



(12) **DEMANDE DE BREVET CANADIEN
CANADIAN PATENT APPLICATION**

(13) **A1**

(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2019/06/04
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2019/12/12
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2020/11/27
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2019/051325
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2019/234347
(30) Priorité/Priority: 2018/06/05 (FR18 54868)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *A23K 40/00* (2016.01),
A23K 10/14 (2016.01), *A23K 10/32* (2016.01),
A23K 50/10 (2016.01)
(71) Demandeur/Applicant:
LESAFFRE ET COMPAGNIE, FR
(72) Inventeurs/Inventors:
JULIEN, CHRISTINE, FR;
MARDEN, JEAN-PHILIPPE, FR
(74) Agent: LAVERY, DE BILLY, LLP

(54) Titre : PROCÉDE D'AMELIORATION DE LA DEGRADATION DE LA PAILLE DE BLE
(54) Title: PROCESS FOR IMPROVING WHEAT STRAW DEGRADATION

(57) **Abrégé/Abstract:**

Procédé d'amélioration de la dégradation de la paille de blé La présente invention se rapporte à un procédé d'amélioration de la dégradation de la paille de blé chez un ruminant comprenant les étapes suivantes: a) fourniture de la paille de blé, b) prétraitement chimique de ladite paille fournie, c) alimentation du ruminant avec la paille de blé prétraitée chimiquement, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape d) d'administration directe au ruminant d'un additif ruminal enzymatique, ce qui signifie que ledit additif ruminal enzymatique n'est pas utilisé en prétraitement sur la paille de blé. La présente invention concerne également l'utilisation directe chez un ruminant d'un additif ruminal enzymatique, avant, pendant ou après l'alimentation dudit ruminant avec de la paille de blé ayant subi un prétraitement chimique, ce qui signifie que ledit additif enzymatique n'est pas utilisé en prétraitement sur la paille de blé.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

**(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle**
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
12 décembre 2019 (12.12.2019)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2019/234347 A1

(51) Classification internationale des brevets :

A23K 40/00 (2016.01) *A23K 10/14* (2016.01)
A23K 10/32 (2016.01) *A23K 50/10* (2016.01)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2019/051325

(22) Date de dépôt international :

04 juin 2019 (04.06.2019)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

18 54868 05 juin 2018 (05.06.2018) FR

(71) Déposant : LESAFFRE ET COMPAGNIE [FR/FR] ;
41,rue Etienne Marcel, 75001 Paris (FR).

(72) Inventeurs : JULIEN, Christine ; Les Carrières, 31360
Sepx (FR). **MARDEN, Jean-Philippe ;** 3 Impasse des
Terres Hautes, 31670 Labege (FR).

(74) Mandataire : PLASSERAUD IP ; 66 rue de la Chaussée
d'Antin, 75440 Paris Cedex 09 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) Title: PROCESS FOR IMPROVING WHEAT STRAW DEGRADATION

(54) Titre : PROCEDE D'AMELIORATION DE LA DEGRADATION DE LA PAILLE DE BLE

(57) Abstract: The present invention relates to a process for improving wheat straw degradation in a ruminant, comprising the following steps: a) providing the wheat straw, b) chemically pretreating said provided straw, c) feeding the ruminant with the chemically pretreated wheat straw, wherein said process is characterized in that it also comprises a step d) of directly administering an enzymatic rumen additive to the ruminant, i.e. said enzymatic rumen additive is not used as a pretreatment on the wheat straw. The present invention also relates to the direct use of an enzymatic rumen additive in a ruminant before, during or after feeding said ruminant with wheat straw having undergone a chemical pretreatment, i.e. said enzymatic additive is not used as a pretreatment on the wheat straw.

(57) Abrégé : Procédé d'amélioration de la dégradation de la paille de blé La présente invention se rapporte à un procédé d'amélioration de la dégradation de la paille de blé chez un ruminant comprenant les étapes suivantes: a) fourniture de la paille de blé, b) prétraitement chimique de ladite paille fournie, c) alimentation du ruminant avec la paille de blé prétraitée chimiquement, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape d) d'administration directe au ruminant d'un additif ruminal enzymatique, ce qui signifie que ledit additif ruminal enzymatique n'est pas utilisé en prétraitement sur la paille de blé. La présente invention concerne également l'utilisation directe chez un ruminant d'un additif ruminal enzymatique, avant, pendant ou après l'alimentation dudit ruminant avec de la paille de blé ayant subi un prétraitement chimique, ce qui signifie que ledit additif enzymatique n'est pas utilisé en prétraitement sur la paille de blé.



WO 2019/234347 A1

PROCEDE D'AMELIORATION DE LA DEGRADATION DE LA PAILLE DE BLE

DOMAINE DE L'INVENTION

- 5 La présente invention se rapporte au domaine agricole de la nutrition animale et concerne un procédé d'amélioration de la dégradation du fourrage.

ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE

- 10 La paille de blé représente une ressource peu onéreuse qui pourrait contribuer au renforcement de l'autonomie fourragère et alimentaire de certaines exploitations. De plus, dans certaines zones géographiques, le fourrage représente une ressource qualitativement très importante qui pourrait avantageusement être valorisée en nutrition animale.

- Cependant, l'utilisation de la paille de blé est limitée chez les ruminants à haut niveau de production tels que les bovins notamment. Effectivement, malgré sa richesse en fibres, la paille de blé a une faible valeur nutritionnelle du fait d'une mauvaise digestion par les ruminants. En effet, d'un point de vue chimique, la présence de liaisons entre les constituants de la paroi végétale entraîne une résistance plus ou moins forte à l'attaque du microbiote digestif ruminal. Cette résistance se traduit par une faible dégradation du fourrage
20 chez l'animal.

- Ainsi, afin d'améliorer la dégradation du fourrage, et notamment de la paille de blé, des recherches ont été menées depuis des décennies. Il a été démontré que le recours à des prétraitements chimiques ou enzymatiques permettait d'améliorer la dégradation. Il a également été démontré que la dégradation de la paille de blé pouvait être améliorée par
25 une utilisation combinée de prétraitements chimiques et enzymatiques, lesdits prétraitements présentant même un effet synergique.

- La publication de Y. Wang et al (J. Anim. Sci., 2004) présente par exemple les effets d'un prétraitement alcalin sur l'efficacité des enzymes exogènes pour augmenter la digestibilité de la paille de blé. Dans cette publication, la paille de blé est prétraitée avec une solution
30 alcaline puis avec une solution d'enzymes par pulvérisation. Les résultats montrent ainsi que la combinaison du prétraitement chimique alcalin et du traitement enzymatique améliore la digestibilité de la paille de blé. Le traitement enzymatique mis en œuvre est appliqué sur la paille de blé en amont de l'alimentation de l'animal afin de respecter un temps d'incubation suffisant et de permettre un effet sur la digestibilité. Le traitement enzymatique peut donc
35 être qualifié de prétraitement en ce sens qu'il s'agit d'un traitement préliminaire de la paille

de blé afin que cette dernière, une fois le temps d'incubation respecté, puisse être utilisée ultérieurement en alimentation animale et que la digestion en soit améliorée.

Cependant, l'utilisation d'enzymes en prétraitement n'est pas efficace et présente plusieurs inconvénients. En effet, au sein d'une exploitation, il est chronophage pour un agriculteur de pulvériser l'ensemble d'un stock de paille de blé. De plus, il est nécessaire de respecter un temps d'application et que le traitement soit appliqué de manière homogène ce qui implique que la paille de blé se présente sous une forme relativement libre ou en vrac. Enfin, le coût des enzymes étant relativement onéreux, cela limite d'autant la possibilité d'un prétraitement à l'échelle d'une exploitation, surtout lorsque ce dernier est associé à un prétraitement chimique qui représente déjà un coût supplémentaire. En conséquence, la combinaison d'un prétraitement chimique et enzymatique, quand bien même cette dernière est efficace pour améliorer la digestibilité de la paille de blé, ne permet pas une application à grande échelle au sein des exploitations en raison de son coût élevé de mise en œuvre. Ce point est d'ailleurs soulevé par la publication de Y. Wang et al dans la partie « Implication » qui mentionne explicitement que la combinaison entre un traitement alcalin et enzymatique n'est pas économiquement viable.

Il existe ainsi un besoin de disposer de procédés permettant d'améliorer la dégradation de la paille de blé, lesdits procédés étant peu coûteux et permettant une mise en œuvre à l'échelle d'une exploitation agricole. La valorisation de la paille de blé permet ainsi d'améliorer l'autonomie fourragère et globale de l'exploitation.

Il est donc du mérite des Inventeurs d'avoir mis au point un procédé permettant de répondre à tout ou partie des problèmes de l'art antérieur. Les Inventeurs ont découvert de manière surprenante que lorsque l'additif enzymatique n'est plus utilisé en prétraitement sur la paille de blé, mais est administré directement chez le ruminant (notamment par la voie orale), avant, pendant ou après l'administration de la paille de blé prétraitée chimiquement, alors l'amélioration effective sur la dégradation de la paille de blé est maintenue, voir même un effet synergique apparaît avec le traitement chimique et le traitement enzymatique.

Cette administration directe, notamment par la voie orale, est tout à fait avantageuse car il suffit simplement de prétraiter chimiquement la paille de blé, et l'additif enzymatique peut être administré avant, pendant ou après l'ingestion de la paille de blé prétraitée chimiquement.

Rien ne laissait supposer que l'administration directe de l'additif enzymatique permettrait une action positive sur la dégradation ruminale de la paille de blé prétraitée chimiquement aussi efficace que lorsque ledit additif enzymatique était préalablement pulvérisé sur la paille de blé prétraitée chimiquement.

Une telle administration est très intéressante car elle permet, outre le gain de temps et la simplicité du procédé, d'utiliser moins d'additif enzymatique que lorsque ce dernier est pulvérisé sur la paille de blé.

5 RESUME DE L'INVENTION

Un premier objet de l'invention concerne un procédé d'amélioration de la dégradation ruminale de la paille de blé chez un ruminant comprenant les étapes suivantes :

- a) fourniture de la paille de blé,
- 10 b) prétraitement chimique de ladite paille fournie,
- c) alimentation du ruminant avec la paille de blé prétraitée chimiquement à l'étape b),

ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape d) d'administration directe au ruminant d'un additif ruminal enzymatique, ce qui signifie que ledit additif
15 enzymatique n'est pas utilisé en prétraitement sur la paille.

Un second objet de l'invention concerne l'utilisation directe chez un ruminant d'un additif ruminal enzymatique, avant, pendant ou après l'alimentation dudit ruminant avec de la paille de blé ayant subi un prétraitement chimique.

20 L'utilisation « directe » chez un ruminant signifie que l'additif enzymatique est administré directement au ruminant, notamment par la voie orale, sans passer par un prétraitement de la paille de blé par l'additif enzymatique.

DESCRIPTION DETAILLEE

25

Un premier objet de l'invention concerne un procédé d'amélioration de la dégradation ruminale de la paille de blé chez un ruminant comprenant les étapes suivantes :

- a) fourniture de la paille de blé,
- b) prétraitement chimique de ladite paille fournie,
- 30 c) alimentation du ruminant avec la paille de blé prétraitée chimiquement à l'étape b),

ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape d) d'administration directe au ruminant d'un additif ruminal enzymatique, ce qui signifie que ledit additif
enzymatique n'est pas utilisé en prétraitement sur la paille de blé.

35

La dégradation est définie comme étant la dégradation des aliments sous l'action des micro-organismes du réticulo-rumen.

Au sens de la présente invention, le terme « prétraitement » désigne un traitement réalisé sur la paille blé en amont de l'administration à l'animal, ledit traitement étant effectué par mise en contact entre une solution chimique et la paille de blé.

5 Le procédé selon l'invention permet donc d'améliorer la dégradation de la paille de blé lorsque celle-ci est utilisée pour nourrir un ruminant.

En effet, le procédé mis au point permet de rendre les constituants pariétaux de la paille de blé plus accessibles aux enzymes de dégradation des microorganismes du rumen et d'en améliorer la dégradation.

10 L'ampleur de cette dégradation conditionne la digestibilité dans l'ensemble du tube digestif et, par conséquent, la valeur énergétique du régime alimentaire du ruminant.

La digestibilité est un critère qui définit le degré auquel une matière organique est digérée par un animal. Plus la digestibilité est importante, et meilleure est la digestion.

15 De plus, en améliorant la dégradation de la paille de blé, le procédé selon l'invention permet également de mieux la valoriser en alimentation animale car à l'heure actuelle elle est sous utilisée en raison des difficultés qu'ont les animaux pour la digérer comparativement à d'autres aliments.

La première étape du procédé selon l'invention consiste donc à fournir de la paille de blé.

20 La paille de blé correspond au produit agricole représenté par la partie de la tige ou chaume de blé. La paille de blé fournie est celle classiquement utilisée par l'homme du métier en alimentation animale et peut se présenter sous différentes formes, aussi bien sous forme de bottes de paille que sous une forme en vrac.

25 Selon un mode de réalisation particulier, la paille peut subir au préalable une étape de traitement mécanique dont l'objectif est de réduire la taille des brins et de permettre à la fois une meilleure accessibilité des fibres aux traitements ultérieurs et une meilleure dégradation. Selon ce mode de réalisation particulier, la paille de blé peut préalablement subir un hachage, une lacération ou défibrage, ou encore un broyage.

30 **La seconde étape du procédé selon l'invention consiste à effectuer un prétraitement chimique de la paille de blé.**

35 Le prétraitement chimique permet notamment une réduction importante de la rigidité des structures végétales, un gonflement des parois et leur pénétration par les électrolytes et les enzymes cellulolytiques des microorganismes du rumen. Les microorganismes peuvent ainsi coloniser plus rapidement les particules végétales qui sont alors dégradées plus vite et de manière plus intense, améliorant ainsi la dégradation.

Le prétraitement chimique mis en œuvre dans le procédé de l'invention est un prétraitement réalisé par une solution alcaline tel que classiquement mis en œuvre par l'homme du métier. Ainsi, le prétraitement chimique peut être réalisé par une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH), de soude, de chaux, d'hydroxyde de potassium (KOH), d'ammoniaque anhydre (NH₃), d'ammoniaque aqueux (NH₄OH), d'urée ou un mélange de ces composés. 5 Préférentiellement, le prétraitement chimique mis en œuvre à l'étape b) est réalisé avec une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH).

De plus, le prétraitement chimique peut être effectué de différentes manières selon les techniques connues de l'homme du métier, qu'elles soient industrielles ou non. Ainsi, le 10 prétraitement chimique peut être effectué en voie humide, en voie semi-humide, en voie semi-sèche, ou en voie sèche. Selon un mode de réalisation particulier, lorsque le prétraitement est effectué en voie humide ou semi-humide, il peut être appliqué par pulvérisation ou encore par trempage.

En fonction de la manière dont le traitement est effectué, l'homme du métier adaptera la 15 concentration de la solution alcaline, tout comme les temps d'incubation post-traitement (cf. Chenost et Kayouli. 2.3. Les traitements chimiques. Dans : *Utilisation des fourrages grossiers en régions chaudes*. Rome, 1997. Étude FAO - Production et santé animales – 135. ISBN 92-5-203981-3).

Pour un prétraitement avec une solution de soude en voie semi-humide, ladite solution peut 20 être concentrée de 1,6 à 5% puis mélangée à raison de 1 à 3 L/kg de paille de blé. La paille de blé peut alors être distribuée aux animaux 24 à 48 heures après le mélange.

Pour un prétraitement avec une solution de soude en voie semi-sèche, la mise au point d'une machine couplée à la prise de force d'un tracteur pour hacher et malaxer la paille est nécessaire. La solution de soude est concentrée de manière intermédiaire entre les voies 25 semi-humide et sèche, à 12% puis malaxée dans la machine avec la paille à raison de 0,4 L/kg de paille. Le temps d'action de la soude est d'environ 8 jours. La paille peut être séchée à l'air libre.

Pour un prétraitement en voie sèche, qui est un procédé industriel de traitement, la solution de soude est plus concentrée (16%). La solution est alors mélangée à la paille hachée à 30 raison d'environ 0,3 L/kg de paille de blé. Cette dernière est alors passée dans une presse à filière. L'action améliorante de la soude est très rapide (de 20 secondes à environ une minute) grâce la température et à la pression élevées régnant dans la filière.

Préférentiellement, le prétraitement chimique est effectué par voie semi-humide.

Une fois l'étape de prétraitement réalisée, le procédé selon l'invention comprend une étape d'alimentation d'un animal avec la paille prétraitée chimiquement.

Cette étape d'alimentation est une étape classique bien connue de l'homme du métier de l'élevage. Les animaux sont alors nourris avec la paille de blé prétraitée. D'une manière
5 préférentielle, les animaux sont des ruminants comme par exemple la vache ou le bœuf.

L'étape d'administration consiste à administrer l'additif ruminal enzymatique au ruminant de manière à ce que ce dernier se retrouve dans le reticulo-rumen dudit ruminant.

Un exemple d'administration de l'additif enzymatique est la voie orale.

Cette étape d'administration peut être réalisée avant, simultanément, ou après l'étape
10 d'alimentation du ruminant avec la paille de blé prétraitée chimiquement.

« Avant » l'étape d'alimentation signifie au maximum 24 heures avant. Ainsi l'additif enzymatique ne sera jamais administré plus de 24 heures avant l'administration de la paille de blé prétraitée chimiquement. De préférence l'additif ruminal enzymatique sera administré de 2 heures à 8 heures avant l'administration de la paille de blé prétraitée chimiquement.

15 De même, « après » l'étape d'alimentation signifie au maximum 24 heures après. Ainsi l'additif enzymatique ne sera jamais administré plus de 24 heures après l'administration de la paille de blé prétraitée chimiquement. De préférence l'additif ruminal enzymatique sera administré de 2 heures à 8 heures après l'administration de la paille de blé prétraitée chimiquement.

20 De préférence l'étape d'administration est réalisée simultanément à l'étape d'alimentation.

D'une manière tout à fait surprenante, les Inventeurs ont en effet constaté qu'une étape d'administration directe chez le ruminant, notamment par voie orale, d'un additif ruminal enzymatique permettait d'améliorer de façon significative la dégradation, voire même, de
25 créer une synergie sur la dégradation avec le prétraitement chimique de la paille de blé.

D'une manière tout à fait avantageuse, et à l'inverse de ce qui était connu jusqu'à présent, le procédé selon l'invention peut être appliqué à grande échelle sur l'ensemble d'un élevage et de manière peu onéreuse puisque l'enzyme n'est pas utilisée en prétraitement sur la paille mais est administrée directement à l'animal en tant qu'additif enzymatique. Cela permet de
30 réaliser des économies substantielles de temps et de coût. En effet, l'additif ruminal enzymatique est directement administré au ruminant avant, lors de l'alimentation ou après l'alimentation avec la paille de blé prétraitée chimiquement, et il n'est plus nécessaire de le pulvériser sur le stock entier de paille de blé ou la paille de blé à consommer prochainement. De cette manière, le procédé selon l'invention permet de s'affranchir des temps d'incubation
35 normalement nécessaires pour permettre à l'enzyme d'agir lorsqu'elle est utilisée en prétraitement de la paille de blé.

L'additif ruminal enzymatique est un mélange comprenant au moins deux enzymes. Les enzymes utilisées dans l'additif ruminal enzymatique peuvent être des glucanases, des xylanases, des estérases, ou des carboxyméthylcellulases.

- 5 Selon un mode de réalisation particulier, l'additif ruminal enzymatique est un mélange de glucanase et de xylanase, et en particulier d'endo-1,3(4)-bêta-glucanase et d'endo-bêta-1,4-xylanase.

L'enzyme endo-1,3(4)- β -glucanase est une préparation hautement concentrée de β -glucanase, obtenue par fermentation submergée d'une souche sélectionnée de *Trichoderma reesei*.
10

L'enzyme endo- β -1,4-xylanase est une préparation hautement concentrée de xylanase, obtenue par fermentation submergée d'une souche sélectionnée de *Trichoderma reesei*.

Selon la nomenclature EC des enzymes (Enzyme Commission number) :

- l'enzyme endo-1,3(4)- β -glucanase a le code EC 3.2.1.6,
- 15 - l'enzyme endo-1,4- β -xylanase a le code EC 3.2.1.8.

Selon ce mode de réalisation, la dose de glucanase peut être comprise entre 200 unités/g de paille et 7000 unités/g de paille, de préférence de 4000 unités/g de paille à 6000 unités/g de paille, comme par exemple environ 4670 unités/g de paille.

La dose de xylanase peut être comprise entre 200 unités/g de paille et 7000 unités/g de paille, de préférence de 4000 unités/g de paille à 6000 unités/g de paille, comme par
20 exemple environ 4670 unités/g de paille.

Les unités enzymatiques correspondent à la quantité d'enzyme nécessaire pour :

- libérer 1 μ mole de glucose par minute à pH 4,8 et 50°C, à partir d'un substrat de glucanes d'orge pour la glucanase ;
- 25 - libérer 1 μ mole de xylose par minute à pH 5,3 et 50°C, à partir d'un substrat de xylane de Birchwood pour la xylanase.

Toujours selon ce mode de réalisation, la glucanase peut être une endo-1,3(4)- β -glucanase et la xylanase peut être une endo- β -1,4-xylanase. Dans ce cas, et d'une manière
30 avantageuse, le rapport glucanase/xylanase est d'au moins 0,5, de préférence d'au moins 0,75, et tout particulièrement d'environ 1.

L'additif ruminal enzymatique se présente sous une forme adaptée à une administration animale. Ainsi, l'additif ruminal enzymatique peut être sous la forme de gélules, de bolus, de
35 poudre, de granulés ou encore liquide, comme par exemple dans des ampoules. De préférence, l'additif ruminal enzymatique est sous forme de poudre ou liquide, de préférence sous forme de poudre.

Une gélule ou capsule est une préparation solide, constituée d'une enveloppe dure ou molle de forme et de capacité variable.

Un comprimé ou un bolus est une préparation solide contenant une unité de prise d'un ou plusieurs principes actifs (ou préparation). Ils sont obtenus par compression d'un volume constant de particules. Destinés au bétail, ils deviennent plus gros et on les appelle alors bolus.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, lorsque l'additif ruminal enzymatique est administré simultanément avec la paille de blé prétraitée chimiquement, ledit additif ruminal enzymatique pourra se trouver sous forme de poudre que l'on mélangera avec la paille de blé prétraitée chimiquement. Le mélange est ensuite utilisé pour alimenter le ruminant.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le ruminant appartient à la famille des *Bovidae*. La famille des bovidés (*Bovidae*) comprend plusieurs sous-familles dont notamment les bovinés (dont font partie les bovins) et les caprinés (dont font partie les ovins et les caprins).

L'amélioration de la dégradation de la paille de blé peut être déterminée par les techniques connues de l'homme du métier comme par exemple par des mesures de la perte de matière sèche par incubation dans du liquide ruminal. Le détail des mesures est présenté dans la partie exemple ci-après.

Le procédé selon l'invention est particulièrement avantageux car il permet de manière surprenante une action synergique entre l'additif ruminal enzymatique et le prétraitement chimique de la paille de blé sur la dégradation de la paille de blé.

En effet, l'effet sur la dégradation ruminale est plus important que la somme des effets combinés du prétraitement chimique et de l'additif ruminal enzymatique seuls.

Aucun procédé connu jusqu'à présent n'améliorait la dégradation de la paille de blé à un niveau équivalent à l'amélioration apportée par le procédé selon l'invention.

Il est connu d'utiliser un prétraitement chimique, et notamment un prétraitement alcalin pour le traitement de la paille de blé afin d'en améliorer la digestibilité. Il est également connu d'utiliser un prétraitement enzymatique pour améliorer cette même digestibilité.

Jusqu'à présent, les traitements réalisés sur la paille, qu'ils soient chimiques ou enzymatiques étaient des prétraitements dans le sens où ils étaient réalisés avant l'ingestion par l'animal, par prétraitement de la paille de blé en elle-même.

Le prétraitement enzymatique est connu pour améliorer la digestibilité de la paille chez les animaux mais ce type de prétraitement n'est que peu utilisé car cela représente un coût trop élevé de pulvériser ou de prétraiter des lots entiers de pailles pour une alimentation ultérieure à l'animal. L'objectif de ces prétraitements est de parvenir à mieux potentialiser une source de nourritures peu valorisée jusqu'à présent. Or l'utilisation de prétraitements enzymatiques, quand bien même ces derniers se sont révélés intéressants pour l'amélioration de la digestibilité, n'a pas été développée dans le milieu agricole car le coût nécessaire d'un prétraitement enzymatique n'est pas compensé par le gain en terme alimentaire pour les animaux.

Il a déjà été prouvé dans l'art antérieur que la combinaison d'un prétraitement chimique et enzymatique de la paille pouvait améliorer la digestibilité de la paille et même présenter une synergie. Cependant, compte tenu des coûts du prétraitement enzymatique *in situ* ou *ex vivo* de la paille de blé, la combinaison des deux prétraitements n'a jamais été mise en œuvre à l'échelle des exploitations et était considérée jusqu'à présent comme inadaptée par l'homme du métier.

Il est donc du mérite de la présente invention d'avoir pu développer un procédé permettant une amélioration de la dégradation de la paille, ledit procédé pouvant être mis en œuvre à l'échelle d'un élevage sans présenter de surcroît de travail ou de surcoût dommageable. Au contraire, le procédé selon l'invention permet de potentialiser la paille de blé et permet ainsi aux animaux de présenter une meilleure digestion vis-à-vis de cet aliment qui constitue parfois une des ressources principales.

Grâce au procédé selon l'invention, la paille de blé est mieux valorisée et il est plus simple pour les élevages de tendre vers l'autosuffisance alimentaire sans engendrer de surcoût important.

Un second objet de l'invention concerne l'utilisation directe chez un ruminant d'un additif ruminal enzymatique avant, après ou simultanément à l'alimentation dudit ruminant avec de la paille de blé ayant préalablement subi un prétraitement alcalin, et de préférence simultanément à l'alimentation dudit ruminant, ce qui signifie que ledit additif enzymatique n'est pas utilisé en prétraitement sur la paille de blé.

Ledit additif ruminal enzymatique est un mélange enzymatique comprenant au moins deux enzymes. Les enzymes utilisées dans l'additif ruminal enzymatique peuvent être des glucanases, des xylanases, des estérases, ou des carboxyméthylcellulases.

Selon un mode de réalisation particulier, l'additif ruminal enzymatique est un mélange de glucanase et de xylanase et en particulier d'endo-1,3(4)-bêta-glucanase et d'endo-bêta-1,4-xylanase.

Selon ce mode de réalisation, la dose d'endo-1,3(4)- β -glucanase peut être comprise entre 200 unités/g de paille et 7000 unités/g de paille, de préférence de 4000 unités/g de paille à 6000 unités/g de paille, comme par exemple environ 4670 unités/g de paille.

5 De même, la dose d'endo- β -1,4-xylanase peut être comprise entre 200 unités/g de paille et 7000 unités/g de paille, de préférence de 4000 unités/g de paille à 6000 unités/g de paille, comme par exemple environ 4670 unités/g de paille.

D'une manière avantageuse, le rapport endo-1,3(4)- β -glucanase/endo- β -1,4-xylanase est d'au moins 0,5, de préférence d'au moins 0,75, et tout particulièrement d'environ 1.

10

L'additif ruminal enzymatique se présente sous une forme adaptée à l'administration animale. Ainsi, l'additif ruminal enzymatique peut être sous la forme de gélules, de bolus, de poudre, de granulés ou encore liquide, comme par exemple dans des ampoules. De préférence, l'additif ruminal enzymatique est sous la forme de poudre ou liquide, de préférence sous forme de poudre.

15

L'utilisation selon l'invention est particulièrement avantageuse car elle permet d'améliorer la dégradation de la paille de blé par les animaux. De plus, l'utilisation simultanée permet de créer un effet synergique sur la dégradation de la paille de blé.

20

L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples ci-après qui se veulent purement illustratifs et n'apportent en aucun cas une limitation.

FIGURES

25 **Figure 1** : Comparaison de l'effet d'un prétraitement aqueux seul (H_2O) ou alcalin seul (NaOH 5%), de l'utilisation d'un additif ruminal enzymatique seul (représenté ci-après par (GP + XP)x10) ou de la combinaison d'un prétraitement alcalin et d'un additif ruminal enzymatique (représenté ci-après par (NaOH 5% + (GP + XP)x10)) sur la dégradation de la matière sèche de la paille de blé (en pourcentage % de disparition/dégradation de la matière sèche de la paille de blé).

30

Les deux lignes pointillées représentent respectivement la valeur de la disparition/dégradation de la matière sèche de la paille de blé prétraitée à la soude (NaOH 5%) (ligne supérieure) et non prétraitée (contrôle (C)) (ligne inférieure).

35 **EXEMPLES**

Matériels et méthodes

1. Préparation des modules de fermentation

La paille de blé est broyée sur une maille de 2 cm (Electra) puis les particules fines sont éliminées grâce à un tamis de 1,18 mm (Penn State Separator).

Des fractions de 3 g sont ensuite pesées en triplicats et placées dans des flacons équipés d'un module de mesure de la pression (Ankom Technology).

2. Prétraitement

Un prétraitement est appliqué par voie semi-humide pendant 24 heures sur la paille avant incubation avec le jus de rumen. Deux types de prétraitement sont appliqués. Un prétraitement à l'eau (contrôle) et un prétraitement chimique.

Le prétraitement à l'eau est un témoin négatif. En effet, le pré-traitement est fait par une solution de soude dans de l'eau. Il faut donc d'une part (i) un contrôle négatif pré-traité par de l'eau uniquement et d'autre part (ii) un contrôle négatif sans pré-traitement pour ensuite dissocier l'effet de pré-traitement eau et celui de la soude, et donc de pouvoir conclure spécifiquement quant à l'effet de la soude en tant que pré-traitement.

Le prétraitement chimique est appliqué par mise en contact de la paille de blé avec une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 5 %. 9 ml de solution sont utilisés pour 3 g de paille de blé.

3. Additif

Afin de recréer les conditions *in vivo* de la co-administration de la paille de blé et de l'additif enzymatique selon le procédé de l'invention, l'additif est ajouté dans les modules au moment de l'incubation avec le liquide ruminal.

L'additif ruminal enzymatique est un mélange de deux enzymes selon un rapport 1:1 :

- une endo-1,3(4)-bêta-glucanase, ci-après GP, ayant une activité de 70000 unités/g et
- une endo bêta 1-4 xylanase, ci-après XP, ayant une activité de 70000 unités/g.

Les unités enzymatiques correspondent à la quantité d'enzyme nécessaire pour :

- libérer 1 μ mole de glucose par minute à pH 4,8 et 50°C, à partir d'un substrat de glucanes d'orge pour la glucanase ;
- libérer 1 μ mole de xylose par minute à pH 5,3 et 50°C, à partir d'un substrat de xylane de Birchwood pour la xylanase.

Dix doses du mélange enzymatique ((GP+XP) x10) correspond à 0,4 g du mélange enzymatique pour 3 g de paille, soit 0,2 g de GP et 0,2 g de XP pour 3 g de paille, soit 4670 unités (arrondi à la dizaine) de GP et XP pour 1 g de paille.

4. Obtention du liquide ruminal pour la fermentation

Le contenu ruminal est collecté environ 2 heures post repas chez des vaches laitières tarées, porteuses d'une canule ruminale et nourries avec une ration à base de paille de blé, d'ensilage de maïs et d'un supplément minéral et vitaminé.

- 5 Après la collecte, le contenu ruminal est filtré au travers d'un tamis métallique de maille 1,6 mm afin d'obtenir le liquide ruminal.

Le liquide ruminal est ensuite mélangé à une solution tampon pH = 7 (ratio 1:1) pour former le milieu d'incubation. Ce dernier est mis à buller avec du CO₂ exempt d'oxygène.

10 5. Préparation des modules de fermentation

Plusieurs modules sont préparés et répartis au sein de 4 essais. La composition des différents modules et leur répartition au sein des essais sont présentées ci-après.

Essai 1 : Paille de blé uniquement prétraitée

- 15
- 6 modules contenant de la paille prétraitée chimiquement avec une solution alcaline selon le protocole du point 2. ci-dessus ;
 - 3 modules contenant de la paille prétraitée selon le même protocole que le point 2. mais en remplaçant la solution alcaline par de l'eau ;
 - 3 modules témoin contenant uniquement de la paille, ci-après C.

20

Essai 2 : Paille de blé non prétraitée et additif ruminal enzymatique (cf. point 3. ci-dessus).

- 3 modules contenant de la paille non prétraitée et un additif ruminal concentré 10 fois ((GP+XP)x10) ;
- 3 modules témoin contenant uniquement de la paille, ci-après C.

25

Essai 3 : duplicata de l'essai 2 afin de valider et confirmer les résultats.

Essai 4 : Paille de blé prétraitée (cf. point 2.) et additif ruminal enzymatique (cf. point 3.)

- 30
- 6 modules contenant de la paille prétraitée chimiquement avec une solution alcaline selon le protocole du point 2. et un additif ruminal enzymatique concentré 10 fois ((GP+XP)x10) ;
 - 3 modules témoin contenant uniquement de la paille, ci-après C.

35

Pour chacun des essais, la paille non prétraitée correspond à de la paille prétraitée selon le même protocole que le point 2. mais en remplaçant la solution alcaline par de l'eau.

Pour chaque essai, 3 modules blancs sont réalisés. Ils contiennent uniquement du milieu d'incubation tel que décrit au point 4. du présent exemple.

Les flacons d'incubation reçoivent 200 ml de milieu d'incubation chacun puis sont saturés avec du CO₂ exempt d'oxygène. La quantité de paille, prétraitée ou non, au sein de chaque module est de 3 grammes.

5

6. Mesure de la matière sèche dégradée.

Les flacons sont incubés à 39°C pendant 96 heures pour permettre la fermentation.

Après 96 h d'incubation, les modules sont placés dans la glace afin de stopper la fermentation. La quantité de matière sèche non dégradée est ensuite mesurée en filtrant et séchant le résidu d'incubation à 60°C pendant 4 jours (ci-après nommé résidu).

10

Le substrat incubé correspond à la paille de blé prétraitée ou non prétraitée.

La disparition de la matière sèche (en pourcentage %) est calculée selon la formule ci-après :

15
$$[\text{substrat incubé} - (\text{résidu du substrat incubé} - \text{résidu du module de contrôle})] / \text{substrat incubé} \times 100$$

Que ce soit pour le substrat incubé, les résidus du substrat incubé ou du module de contrôle, il s'agit de la moyenne des résultats obtenus pour les modules d'un même traitement.

20

7. Analyse statistique

Les résultats de dégradation de la matière sèche (en pourcentages %) ont été soumis à une analyse de variance à l'aide du modèle univarié générale linéaire du logiciel de traitement statistique des données SPSS® (IBM®, SPSS®, version 22). Le modèle intègre les effets de la covariable et des produits, la covariable étant la dégradation de la matière sèche des contrôles (en pourcentage %). Une transformation log₁₀ des valeurs exprimées en pourcentage a été effectuée pour l'analyse.

25

Les résultats sont considérés comme non significatifs lorsque $P > 0,05$.

Les différentes lettres a, b, c, d utilisées dans la figure indiquent si des valeurs sont significativement différentes ou non. Ainsi, les résultats ne sont pas significativement différents lorsque la même lettre est reportée ($P > 0,05$).

30

Résultats

Effet de l'utilisation d'un prétraitement alcalin et d'un additif ruminal enzymatique

La figure 1 permet de mettre en évidence un effet significatif sur la dégradation ruminale de la matière sèche de l'utilisation d'un additif ruminal enzymatique sur de la paille de blé prétraitée à la soude (NaOH 5% + (GP + XP)x10).

35

Les résultats montrent qu'un prétraitement à la soude (5%) améliore la dégradation ruminale de la paille par rapport à (i) aucun pré-traitement et (ii) à un pré-traitement par de l'eau. Ces résultats confirment donc l'effet direct de la soude utilisée en pré-traitement sur la dégradabilité ruminale de la paille.

- 5 Le prétraitement à la soude permet d'améliorer la dégradation ruminale de la matière sèche de 22,3 points par rapport à de la paille de blé non prétraitée (contrôle).

Aucune augmentation significative de la consommation de matière sèche n'est cependant observée sur de la paille non prétraitée en présence d'une adjonction de l'additif ruminal enzymatique ((GP + XP) x10) par rapport à de la paille de blé non prétraitée (contrôle).

- 10 Par contre, d'une manière tout à fait surprenante, l'adjonction d'un additif ruminal enzymatique sur de la paille prétraitée chimiquement avec de la soude permet de mettre en évidence un effet synergique sur la dégradation ruminale de la matière sèche.

- 15 L'effet synergique s'entend comme le fait que la dégradation ruminale chez l'animal de la paille de blé prétraité chimiquement et en présence d'additif ruminal enzymatique est supérieure à la dégradation ruminale obtenue par un prétraitement chimique seul, par l'administration de l'additif enzymatique seule ou par les deux réunis mais œuvrant indépendamment.

- 20 En effet, l'adjonction de l'additif ruminal enzymatique ((GP + XP) x10) sur de la paille de blé prétraitée à la soude permet d'augmenter respectivement ladite consommation de 13,2 points.

Le procédé selon l'invention est donc particulièrement avantageux en ce qu'il permet d'améliorer de manière significative la dégradation ruminale de la paille de blé lorsque cette dernière est prétraitée chimiquement.

REVENDEICATIONS

1. Procédé d'amélioration de la dégradation ruminale de la paille de blé chez un ruminant comprenant les étapes suivantes :
 - 5 a) fourniture de la paille de blé,
 - b) prétraitement chimique de ladite paille fournie,
 - c) alimentation du ruminant avec la paille de blé prétraitée chimiquement à l'étape b),ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape d) d'administration
10 directe au ruminant d'un additif ruminal enzymatique, ce qui signifie que ledit additif enzymatique n'est pas utilisé en prétraitement sur la paille de blé.
2. Procédé selon la revendication 1 dans lequel le prétraitement chimique de l'étape b) est un prétraitement alcalin.
3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le prétraitement alcalin est un
15 prétraitement réalisé avec une solution d'hydroxyde de sodium, de soude, de chaux, d'hydroxyde de potassium, d'ammoniaque anhydre, d'ammoniaque aqueux, d'urée ou un mélange de ces composés, de préférence le traitement alcalin est réalisé avec une solution d'hydroxyde de sodium.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le
20 prétraitement chimique est effectué par voie humide, semi-humide, sèche ou semi-sèche, et de préférence par voie semi-humide.
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'étape d) d'administration directe de l'additif ruminal enzymatique est une administration par voie orale.
- 25 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'étape d) d'administration de l'additif ruminal enzymatique est réalisée avant, après ou simultanément à l'étape c) d'alimentation du ruminant avec la paille de blé prétraitée, de préférence simultanément à l'étape c).
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que
30 l'additif ruminal enzymatique est un mélange enzymatique comprenant au moins deux enzymes choisies parmi les glucanases, les xylanases, les estérases, ou les carboxyméthylcellulases.
8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'additif enzymatique est un mélange enzymatique comprenant une glucanase et une xylanase, de préférence une endo-
35 1,3(4)- β -glucanase et une endo- β -1,4-xylanase.
9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'endo-1,3(4)- β -glucanase est présente en une dose comprise entre 200 unités/g de paille et 7000 unités/g de paille, de

préférence de 4000 unités/g de paille à 6000 unités/g de paille, et encore plus préférentiellement 4670 unités/g de paille.

5 10. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'endo- β -1,4-xylanase est présente en une dose comprise entre 200 unités/g de paille et 7000 unités/g de paille, de
préférence de 4000 unités/g de paille à 6000 unités/g de paille, et encore plus
préférentiellement 4670 unités/g de paille.

10 11. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'endo-1,3(4)- β -glucanase et l'endo- β -1,4-xylanase sont présentes dans un rapport d'au moins 0,5, de préférence dans un rapport d'au moins 0,75 et encore plus de préférence dans un rapport 1:1 au sein du
mélange enzymatique.

12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'additif ruminal enzymatique est sous forme de poudre ou liquide, de préférence sous forme de poudre.

13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le ruminant appartient à la famille des *Bovidae*.

15 14. Utilisation directe chez un ruminant d'un additif ruminal enzymatique avant, après ou simultanément à l'alimentation dudit ruminant avec de la paille de blé ayant préalablement subi un prétraitement alcalin, de préférence simultanément à l'alimentation dudit ruminant, ce qui signifie que ledit additif enzymatique n'est pas utilisé en prétraitement sur la paille de blé.

20 15. Utilisation d'un additif ruminal enzymatique selon la revendication 14, caractérisée en ce que ledit additif ruminal enzymatique est un mélange enzymatique comprenant au moins deux enzymes choisies parmi les glucanases, les xylanases, les estérases, ou les carboxyméthylcellulases, de préférence une glucanase et une xylanase et encore plus de préférence une endo-1,3(4)- β -glucanase et une endo- β -1,4-xylanase.

25 16. Utilisation selon la revendication 15, caractérisée en ce que l'endo-1,3(4)- β -glucanase est présente en une dose comprise entre 200 unités/g de paille et 7000 unités/g de paille, de préférence de 4000 unités/g de paille à 6000 unités/g de paille, et encore plus préférentiellement 4670 unités/g de paille.

30 17. Utilisation selon la revendication 15, caractérisée en ce que l'endo- β -1,4-xylanase est présente en une dose comprise entre 200 unités/g de paille et 7000 unités/g de paille, de préférence de 4000 unités/g de paille à 6000 unités/g de paille, et encore plus préférentiellement 4670 unités/g de paille.

35 18. Utilisation selon la revendication 15, caractérisée en ce que l'endo-1,3(4)- β -glucanase et l'endo- β -1,4-xylanase sont présentes dans un rapport d'au moins 0,5, de préférence dans un rapport d'au moins 0,75 et encore plus de préférence dans un rapport 1:1 au sein du mélange enzymatique.

FIGURE 1