

Effet de deux sources de cuivre sur les performances et le statut en cuivre de porcelets sevrés

Agathe ROMÉO (1), Stéphane DUROSOY (1), Jurgen VAN BAAL (2), Paul BIKKER (2)

(1) Animine, 74330 Sillingy, France

(2) Wageningen University & Research, 6708 PB Wageningen, Pays-Bas

aromeo@animine.eu

Effet de deux sources de cuivre sur les performances et le statut en cuivre de porcelets sevrés

Actuellement, le cuivre (Cu) peut être supplémenté à haute dose dans les aliments pour porcelets. Le sulfate de cuivre (CuSO_4) est la source la plus commune. Dans cette étude, un sulfate de cuivre (CuSO_4) est comparé pendant 5 semaines à un oxyde de dicuivre (Cu_2O , CoRouge®), à différentes doses : 15 ppm (dose nutritionnelle), 80 ppm (dose intermédiaire) et 160 ppm (dose maximale autorisée). L'essai est réalisé sur 600 porcelets, sevrés à 26 jours, répartis entre 60 cases. Les performances de croissance et la concentration en cuivre dans le foie et le plasma sont mesurées à la fin d'essai. Un effet-dose est observé sur les performances de croissance des porcelets : le gain moyen quotidien (GMQ) augmente avec la dose ($P < 0,01$) tandis que l'indice de consommation (IC) diminue ($P < 0,01$). L'oxyde de dicuivre tend à améliorer le GMQ ($P < 0,09$), comparé au sulfate, en particulier à dose nutritionnelle. La concentration de cuivre dans le plasma reste constante, indépendamment de la source et de la dose. La concentration en cuivre dans le foie augmente avec la dose la plus élevée ($P < 0,01$) mais les teneurs hépatiques de l'oxyde de dicuivre à 160 ppm sont significativement inférieures à ceux du sulfate. En conclusion, l'oxyde de dicuivre est une nouvelle source de cuivre efficace pour améliorer les performances de croissance des porcelets, avec une accumulation réduite du cuivre dans le foie. Des résultats complémentaires sont en cours d'analyse.

Effect of two copper sources on growth performance and copper status of weaned piglets

Currently in the European Union, copper (Cu) can be supplemented at high levels in piglet diets until 12 weeks of age. Copper sulphate (CuSO_4) is commonly used. In this study, two copper sources were compared for 5 weeks: CuSO_4 and dicopper oxide (Cu_2O , CoRouge®). Experimental diets were supplemented with 15 ppm (nutritional level), 80 ppm (intermediate level) or 160 ppm (maximum authorised level) of Cu. For this experiment, 600 piglets, weaned at 26 days, were divided among 60 pens. Growth performance (body weight, average daily gain (ADG), feed intake and feed conversion ratio) and Cu concentration in the liver and in plasma were measured at the end of the study. A dose-response effect was observed for growth performance: ADG increased as Cu dose increased ($P < 0.01$), while feed conversion ratio decreased ($P < 0.01$). Cu_2O tended to increase ADG ($P < 0.09$) more than CuSO_4 , especially at the lowest dose. Cu concentration in plasma remained constant, regardless of the source and dosage in the diet. Cu concentration in the liver increased significantly with the highest dose ($P < 0.01$) but that obtained with Cu_2O was significantly lower than that with CuSO_4 . It can be concluded that Cu_2O increases piglet growth performance without negative effects on animal health. Further analyses are in progress.

INTRODUCTION

En Europe, le taux de cuivre (Cu) autorisé dans les aliments pour porcs est limité à 25 ppm de cuivre total, excepté pour les porcelets : jusqu'à 12 semaines, ils peuvent consommer une ration contenant 170 ppm de Cu total, qui diminue les effets négatifs du sevrage et améliore les performances de croissance.

Le sulfate de cuivre (CuSO_4) est la source de cuivre la plus commune dans l'alimentation des monogastriques, mais d'autres formes sont disponibles sur le marché européen. Parmi elles, l'oxyde de dicuivre (Cu_2O), aussi appelé oxyde de cuivre (I), a été récemment autorisé dans l'Union Européenne (Règlement (EU) 2016/2261).

Le sulfate de cuivre et l'oxyde de cuivre (I) se distinguent non seulement par leurs concentrations en cuivre (respectivement 25% et 75%), mais aussi par leurs caractéristiques physico-chimiques : le sulfate, très soluble dans l'eau, se solubilise en libérant des ions Cu^{2+} tandis que l'oxyde de cuivre (I), pratiquement insoluble dans l'eau, relargue des ions Cu^+ .

Dans notre étude, les effets de ces deux sources sur les performances des porcelets et leurs métabolismes ont été comparés à différentes doses, du sevrage jusqu'à 5 semaines post-sevrage.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Animaux et aliments expérimentaux

L'étude a été menée sur 600 porcelets croisés Tempo x (York x Dutch Landrace) sevrés à 26 jours, mâles entiers et femelles, avec un poids initial d'environ 8 kg ($\pm 2,0$ kg). Les animaux ont été répartis dans 60 cases, en fonction de leur poids et de leur portée d'origine. Ils étaient divisés dans des salles contenant 6 ou 12 cases d'étude, avec une égale répartition des traitements. L'essai a duré 5 semaines, du sevrage jusqu'à l'âge de 9 semaines.

Un aliment commercial était à la disposition des porcelets avant le sevrage. Une semaine avant le début de l'essai, il a été remplacé par un des aliments préparés pour le premier âge (S15, 15 ppm de Cu par CuSO_4) pour habituer les animaux aux aliments expérimentaux et faciliter la transition au sevrage.

Pendant l'étude, les animaux avaient accès à l'eau et aux aliments à volonté. Les aliments expérimentaux, fabriqués à base de blé, d'orge, de maïs et de tourteau de soja, sans phytase, étaient proposés sous forme de granulés. La période du premier âge s'étendait du sevrage au 14^e jour post-sevrage (matières azotées totales (MAT) : 16,9% ; énergie nette (EN) : 9,8 MJ/kg), suivie par le deuxième âge jusqu'à la fin de l'essai (MAT : 15,5% ; EN : 9,6 MJ/kg).

L'essai portait sur six aliments expérimentaux, avec différentes sources et doses de cuivre. Un sulfate de cuivre (CuSO_4) et un oxyde de dicuivre (Cu_2O , CoRouge®) étaient comparés à trois doses (Tableau 1).

Tableau 1 - Liste des traitements expérimentaux

Aliment	Source utilisée	Cu ajouté, ppm
S15	Sulfate	15
S80		80
S160		160
O15	Oxyde (I)	15
O80		80
O160		160

1.2. Suivi des performances

Les porcelets ont été pesés individuellement au sevrage, 14 et 35 jours post-sevrage. La consommation de chaque case a été mesurée au moment du changement entre le premier et le deuxième âge (14 jours après le sevrage), puis à la fin de l'essai (35 jours après le sevrage). Le gain moyen quotidien (GMQ) et l'ingéré ont été calculés pour chaque période.

La consistance des fèces a été évaluée deux fois par semaine, avec une notation à trois niveaux : normales, molles, aqueuses (diarrhéiques).

1.3. Prélèvements et analyses

A la fin de l'étude, 48 porcelets femelles proches du poids moyen de leurs cases ont été euthanasiées, par injection d'Euthasol dans la veine auriculaire.

Des échantillons de sang ont été collectés dans la veine jugulaire ou dans l'artère carotide ; ils ont été conservés dans des tubes sans zinc pour le sérum et des tubes héparinés pour le plasma. La concentration en cuivre (Cu) a été mesurée dans le plasma.

Sur chaque porcelet, deux échantillons de foie, deux échantillons de bile, le pancréas et les métacarpes 3-4 ont été isolés et stockés à -20°C . La concentration de cuivre (Cu) a été quantifiée dans le foie.

Des échantillons de muqueuse intestinale (grattage) ont été prélevés et conservés à -80°C . L'expression des gènes pour des transporteurs spécifiques a été mesurée dans les entérocytes duodénaux, via la quantification des ARNm. Le gène IPO8 était utilisé comme référence.

Les contenus de cinq segments du tractus digestif (estomac, jéjunum proximal, jéjunum distal, iléum, colon) ont également été conservés (à -20°C ou à -80°C) en vue d'analyses complémentaires.

1.4. Analyses statistiques

L'unité expérimentale était le porcelet. Les données ont été analysées par la méthode ANOVA (analyse de la variance), en utilisant le traitement expérimental comme effet fixe et les salles comme effet aléatoire. Ces analyses ont été réalisées avec le logiciel de statistiques GenStat (2016).

Les résultats obtenus étaient considérés comme une tendance pour $P < 0,1$ et significatifs pour $P < 0,05$.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Performances de croissance

Un effet significatif de la dose a été observé pour les performances de croissance : le GMQ et l'ingéré augmentaient avec la dose de cuivre ($P < 0,01$, Tableau 2), tandis que l'indice de consommation diminuait ($P < 0,01$). Ces résultats confirment l'effet positif des doses élevées de cuivre, observé sur le terrain et dans le cadre d'études précédentes (Bikker *et al.*, 2016).

Comparé au sulfate de cuivre, l'oxyde de cuivre (I) tendait à augmenter le GMQ, et en conséquence le poids vif, en particulier à dose nutritionnelle ($P < 0,09$). Cette augmentation pourrait être liée à une légère augmentation de l'ingéré, visible notamment pendant la période 15-35 jours.

L'effet des hautes doses de cuivre sur les diarrhées en post-sevrage est également vérifié dans notre étude : sur les deux

premières semaines, environ 6% des porcelets présentaient des signes de diarrhées dans les groupes consommant 15 ppm de cuivre, et environ 20% avaient des fèces molles. Ces valeurs étaient significativement inférieures ($P < 0,01$) dans les groupes nourris avec 80 ppm ou 160 ppm de cuivre : entre 2,3% et 3,3% pour les fèces aqueuses, entre 11,3% et 15% pour les fèces molles.

Sur les 3 dernières semaines, le nombre de porcelets avec des signes de diarrhées a globalement diminué (moins de 2% pour l'ensemble des traitements), mais les groupes nourris avec 160 ppm de cuivre présentaient le plus grand pourcentage de porcelets avec des fèces normales, et le plus petit pourcentage de porcelets considérés diarrhéiques. L'effet des 160 ppm de cuivre comparé à l'effet de 15 ppm de cuivre était significatif ($P < 0,05$) pour l'oxyde et numérique pour le sulfate.

L'effet du cuivre à haute dose sur les performances et la santé des porcelets est bien connu, mais son mode d'action n'est pas encore pleinement élucidé.

Actuellement, plusieurs hypothèses sont examinées. Le cuivre est, entre autres, connu pour son pouvoir antibactérien (Dupont *et al.*, 2011) et pourrait agir comme un régulateur du microbiote intestinal. Cette activité antibactérienne a été démontrée *in vitro*, avec une efficacité supérieure des ions Cu^+ comparés aux ions Cu^{2+} (Dunning *et al.*, 1997).

Dans des études antérieures, des injections de cuivre par intraveineuse ont amélioré les performances de croissance des porcelets au sevrage, ce qui suggère également l'existence d'un effet systémique (Zhou *et al.*, 1994). Ce type d'injection stimulerait entre autres la sécrétion du neuropeptide Y (Pau *et al.*, 1986), connu pour augmenter la consommation des animaux. D'autres études, menées avec des aliments riches en cuivre, renforcent l'idée que le cuivre à haute dose jouerait un rôle dans la sécrétion de certaines hormones, comme les hormones de croissance (GH), mais aussi la ghréline, une hormone digestive qui stimulerait l'appétit (Yang *et al.*, 2012).

Tableau 2. Performances de croissance¹ des porcelets (0-35 jours post-sevrage)

Source Dose, ppm	Cu_2O			CuSO_4			ESM	P-value		
	15	80	160	15	80	160		Source (S)	Dose (D)	SxD
Poids vif, kg										
Jour 0	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	0,01	NS	NS	NS
Jour 14	9,9 ^{ab}	10,1 ^b	10,7 ^c	9,8 ^a	10,1 ^b	10,6 ^c	0,09	NS	<0,01	NS
Jour 35	18,6 ^{ab}	19,3 ^b	21,4 ^c	17,8 ^a	19,2 ^b	21,1 ^c	0,29	<0,1	<0,01	NS
GMQ, g/j										
J 0-14	149 ^{ab}	164 ^b	205 ^c	140 ^a	159 ^{ab}	198 ^c	6,8	NS	<0,01	NS
J 15-35	412 ^{ab}	435 ^b	512 ^c	380 ^a	435 ^b	499 ^c	12,3	NS	<0,01	NS
J 0-35	307 ^{ab}	327 ^b	389 ^c	284 ^a	325 ^b	378 ^c	8,4	<0,1	<0,01	NS
Ingéré, g/j										
J 0-14	215 ^a	223 ^a	252 ^b	213 ^a	222 ^a	244 ^b	6,5	NS	<0,01	NS
J 15-35	608 ^b	636 ^b	716 ^c	566 ^a	632 ^b	713 ^c	14,6	NS	<0,01	NS
J 0-35	451 ^{ab}	471 ^b	531 ^c	425 ^a	468 ^b	525 ^c	9,8	NS	<0,01	NS
IC										
J 0-14	1,45 ^{bc}	1,38 ^b	1,24 ^a	1,54 ^c	1,44 ^{bc}	1,24 ^a	0,04	NS	<0,01	NS
J 15-35	1,47 ^{bc}	1,46 ^{bc}	1,40 ^a	1,50 ^c	1,46 ^{bc}	1,43 ^{ab}	0,02	NS	<0,01	NS
J 0-35	1,47 ^{bc}	1,44 ^b	1,37 ^a	1,50 ^c	1,45 ^b	1,39 ^a	0,02	NS	<0,01	NS

¹ GMQ: gain moyen quotidien, IC : indice de consommation. ² Modèle ANOVA, ESM : erreur standard de la moyenne

Des lettres différentes indiquent une différence significative ($P < 0,05$).

2.2. Statut en cuivre

Les concentrations en cuivre dans le plasma (cuprémie) et dans certains organes sont utilisées pour évaluer la biodisponibilité des sources de cuivre. La cuprémie et la concentration du cuivre hépatique sont des critères couramment retenus pour comparer les sources entre elles.

Dans le cadre de notre étude, aucune différence n'a été observée pour la concentration en cuivre dans le plasma, entre les deux sources ou entre les trois doses, après 35 jours d'essai. Les valeurs mesurées se situaient dans une fourchette comprise entre 1,39 et 1,54 mg/kg.

La concentration du cuivre hépatique augmentait quand la dose de cuivre augmentait : numériquement avec 80 ppm, significativement avec 160 ppm ($P < 0,01$). Par ailleurs, une différence significative était observée entre les deux sources de cuivre à haute dose ($P < 0,01$) (Figure 1).

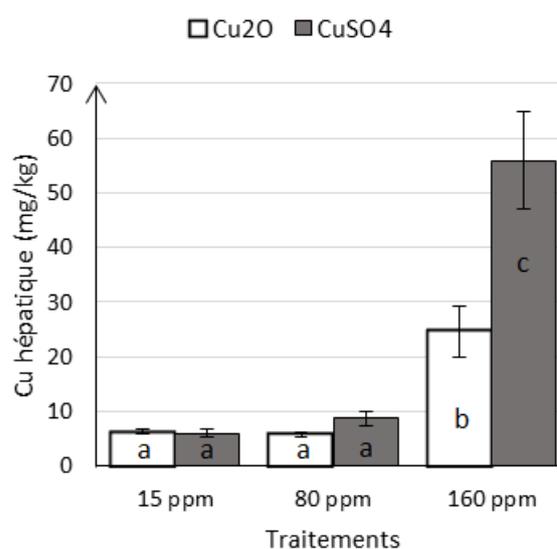


Figure 1 – Concentration du cuivre hépatique

Des lettres différentes indiquent une différence significative ($P < 0,05$)

A dose nutritionnelle (15 ppm de cuivre ajouté), les deux sources de cuivre n'ont donc montré aucune différence sur le statut en cuivre, selon les critères mesurés (cuprémie, concentration de cuivre dans le foie). Le sulfate de cuivre et l'oxyde de dicuivre auraient donc des valeurs de biodisponibilité proches, ce qui est cohérent avec des études antérieures menées sur les monogastriques (Baker *et al.*, 1991 ; Hamdi *et al.*, 2017). En dépit d'une solubilité très faible dans l'eau, l'oxyde de cuivre (I) Cu_2O est considéré aussi biodisponible que le sulfate, contrairement à l'oxyde de cuivre (II) CuO , qui est peu assimilé par les monogastriques (EMFEMA, 2002).

Quand le cuivre est supplémenté à haute dose, la concentration de cuivre hépatique est plus faible avec un apport en oxyde de dicuivre qu'avec un apport en sulfate de cuivre. Des résultats similaires ont été enregistrés dans une étude récente menée sur poulet de chair, qui comparait ces deux sources de cuivre à différentes doses (Hamdi *et al.*, 2017). Ce phénomène pourrait être lié à une diminution de la solubilisation de l'oxyde de dicuivre dans l'estomac ou dans le gésier, lorsqu'il est apporté à très haute dose par l'aliment. La régulation des transporteurs spécifiques des métaux au niveau de l'intestin est également étudiée.

2.3. Expression des transporteurs dans le duodénum

Les ARNm des gènes impliqués dans le transport et la séquestration du zinc et du cuivre ont été quantifiés dans le duodénum des porcelets.

Les tests incluaient la quantification des ARNm pour MT1A ; ce gène code pour la métallothionéine 1A, une protéine dotée d'une forte affinité pour le zinc et pour le cuivre.

Les résultats préliminaires ont montré une augmentation significative du nombre de transcrits pour MT1A avec 160 ppm de cuivre, et une différence significative entre les deux sources de cuivre à ce niveau ($P < 0,01$, Figure 2).

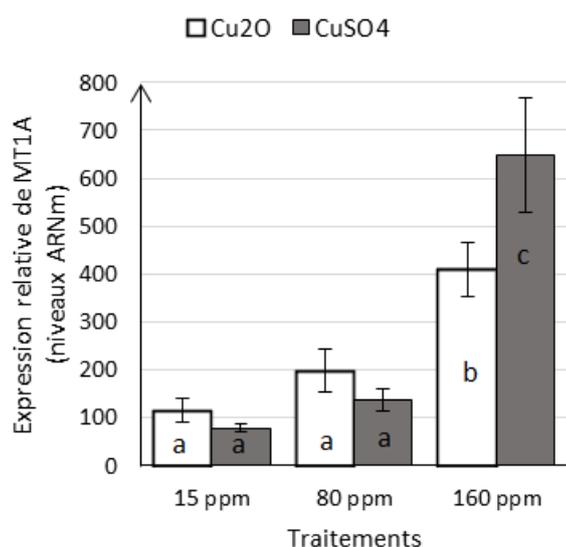


Figure 2 – Expression relative des ARNm pour le gène MT1A

Des lettres différentes indiquent une différence significative ($P < 0,05$)

L'expression de DMT1, un transporteur membranaire des cations divalents, a également été évaluée. Une augmentation de l'expression de ce gène a été observée avec 160 ppm de cuivre ajouté, notamment avec le sulfate de cuivre ($P < 0,05$). Les résultats obtenus avec l'oxyde de dicuivre étaient globalement plus stables, aucune différence significative n'a été relevée entre les trois groupes (Figure 3).

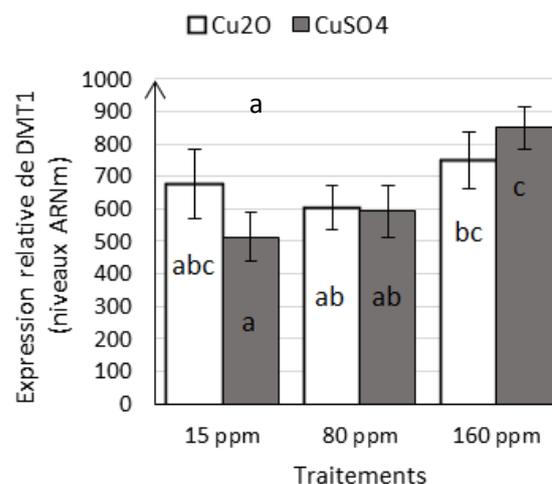


Figure 3 – Expression relative des ARNm pour le gène DMT1

Des lettres différentes indiquent une différence significative ($P < 0,05$)

La métallothionéine 1A séquestre le cuivre pour diminuer la concentration de cuivre intracellulaire libre. Son expression tend à augmenter en présence de concentrations élevées de cuivre (Fry *et al.*, 2012), ce qui est en accord avec nos résultats. Néanmoins, cette augmentation est plus prononcée avec le sulfate qu'avec l'oxyde à très haute dose, ce qui a également été observé pour l'accumulation du cuivre dans le foie ; ces résultats renforcent l'hypothèse de cinétiques différentes pour la solubilisation et l'absorption de doses élevées de cuivre dans le tractus digestif.

L'effet du cuivre sur DMT1 a été étudié dans un essai antérieur et s'associait à une diminution de l'expression de ce transporteur (Bikker et Van Baal, non publiée). Le phénomène inverse a été observé dans notre étude et soulève des questions sur les interactions avec d'autres cations divalents, comme Fe^{2+} , et avec d'autres transporteurs membranaires. Les différences observées entre le sulfate de cuivre et l'oxyde de cuivre (I) pourraient être liées au stade d'oxydation des ions au niveau intestinal (Cu^+ vs Cu^{2+}).

CONCLUSION

En conclusion, l'oxyde de cuivre (I) satisfait les besoins en cuivre des porcelets au sevrage et améliore leurs performances. Son impact sur la croissance et sur les diarrhées post-sevrage est comparable à celui du sulfate de cuivre, qui est actuellement la source de référence. Néanmoins, son accumulation dans l'organisme est inférieure à celle du sulfate. Il semble par ailleurs avoir un effet différent sur les transporteurs présents dans le duodénum, qui peut être lié à ses propriétés physico-chimiques particulières. Des résultats complémentaires sont en cours d'analyse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Baker D.H., Odle J., Funk M.A., Wieland T.M., 1991. Research note: bioavailability of copper in cupric oxide, cuprous oxide, and in a copper-lysine complex. *Poult. Sci.*, 70, 177-179.
- Bikker P., Jongbloed A.W., van Baal J., 2016. Dose-dependent effects of copper supplementation of nursery diets on growth performance and fecal consistency in weaned pigs. *J. Anim. Sci.*, 94, 181-186.
- Dunning J.C., Ma Y., Marquis R.E., 1997. Anaerobic killing of oral streptococci by reduced, transition metal cations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (1), 27-33.
- Dupont C.L., Grass C., Rensing C., 2011. Copper toxicity and the origin of bacterial resistance – new insights and applications. *Metallomics*, 2011, 3, 1109–1118.
- EMFEMA (International Association of the European Manufacturers of Major, Trace and Specific Feed Mineral Materials), 2002. Bioavailability of major and trace minerals. Jongbloed A.W., Kemme P.A., De Groote G., Lippens M., Meschy F., 112 p.
- Fry R.S., Ashwell M.S., Lloyd K.E., O'Nan A.T., Flowers W.L., Stewart K.R., Spears J.W., 2012. Amount and source of dietary copper affects small intestine morphology, duodenal lipid peroxidation, hepatic oxidative stress, and mRNA expression of hepatic copper regulatory proteins in weanling pigs. *J. Anim. Sci.*, 90, 3112-3119.
- Hamdi M., Solà-Oriol D., Franco-Rossello R., Durosoy S., Roméo A., Perez J.F., 2017. Evaluation *in vivo* et *in vitro* de deux sources de cuivre pour poulets de chair. Journées Rech. Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, 12, 205-209.
- Règlement (EU) 2016/2261, du 15 décembre 2016, concernant l'autorisation de l'oxyde de cuivre(I) en tant qu'additif destiné à l'alimentation de toutes les espèces animales, Journal Officiel de l'Union Européenne, L 342, 18.
- Pau, K.Y.F., Khorram O., Kynard A.H., Spies H.G., 1986. Simultaneous induction of neuropeptide Y and gonadotrophin-releasing hormone release in the rabbit hypothalamus. *Neuroendocrinology*, 49, 197-201.
- Yang W., Wang J., Zhu X., Gao Y., Liu Z., Zhang L., Chen H., Shi X., Yang L., Liu G., 2012. High lever dietary copper promote ghrelin gene expression in the fundic gland of growing pigs. *Biol. Trace Elem. Res.*, 150, 154–157.
- Zhou W., Kornegay E.T., Lindemann M.D., Swinkels J.W.G.M., Weltens M.K., Wong E.A., 1994. Stimulation of growth by intravenous injection of copper in weanling pigs. *J. Anim. Sci.*, 72, 2395-2403.

