

EFFET D'UNE PROTEASE EXOGENE ET D'UNE COMBINAISON PROTEASE/CARBOHYDRASES SUR LA DIGESTIBILITE DES NUTRIMENTS CHEZ LE POULET

Romero Luis¹, Debicki-Garnier Anne-Marie², Messenger Bertrand³

¹DANISCO UK Ltd - PO Box 777 - SN81XN - MARLBOROUGH UK,

²DANISCO FRANCE - 22 rue Brunel - 75017 PARIS France,

³ALILIS NUTRITION ANIMALE - 23 avenue Henri Brulle - 33500 LIBOURNE France

anne-marie.debicki-garnier@dupont.com

RÉSUMÉ

L'utilisation de protéases dans les aliments pour les volailles s'est accrue ces dernières années. Ses principaux intérêts sont d'augmenter la digestibilité de la protéine, ce qui permet une réduction du taux de protéine et du coût des aliments, et de diminuer l'excrétion d'azote dans les fèces. Des effets positifs sont aussi attendus sur la santé des animaux. Des essais précédents comparant les résultats obtenus en poulet avec des aliments contenant des carbohydrases avec ou sans protéase ont montré que l'amélioration de la digestibilité iléale des acides aminés chez le poulet de 21 jours était linéairement corrélée avec la quantité d'acides aminés indigestibles. Cependant de nouveaux éléments ont permis de démontrer que l'effet de la protéase n'est pas limité à la protéine et aux acides aminés mais peut avoir un impact sur la digestibilité d'autres nutriments et dépend de la présence ou non d'autres activités enzymatiques telles les carbohydrases ou la phytase. Le possible rôle des protéases exogènes sur la digestion des nutriments a été étudié sur des poulets de 14 jours élevés dans des cages métaboliques et nourris avec des aliments à base de maïs contenant 12% de polysaccharides non-amylacés (PNA) à 80% insolubles auxquels étaient ajoutés différents taux de protéase ou protéase + carbohydrases. Des effets significatifs ont été mis en évidence sur la digestibilité des nutriments et le flux de PNA aux niveaux pré et post-caecal. La protéase a accru la dégradation des PNA insolubles par rapport au témoin. L'ajout de carbohydrases à la protéase s'est traduit par une dégradation plus importante des fibres. La meilleure dégradabilité a été observée pour les carbohydrases combinées avec la dose la plus élevée de protéase. Ces données suggèrent que la dégradation des fibres est un des mécanismes par lesquels la protéase améliore la digestion des nutriments chez les poulets. Cette action pourrait cependant dépendre des interactions avec la population microbienne dans l'intestin.

ABSTRACT

Effects of exogenous protease without or with carbohydrases on nutrient digestibility in broiler chickens

Use of exogenous proteases in poultry diets has increased in the last decade. The aim is to increase protein and amino acid digestibility of the diets, allowing a reduction in protein content hence feed cost savings, and to minimize nitrogen excretion in the feces. Positive effects are also expected on bird health. Previous studies comparing effect of carbohydrases without or with protease in broilers, showed that the improvement in ileal amino acid digestibility at 21 days of age was linearly correlated to indigestible amino acid content in the diet. However, recent data demonstrated that protease is not only efficient on protein and amino acid but can also impact digestibility of other nutrients, and its effect depends on presence or not of other enzymatic activities of which carbohydrases and phytase. This research aimed to study the role of exogenous protease on nutrient digestibility in 14 day old broilers reared in metabolic cages and fed with corn-based diets containing 12% non-starch polysaccharides (NSP) at 80 % insoluble to which were added incremental doses of protease or protease + carbohydrases. Significant effects on nutrient digestibility and flow of NSP were demonstrated at pre and post-caecal levels. Protease increased insoluble NSP degradation versus control. Addition of carbohydrases on top of protease increased even more fiber degradation. Carbohydrases with the highest dose of protease translated into the lowest NSP flow. It is suggested that fiber degradation is one of the mechanisms by which protease is able to improve nutrient digestibility in broilers. However, this effect would depend on interactions with intestinal microbiota.

INTRODUCTION

L'utilisation de protéases dans les aliments pour les volailles s'est accrue ces dernières années. Ses principaux intérêts sont d'augmenter la digestibilité de la protéine, ce qui permet une réduction du taux de protéine et du coût des aliments, et de diminuer l'excrétion d'azote dans les fèces. Des essais précédents comparant les résultats obtenus en poulet avec des aliments contenant des carbohydrases avec ou sans protéase ont montré que l'amélioration de la digestibilité iléale des acides aminés chez le poulet de 21 jours était linéairement corrélée avec la quantité d'acides aminés indigestibles (Romero et al., 2013, 2014). Cependant de nouveaux éléments ont permis de démontrer que l'effet de la protéase n'est pas limité à la protéine et aux acides aminés mais que la protéase peut avoir un impact sur la digestibilité d'autres nutriments. Les protéines font partie intégrante de la structure des parois cellulaires des matières premières végétales. Des recherches effectuées en ruminant, *in vitro* et *in vivo*, ont démontré la capacité de protéases exogènes à augmenter la solubilisation et la fermentation de l'hémicellulose des céréales et de la luzerne (Colombatto et al., 2009). Les auteurs postulaient que ces résultats pouvaient s'expliquer par un clivage des protéines contenues dans les parois cellulaires, permettant un accès plus rapide des microbes du rumen aux substrats. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet d'une protéase subtilisine, avec ou sans apport de carbohydrases, sur la digestibilité iléale et fécale de l'énergie et de l'azote, ainsi que la digestibilité des polysaccharides non-amylacés (PNA) chez des poulets nourris avec des aliments à base de maïs.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Protocole expérimental

Des poulets mâles Ross 308 (n = 288) ont été élevés en groupe et nourris avec un aliment standard répondant aux besoins en énergie et nutriments recommandés pour cette souche. A 14 jours, les oiseaux ont été pesés et répartis sur poids homogène dans 48 cages métaboliques, qui consistaient en 6 traitements, avec 8 répétitions par traitement et 6 poulets par répétition. Les 6 traitements étaient : un témoin négatif (TN, tableau 1) à base de maïs, drèches de maïs, tourteaux de soja et colza, répondant aux recommandations de Ross excepté pour l'énergie (95% du besoin), ce témoin plus une protéase issue de *Bacillus subtilis* à 5000 unités/kg (P5000), ou à 10000 unités/kg (P10000), ou une préparation commerciale (XAP, Danisco Animal Nutrition, Dupont) contenant 2000 unités/kg de xylanase issue de *Trichoderma reesei*, 200 unités/kg d'amylase issue de *Bacillus licheniformis*, et 5000 unités/kg de la protéase, ajoutée à 50 (XAP2500), 100 (XAP5000) et 200% (XAP10000). Du dioxyde de titane (TiO₂) était ajouté aux aliments comme marqueur indigestible à 0.3%.

Tableau 1 : Composition et valeurs analytiques du régime témoin négatif (TN)

Composition (g/kg)	
Maïs	501,1
Drèches de maïs	100,0
Tourteau de soja	288,3
Tourteau de colza	50,0
Huile de soja	21,6
L-lysine HCl	3,3
DL-méthionine	2,8
L-thréonine	1,2
Dioxyde de titane	3,0
Sel	3,3
Carbonate de calcium	10,9
Phosphate bicalcique	11,5
Prémix minéraux-vitamines	3,0
Nutriments analysés (g/kg)	
Protéines	210,0
Energie brute (Kcal/kg)	4043
Calcium	10,9
Phosphore total	7,0
Amidon	350,0
Sucres totaux	7,2
PNA ¹ solubles	24,7
PNA insolubles	97,7

¹ PNA=polysaccharides non-amylacés

Les fèces ont été collectés les jours 19 et 20 et les contenus iléaux le jour 21. Les digesta ont été regroupés par cage (n = 6 par cage), soit 8 échantillons par traitement, et congelés immédiatement après collecte et lyophilisés. Le titane, la matière sèche, l'azote, la matière grasse, les minéraux, l'énergie brute et les PNA ont été analysés dans les aliments, les contenus iléaux et les fèces. Les analyses chimiques ont été réalisées selon les méthodes AOAC (2006) sauf indication contraire. La concentration en titane a été déterminée selon la méthode de Short et al. (1996), la matière sèche par séchage dans un four à 105°C pendant 24 heures (méthode AOAC 934.01), l'azote par la méthode de combustion (méthode 968.06), la matière grasse par extraction (méthode 922.06), l'énergie brute dans une bombe calorimétrique (Modèle 6200, Parr Instruments, Moline, IL) et les PNA selon la méthode de Englyst et al. (1994).

1.2. Calculs et analyse statistique

Le calcul des quantités de PNA a été effectué à partir de la concentration en titane et en PNA de l'aliment, des contenus iléaux ou des fèces. Les données ont été soumises à une analyse de variance en utilisant la

procédure MIXED de SAS, avec la cage comme unité expérimentale. Les différences significatives entre moyennes ont été identifiées par le test des contrastes orthogonaux.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

L'ajout d'enzymes a eu un effet significatif ($P < 0.01$) sur la digestibilité de tous les nutriments et sur l'utilisation de l'énergie au niveau iléal et fécal, excepté pour la matière grasse au niveau iléal. L'utilisation iléale et fécale de la matière sèche et de l'azote et l'utilisation fécale de l'énergie était supérieure avec XAP5000 par rapport à P5000. Pour ce qui concerne les minéraux, seule la digestibilité du phosphore était significativement meilleure avec XAP10000 comparé à P10000 (tableau 1). Les quantités des composants des PNA au niveau iléal sont présentées dans le tableau 2. La supplémentation enzymatique a réduit significativement ($P < 0.05$) la quantité de PNA et en particulier de leur partie insoluble. XAP5000 a diminué ($P < 0.05$) la quantité de xylose et d'arabinose insolubles et a eu tendance à diminuer la quantité de glucoses insolubles ($P < 0.10$) par rapport à P5000. XAP10000 a eu tendance à réduire ($P < 0.10$) la quantité de xylose, glucose et arabinose insolubles par rapport à P10000. Au niveau fécal, l'ajout d'enzymes a diminué la quantité de PNA, tout particulièrement des composants insolubles. L'étude par contrastes a permis de mettre en évidence un effet significatif ($P < 0.05$) de XAP par rapport au témoin et une tendance de XAP5000 et 10000 à réduire le glucose insoluble par rapport à P5000 et 10000.

Cette étude a montré que la combinaison enzymatique XAP permettait une digestibilité de l'azote supérieure à celle observée avec l'ajout de protéase seule. Cependant un plateau était observé entre XAP5000 et XAP10000, la réponse à XAP5000 étant très proche de celle de P10000. La digestibilité de l'azote semblait donc atteindre un palier et l'effet de l'ajout des carbohydrases à la protéase n'était pas additif. Il en était de même pour l'EMA. Dans une étude précédente Romero et al. (2013) ont observé une augmentation marginale de l'EMAn avec l'addition de 5000 U/kg de la même protéase chez des poulets à 21 jours d'âge, qui s'expliquerait par le contenu calorique de la fraction de protéines digestibles additionnelle due à l'addition de protéase. Dans une autre étude, Romero et al. (2014) ont mis en évidence une augmentation de l'EMAn avec l'addition de cette protéase en plus de xylanase et amylase, chez des poulets nourris avec des aliments à base de maïs ou de

blé, à 21 et 42 jours d'âge. L'amélioration était plus importante chez les poulets plus âgés et nourris avec des aliments à base de blé, en particulier quand les aliments contenaient aussi des drèches de maïs et du tourteau de colza. Une des conclusions de l'étude était que l'amélioration de l'EMAn avec l'addition de protéase ne pouvait pas être expliquée par une amélioration de la digestibilité de l'amidon, de la matière grasse et de la protéine uniquement. L'auteur suggérait alors un possible effet de la protéase sur le flux des PNA, qui n'a pas été mesuré dans cette étude. Dans la présente étude, la quantité de certains sucres, de leurs fractions solubles et insolubles, ont été mesurés dans les contenus iléaux et fécaux, des valeurs inférieures au témoin indiquant une plus grande hydrolyse pour le régime concerné. D'une manière générale les quantités de PNA étaient inférieures dans les régimes contenant XAP par rapport à ceux contenant la protéase seule. Cet effet des enzymes exogènes sur la dégradation des PNA a été rapporté dans la littérature (Kocher et al., 2002 ; Barekatin et al., 2013). Au niveau iléal, XAP a réduit la quantité de xylose et d'arabinose insolubles, qui constituent la grande majorité de l'hémicellulose dans le maïs et les drèches de maïs, indiquant une augmentation de la solubilisation des polymères d'arabinoxylanes dans l'intestin grêle. Dans le maïs, les fibres et la protéine sont entremêlées et l'ajout d'une protéase seule pourrait n'avoir qu'un effet limité sur l'hydrolyse des PNA (Cowieson, 2010). La protéase contribue à l'ouverture de la structure tridimensionnelle de l'hémicellulose et la xylanase en augmente la solubilisation. L'effet de la protéase au niveau fécal est probablement lié à l'activité des bactéries de l'intestin.

CONCLUSION

Les résultats de cette étude confirment les résultats de l'étude utilisant des modèles ruminant *in vitro* et *in vivo* (Colombatto et al., 2009). Les auteurs suggéraient que la protéase subtilisine, en clivant les protéines structurales des parois, permettaient un accès plus rapide des microbes du rumen aux substrats. L'étude présentée dans cet article a permis de démontrer que la dégradation des fibres est un des mécanismes par lesquels la protéase améliore la digestion des nutriments chez les poulets. L'ajout de carbohydrases à la protéase s'est traduit par une dégradation plus importante des fibres. La meilleure dégradabilité a été observée pour les carbohydrases combinées avec la dose la plus élevée de protéase.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Barekatin M.R., Antipatis C., Choct M., Iji P.A., 2013. *Animal Feed Science and Technology* (182) 71-81
2. Colombatto D., Beauchemin K. A., 2009. *J. Anim. Sci.*, (87) 1097-1105
3. Cowieson A. J., Bedford M. R., Ravindran V., 2010. *British Poultry Science*, (51:2), 246-257
4. Kocher A., Choct M., Porter M.D., Broz J., 2002. *British Poultry Science*, (43:1), 54-63
5. Romero L. F., Parsons C.M., Utterback P. L., Plumstead P. W., Ravindran V., 2013. *Anim. Feed Sci. Technol.*, (181), 35-44
6. Romero L. F., Sands J. S., Indrakumar S. E., Plumstead P. W., Dalsgaard S., Ravindran V., 2014. *Poultry Science*, (93), 1-13

Tableau 1. Utilisation des nutriments par des poulets recevant des aliments supplémentés avec des doses croissantes d'enzymes contenant une activité protéase seule ou en combinaison avec une xylanase et une amylase (unités : % pour tous les paramètres sauf l'EMA en kcal)

Aliment		1	2	3	4	5	6	SEM ¹	Effet de	Contrastes			
Description ²		TN	P5000	P10000	XAP2500	XAP5000	XAP10000		l'aliment	2 vs. 5	3 vs. 6	1 vs 2, 3	1 vs. 4, 5, 6
Digestibilité iléale	MS	59,7	61,6	63,9	62,5	64,3	65,9	0,761	< 0,001	0,018	0,080	0,002	< 0,001
	Azote	69,7	72,0	74,4	73,3	76,2	76,5	0,811	< 0,001	0,001	0,076	0,001	< 0,001
	MG	83,5	83,8	84,1	84,5	85,9	83,9	0,962	0,532	0,119	0,855	0,705	0,263
Digestibilité Fécale	MS	59,9	61,2	64,2	62,3	64,8	65,5	0,622	< 0,001	< 0,001	0,145	0,001	< 0,001
	Azote	49,7	51,7	56,7	54,6	58,4	58,5	1,068	< 0,001	< 0,001	0,245	0,002	< 0,001
	EMA	2415	2453	2592	2482	2622	2597	26,4	< 0,001	< 0,001	0,880	0,002	< 0,001
	P	32,1	35,6	37,0	38,0	37,0	42,1	1,016	< 0,001	0,344	0,001	0,002	< 0,001
	Ca	38,0	41,5	41,7	35,9	39,1	42,0	1,051	< 0,001	0,112	0,808	0,009	0,429
	Na	45,9	48,0	46,7	32,6	38,5	41,9	2,394	< 0,001	0,008	0,163	0,625	0,005

¹ Erreur standard à la moyenne² TN – Témoin négatif; P5000 – 5,000 PU de protéase /kg; P10000 – 10,000 PU de protéase /kg; XAP2500 – XAP avec 2,500 PU de protéase /kg; XAP5000 – XAP avec 5,000 PU de protéase /kg; XAP10000 – XAP avec 10,000 PU de protéase /kg

MS : matière sèche; MG : matière grasse; EMA : énergie métabolisable apparente

Tableau 2. Quantités de polysaccharides non-amylacés (%) en réponse à des aliments contenant des doses croissantes d'enzymes contenant une activité protéase seule ou en combinaison avec une xylanase et une amylase

Aliment		1	2	3	4	5	6	SEM ¹	Effet de l'aliment	Contrastes			
Description ²		TN	P5000	P10000	XAP2500	XAP5000	XAP10000			2 vs. 5	3 vs. 6	1 vs 2, 3	1 vs. 4, 5, 6
Xylose	Soluble	0,193	0,165	0,212	0,179	0,206	0,229	0,032	0,757	0,365	0,720	0,911	0,761
	Insoluble	2,50	2,51	2,28	2,37	2,23	2,14	0,056	0,000	0,001	0,086	0,137	< 0,001
	Total	2,69	2,68	2,49	2,55	2,44	2,37	0,060	0,003	0,009	0,155	0,166	0,002
Glucose	Soluble	0,282	0,302	0,329	0,281	0,298	0,381	0,049	0,702	0,956	0,455	0,585	0,507
	Insoluble	2,90	2,87	2,66	2,72	2,62	2,45	0,087	0,008	0,051	0,090	0,207	0,004
	Total	3,18	3,17	2,99	3,00	2,92	2,83	0,075	0,012	0,023	0,137	0,268	0,004
Arabinose	Soluble	0,396	0,554	0,424	0,476	0,470	0,503	0,052	0,352	0,264	0,293	0,157	0,159
	Insoluble	2,35	2,28	2,09	2,14	2,05	1,94	0,060	< 0,001	0,011	0,073	0,030	< 0,001
	Total	2,74	2,83	2,51	2,61	2,52	2,44	0,066	0,001	0,002	0,443	0,368	0,007
Galactose	Soluble	0,938	0,888	0,863	0,878	0,803	0,833	0,037	0,179	0,110	0,565	0,171	0,023
	Insoluble	1,55	1,56	1,41	1,39	1,44	1,27	0,069	0,028	0,239	0,157	0,441	0,028
	Total	2,49	2,45	2,27	2,27	2,25	2,10	0,084	0,029	0,099	0,161	0,221	0,006

¹ Erreur standard à la moyenne² TN – Témoin négatif; P5000 – 5,000 PU de protéase /kg; P10000 – 10,000 PU de protéase /kg; XAP2500 – XAP avec 2,500 PU de protéase /kg; XAP5000 – XAP avec 5,000 PU de protéase /kg; XAP10000 – XAP avec 10,000 PU de protéase /kg