinc source. *Animal* 4, 200-209.

Selle PH and Ravindran V 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology* 135, 1-41.

Selle PH and Ravindran V 2008. Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. *Livestock Science* 113, 99-122.

Shafey TM, McDonald MW, Dingle JG, 1991. Effects of dietary calcium and available phosphorus concentration on digesta pH and on the availability of calcium, iron, magnesium and zinc from the intestinal contents of meat chickens. *British Poultry Science* 32, 185-194.

Shankar AH and Prasad AS 1998. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *American Journal of Clinical Nutrition* 68, 447-463.

Siener R, Heynck H and Hesse A 2001. Calcium-binding capacities of different brans under simulated gastrointestinal pH conditions. *In vitro* study with Ca⁴⁵. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 4397-4401.

Smith JC, McDaniel EG and Chan W 1976. Alterations in vitamin A metabolism during zinc deficiency and food and growth restriction. *Journal of Nutrition* 106, 596-574.

Smith WH, Plumlee MP and Beeson WM 1961. Zinc requirement of the growing pig fed isolated soybean protein semi-purified rations. *Journal of Animal Science* 20, 128-132.

Solomons NW and Jacob RA 1981. Studies on the bioavailability of zinc in humans: effects of heme and non-heme iron on the absorption of zinc. *The American Journal of Clinical Nutrition* 34, 475-482.

Southern LL and Baker DH 1983. Zinc toxicity, zinc deficiency and zinc-copper interrelationship in *Eimeria acervulina* infected chicks. *Journal of Nutrition* 113, 688-696.

Spears JW and Samsell LJ 1986. Relative availability of zinc in zinc methionine and zinc oxide for ruminants. *Journal of Animal Science* 63, Supplement 1, 402 (abstract).

Spears JW, Schlegel P, Seal MC and Lloyd KE 2004. Bioavailability of zinc from zinc sulfate and different organic zinc sources and their effects on ruminal volatile fatty acid proportions. *Livestock Production Science* 90, 211-217.

Stahl JL, Cook ML, Sunde ML and Greger JL 1989. Enhanced humoral immunity in progeny chicks from hens fed practical diets supplemented with zinc. *Journal of Applied Agricultural Research* 4, 86-89.

- Standish JF, Ammerman CB, Palmer AZ and Simpson CF 1971. Influence of dietary iron and phosphorus on performance, tissue mineral composition and mineral absorption in steers. *Journal of Animal Science* 33, 171–178.
- Steffen SR and Clydesdale FM 1993. Effect of varying concentration of phytate, calcium and zinc on the solubility of protein calcium, zinc and phytate in soy-protein concentrate. *Journal of Food Protection* 56, 1, 42.
- Stevenson JW and Earle IP 1956. Studies on parakeratosis in swine. *Journal of Animal Science* 15, 1036-1045.
- Stobart RH, Medeivors D, Riley M and Russell WC 1987. Effects of zinc methionine supplementation on feedlot performance, carcass characteristics and serum profiles of lambs. *Journal of Animal Science* 65, Supplement 1, 500 (abstract).
- Suchner U, Kuhn KS and Fürst P 2000. The scientific basis of immunonutrition. *Proceedings of the Nutrition Society* 59, 553-563.
- Sullivan JF, Williams RV, Wisecarver J, Etzel K, Jetton MM and Magee DF 1981. The zinc content of bile and pancreatic juice in zinc-deficient swine. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 166, 39-43.
- Sun GJ, Chen DW, Zhang KY and, Yu B 2009. Effects of dietary zinc level and an inflammatory challenge on performance and immune response of weanling pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 22, 1303-1310.
- Sunde ML 1972. Zinc requirement for normal feathering of commercial Leghorn type pullets. *Poultry Science* 51, 1316-1322.
- Susaki H, Matsui T, Ashida KY, Fujita S, Nakajima T and Yano H 1999. Availability of a zinc amino acid chelate for growing pigs. *Animal Science Journal* 70, 124-128.
- Swiatkiewicz S, Koreleski J and Zhong DQ 2001. The bioavailability of zinc from inorganic and organic sources in broiler chickens as affected by addition of phytase. *Journal of Animal and Feed Sciences* 10, 317-328.
- Swinkels JWGM, Korengay ET and Verstegen MWA 1994. Biology of zinc and biological value of dietary organic zinc complexes and chelates. *Nutrition Research Reviews* 7, 129-149.
- Swinkels JWGM, Kornegay ET, Zhou W, Lindemann MD, Webb KE and Verstegen MWA 1996. Effectiveness of a zinc amino acid chelate and zinc sulfate in restoring serum and soft tissue zinc concentrations when fed to zinc depleted pigs. *Journal of Animal Science* 74, 2420-2430.
- Systat 2007. Systat Version 12.00.08 for Windows. In SYSTAT Software Inc., Chicago, United States of America.
- Todd WR, Elvehjem CA and Hart EB 1934. Zinc in the nutrition of the rat. *American Journal of Physiology* 107, 146-156.

Tucker H and Salmon W 1955. Parakeratosis or zinc deficiency in the pig. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 88, 613-616.

Underwood EJ and Suttle NF 1999. *The mineral nutrition of livestock*, 3rd edition, New York. CABI publishing, United States of America.

Vacchina V, Oguey S, Ryszard L and Bravo D 2009. Determination of Zn-glycinate complexes in diluted media. In 8. BOKU-Symposium Tierernährung (eds MC Mair, M Kraft and W Windisch), pp. 129-135. Universität für Bodenkultur, Wien, Oesterreich.

Veum TL, Ledoux DR, Bollinger DW, Raboy V and Cook A 2002. Low-phytic acid barley improves calcium and phosphorus utilization and growth performance in growing pigs. *Journal of Animal Science* 80, 2663-2670.

Veum TL, Ledoux DR, Shannon MC and Raboy V 2009. Effect of graded levels of iron, zinc, and copper supplementation in diets with low-phytate or normal barley on growth performance, bone characteristics, hematocrit volume, and zinc and copper balance of young swine. *Journal of Animal Science* 87, 2625-2634.

Walter A, Krämer K, Most E and Pallauf J 2002. Zinc bioavailability from zinc lipoate and zinc sulfate in growing rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 16, 169-174.

Wang XS, Qin Y and YK Chen 2007. Leaching Characteristics of arsenic and heavy metals in urban roadside soils using a simple bioavailability extraction test. *Environmental Monitoring and Assessment* 129, 221-226

Watkins KL and Southern LL 1993. Effect of dietary sodium zeolite A on zinc utilization by chicks. *Poultry Science* 72, 296-305.

Wedekind KJ and Baker DH 1990. Zinc bioavailability in feed-grade sources of zinc. *Journal of Animal Science* 68, 684-689.

Wedekind KJ, Hortin AE and Baker DH 1992. Methodology for assessing zinc bioavailability: efficacy estimates for zinc-methionine, zinc sulfate, and zinc oxide. *Journal of Animal Science* 70, 178-187.

Wedekind KJ, Lewis AJ, Giesemann MK and Miller PS 1994a. Bioavailability of zinc from inorganic and organic sources for pigs fed corn-soybean meal diets. *Journal of Animal Science* 72, 2681-2689.

Wedekind KJ, Collings G, Hancock J, Titgemeyer EC 1994b. The bioavailability of zinc-methionine relative to zinc sulfate is affected by calcium level. *Poultry Science* 73, Supplement 1, 114 (abstract).

Weigand E and Kirchgessner M 1977. Model study on the factorial derivation of the requirement of trace elements. Zinc requirement of the growing rat. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 39, 84-95.

Weigand E and Kirchgessner M 1978. Homeostatic adjustments in zinc digestion to widely varying dietary zinc intake. *Nutrition & Metabolism* 22, 101-112.

Weigand E and Kirchgessner M 1979. Zur Absorbierbarkeit von Zink aus unterschiedlichen Verbindungen. Zeitschrift für Tierphysiologie, Tierernährung und Futtermittelkunde 42, 137-147.

Weigand E and Kirchgessner M 1980. Total true efficiency of zinc utilization – determination and homeostatic dependence upon to zinc supply status in young rats. Journal of Nutrition 110, 469-480.

Weigand E and Kirchgessner M 1992. Absorption, endogenous excretion, and balance of zinc in growing rats on diets with various sugars replacing starch. Biological Trace Element Research 34, 67–77.

Weremko D, Fandreyewski H, Zebrowska T, Han K, Kim JH and Cho WT 1997. Bioavailability of phosphorus in feeds of plant origin for pigs. A review. Asian-Australasian Journal of Animal Science 10, 551-566.

Windisch W 2001. Homeostatic reactions of quantitative Zn metabolism on deficiency and subsequent repletion with Zn in ⁶⁵Zn labeled adult rats. Trace Elements and Electrolytes 18, 133-128.

Windisch W 2003. Development of zinc deficiency in ⁶⁵Zn labelled, fully grown rats as a model for adults individuals. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 17, 2, 91-96.

Windisch W 2009. Zink und Kupfer im wirtschaftsdünger : Ein Problem der Tierernährung ?In 8. BOKU-Symposium Tierernährung (eds C Mair, M Kraft and W Windisch), pp. 37-44. Universität für Bodenkultur, Wien, Oesterreich.

Windisch W and Kirchgessner M 1994a. Zur Messung der homöostatischen Anpassung des Zinkstoffwechsels an eine defizitäre und hohe Zinkversorgung nach alimentärer ⁶⁵Zn-Markierung. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 71, 98-107.

Windisch W and Kirchgessner M 1994b. Distribution and exchange of zinc in different tissue fractions at deficient and excessive zinc supply. 3. Effect of different zinc supply on quantitative zinc exchange in the metabolism of adult rats. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 71, 131-139.

Windisch W and Kirchgessner M 1995a. Effect of phytase on apparent digestibility and gross utilization of Fe, Cu, Zn and Mn at different levels of calcium supply in piglets and broilers. Agribiological Research 49, 23-29.

Windisch W and Kirchgessner M 1995b. Anpassung des Zinkstoffwechsels und des Zn-Austauschs im Ganzkörper ⁶⁵Zn-markierter Ratten an eine variierende Zinkaufnahme. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 74, 101-112.

Windisch W and Kirchgessner M 1999a. Zn absorption and excretion in adult rats at Zn deficiency induced by dietary phytate additions. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 82, 106-115.

Windisch W and Kirchgessner M 1999b. Tissue zinc distribution and exchange in adult rats at zinc deficiency induced by dietary phytate additions: quantitative zinc metabolism of ⁶⁵Zn-labelled adult rats at zinc deficiency. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 82, 116-124.

Windisch W, Wehr U, Rambeck W and Erben R 2002. Effect of Zn deficiency and subsequent Zn repletion on bone mineral composition and markers of bone tissue metabolism in ⁶⁵Zn-labelled, young-adult rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 86, 214–221.

Windisch W, Vikari A and Hilz C 2003. Homeostatic response of Zn metabolism to dietary Zn supplements from sulfat, gluconate, orotate, aspartate or histidine in ⁶⁵Zn labeled non-growing rats as a model to adult individuals. *Trace Elements and Electrolytes* 20, 125-133.

Windisch W and Ettle T 2008. Limitations and possibilities for progress in defining trace mineral requirements of livestock. In *Trace elements in animal production systems* (eds P Schlegel, S Durosoy and AW Jongbloed), pp. 187-201. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

Woodworth JC, Tokach MD, Nelssen RD, Goodband RD, Quinn PRO, Fakler TM 2005. Interactive effects of diet complexity, zinc source and feed grade antibiotics on weanling pig growth performance. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 4, 688-693.

Yi Z, Kornegay ET and Denbow DM 1996. Supplemental microbial phytase improves zinc utilisation in broilers. *Poultry Science* 75, 540-546.

Yu Y, Lu L, Luo XG and Liu B 2008. Kinetics of zinc absorption by in situ ligated intestinal loops of broilers involved in zinc transporters. *Poultry Science* 87, 1146-1155

Zacharias B, Pelletier W and Drochner W 2004. Organic copper and zinc in diets for growing pigs - a possibility to reduce environmental pollution with copper and zinc. In *Proceedings of the 13th conference of domestic animals*. (ed A Pen), pp. 257-265. Muska Sobota, Slovenia.

Zimmermann B, Lantzsich HJ, Mosenthin R, Biesalski HK and Drochner W 2002. Comparative evaluation of the efficacy of cereal and microbial phytases in growing pigs fed diets with marginal phosphorus supply. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 1298-1304.

Zimmermann B, Lantzsich HJ, Mosenthin R, Biesalski HK and Drochner W 2003. Additivity of the effect of cereal and microbial phytases on apparent phosphorus absorption in growing pigs fed diets with marginal P supply. *Animal Feed Science and Technology* 104, 143-152.