



HAL
open science

Dynamique et intensité de biotransformation dans le rumen

Amélie Serment

► **To cite this version:**

Amélie Serment. Dynamique et intensité de biotransformation dans le rumen. Sciences agricoles. AgroParisTech, 2012. Français. NNT : 2012AGPT0045 . pastel-00802657v2

HAL Id: pastel-00802657

<https://pastel.hal.science/pastel-00802657v2>

Submitted on 20 Mar 2013

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 : Sciences animales

présentée et soutenue publiquement par

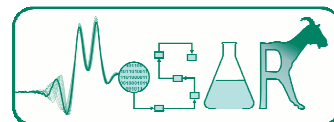
Amélie SERMENT

Le 29 juin 2012

Dynamique et intensité de biotransformation dans le rumen

Directeur de thèse : **Daniel SAUVANT**

Co-encadrement de la thèse : **Philippe SCHMIDELY**



Jury

M. Pierre NOZIERE, Directeur de Recherches, INRA, UMR1213 Herbivores, Theix
M. Michel DOREAU, Directeur de Recherches, INRA, UMR1213 Herbivores, Theix
M. Francis ENJALBERT, Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Mme Christelle LONCKE, Ingénieur R&D, INZO°
M. Daniel SAUVANT, Professeur, AgroParisTech
M. Philippe SCHMIDELY, Professeur, AgroParisTech
Mme Sylvie GIGER-REVERDIN, Chargée de Recherches, INRA, UMR 791 MoSAR

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Invitée

Dynamique et intensité de biotransformation dans le rumen

*Mots-clés : rumen, pourcentage de concentrés, chèvre laitière, production de gaz in vitro,
modélisation*

Pattern and extent of ruminal biotransformation

Keywords: rumen, percentage of concentrate, dairy goat, in vitro gas production, modelling

Amélie SERMENT

Travail réalisé

Sous la responsabilité scientifique conjointe de
D. Sauvant et P. Schmidely

UMR INRA-AgroParisTech 791 Modélisation Systémique Appliquée aux
Ruminants
16 rue Claude Bernard 75005 Paris, FRANCE

Table des matières

Remerciements	iv
Résumé	vi
Abstract	vii
Liste des tableaux	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations	xiii
Liste des publications	xv
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE	1
Introduction	3
I. Méthodes d'étude de la biotransformation des constituants de la ration dans le rumen 6	6
I.1. Méthodes <i>in vivo</i>	6
I.2. Méthode <i>in situ</i>	8
I.3. Méthodes <i>in vitro</i>	10
II. Dynamique du devenir des aliments dans le rumen.....	15
II.1. Ecosystème du rumen	15
II.2. Biotransformation des constituants de la ration dans le rumen : dégradation, synthèse et conversion.....	29
III. Modélisation mécaniste de la biotransformation dans le rumen	40
III.1. Typologies des modèles existants en nutrition des ruminants.....	40
III.2. Modèles mécanistes de rumen	41
IV. Influence du pourcentage de concentrés sur les biotransformations ruminales, comportement d'ingestion, performances zootechniques, rejets et qualité des produits	48
IV.1. Description des bases de données utilisées	48
IV.2. Effets du pourcentage de concentrés sur l'écosystème ruminal.....	51
IV.3. Effets du pourcentage de concentrés sur la biotransformation des constituants de la ration dans le rumen.....	59
IV.4. Effets du pourcentage de concentrés sur les performances zootechniques	62
IV.5. Effets du pourcentage de concentrés sur la composition des produits.....	65
V. Stratégie de la thèse.....	71
CHAPITRE 2 : ESSAI <i>IN VIVO</i>	75
Introduction	77
I. ARTICLE 1 : Effets du pourcentage de concentrés sur les fermentations ruminales, la digestibilité des nutriments, les métabolites plasmatiques et la composition du lait chez la chèvre laitière en milieu de lactation.....	81
II. ARTICLE 2 : Effets du pourcentage de concentrés sur les flux duodénaux de fibres, d'amidon et d'acides gras, et sur la biotransformation ruminale de monoterpènes chez la chèvre en milieu de lactation.....	107
III. ARTICLE 3 : Effet du pourcentage de concentrés sur la dynamique d'ingestion chez la chèvre en milieu de lactation.....	129
CHAPITRE 3 : ESSAIS <i>IN VITRO</i>	151
Introduction	153
I. ARTICLE 4 : Influence du pourcentage de concentrés sur les dynamiques de fermentation <i>in vitro</i>	155
II. ARTICLE 5 : Effets du pourcentage de concentrés et de la supplémentation en huile sur les fermentations <i>in vitro</i>	185

III. Complément : Partition du carbone et de l'hydrogène dans le rumen <i>in vitro</i> – approche stœchiométrique.....	211
CHAPITRE 4 : MODELISATION MECANISTE.....	219
ARTICLE 6 : Modèle mécaniste physico-chimique de fermenteur <i>in vitro</i> gaz-test : pH et production de gaz	221
CHAPITRE 5 : DISCUSSION GENERALE	235
I. Prise en compte de différentes échelles d'organisation spatio-temporelle.....	237
II. Effets du pourcentage de concentrés incorporés dans la ration sur les paramètres ruminiaux et les réactions de biotransformation ruminale	239
II.1. Essai <i>in vivo</i>	239
II.2. Essais <i>in vitro</i>	249
II.3. Conclusion.....	253
III. Relation avec l'animal-hôte : comportement d'ingestion, performances animales et qualité des produits.....	255
III.1. Ingestion et comportement d'ingestion.....	255
III.2. Production laitière et qualité du lait	257
IV. Vers une définition de la capacité de biotransformation du rumen ?.....	263
V. Approfondissement de la compréhension et la représentation de la thermodynamique du rumen et de la partition de carbone dans le rumen.....	264
V.1. Apport des essais <i>in vitro</i>	264
V.2. Apport du modèle <i>in vitro</i>	265
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	269
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	275
ANNEXES.....	299
Annexe 1 : Liste des publications : modèles de rumen	301
Annexe 2 : Liste des publications : bases de données « pourcentage de concentrés chez les caprins »	305
Annexe 3 : Communications à des congrès (posters et abstracts).....	307

Remerciements

Je remercie M. Michel DOREAU (UMR1213 Herbivores, INRA) et M. Francis ENJALBERT (ENV Toulouse) pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail, M. Pierre NOZIERE (UMR1213 Herbivores, INRA), pour avoir accepté de présider ce jury et Mme Christelle LONCKE (INZO°) d'y avoir participé en tant qu'examinatrice.

Je tiens également à remercier M. Stefan JURJANZ (ENSAIA, UR AFPA) et Mme Claire LAUNAY (INZO°) d'avoir participé à mes comités de thèse.

Un grand merci à mes deux directeurs de thèse, M. Daniel SAUVANT et M. Philippe SCHMIDELY, professeurs à AgroParisTech, pour leurs conseils éclairés et leur aide pour l'orientation, la construction et la réalisation de ce projet. J'ai beaucoup appris à leur côté pendant la durée de cette thèse.

Je remercie également Mme Sylvie GIGER-REVERDIN (INRA) et M. Laurent BROUDISCOU (INRA), ainsi que M. Patrick CHAPOUTOT (AgroParisTech), membres de mon comité de thèse et collègues de l'équipe « digestion et qualité des aliments » de l'UMR MoSAR pour leurs conseils, leur aide lors des expérimentations ou l'analyse des échantillons et leur relecture de mes textes. Un grand merci en particulier à Sylvie, ma voisine de bureau, qui, du fait de la proximité, mais surtout de sa disponibilité et sa gentillesse, a été la personne que j'ai le plus sollicitée pour des questions en tout genre.

Je remercie M. Nicolas FRIGGENS, directeur de l'UMR INRA-AgroParisTech MoSAR, pour sa disponibilité et d'avoir accepté à plusieurs reprises d'être mon relecteur « native English ».

Je tiens à remercier les personnes qui ont participé à l'excellent déroulement et la réussite de mes deux expérimentations :

- le personnel de la chèvrerie expérimentale de Grignon : Jean-Paul BONTE, Jérôme CHEVALLIER, Gaston DURANDET, Alexandra EYMARD, Anne SEVERIN, et Joseph TESSIER pour leur accueil chaleureux et leur aide précieuse.
- Jean-Luc LE-PIERRES pour ses énormes coups de main, mais aussi pour m'avoir fait profiter de son « réseau » sur Grignon pour de nombreux dépannages de matériel.
- et Ophélie DHUMEZ, qui m'a épaulé techniquement sur mes deux expérimentations et qui a analysé un grand nombre de mes échantillons. Je tiens à la remercier plus particulièrement pour les deux éprouvantes semaines grignonnaises passées ensemble, 24 h sur 24, à remplir et à vider des seringues !

J'adresse également mes remerciements à Hélène ALBARELLO, Louise PERICARD et Françoise TERNOIS pour l'analyse de mes échantillons. Je remercie particulièrement Françoise, qui, pendant ces années de thèse, n'a jamais oublié de m'offrir des fleurs ou du chocolat à Noël, à Pâques et à mon anniversaire !

Je remercie également les membres ou ex-membres de l'UMR MoSAR / UFR Nutrition Animale, Qualité des Produits et Bien-être non cités précédemment (j'espère n'oublier personne) : Hyacinthe ADOLPHE, Valérie BERTHELOT, Marianne CARRIERE, André COYAT, Marion DESNOYERS, Frédéric DOUHARD, Martine DUSPIWA, Christine DUVAUX-PONTER, Hans ERHARD, Angélique FAVREAU-PEIGNE, Souzan GHAZAL, Phuong HO NGOC, Bérangère LAPORTE-BROUX, Olivier MARTIN, François MESCHY, Pierre MORAND-FEHR, Ghislaine PAINS, Marie-Paul POULIN, Laurence PUILLET, Karim RIGALMA, Virginie RIVERA TORRES, Pierre-Emmanuel ROBERT, Sabine ROUSSEL, Jacques SERVIERE et Frauke UDE. Même s'ils n'ont pas directement travaillé sur ce projet, ils m'ont débloqué des problèmes administratifs, de photocopieuse ou d'ordinateur, ou ont discuté avec moi de questions scientifiques ou d'autres sujets.

Pendant la réalisation de cette thèse, un pourcentage assez conséquent de mon temps a été consacré à l'enseignement. Je remercie mes collègues enseignants-chercheurs de l'UFR Nutrition Animale, Qualité des Produits et Bien-être, et plus globalement le collectif « Sciences animales » de l'Agro : Thierry BONAUDO, Emmanuelle BOURGEAT, Viviane CAVARROC, Fabienne DEDOLE-PORCHEROT, Thomas HEAMS, Grégoire LEROY, Jean LOSSOUARN, Catherine MARIOJOULS, Xavier ROGNON, Marie SAINT-DIZIER et Etienne VERRIER. Merci de m'avoir aidé dans cette activité et d'avoir veillé à ce que je n'y perde pas trop de temps, car j'avais une thèse à écrire !

J'ai une pensée particulière pour Marie VARLOUD, qui m'a convaincue de me lancer dans cette aventure et qui m'a « coachée » pour la préparation au concours d'AERC.

Je remercie ma famille et mon compagnon pour leur soutien... je les soupçonne de s'être inquiétés pour moi. Je les remercie d'avoir tout fait pour me le cacher ! Un grand merci à mes amis (Ardennais, ex-Agro, nouveaux rencontrés au cours de cette thèse, en particulier la Marianne's team) d'avoir été là pendant et j'espère encore longtemps après cette thèse.

Résumé

La « biotransformation ruminale » est un concept qui regroupe l'ensemble des réactions se produisant dans le rumen (dégradation, synthèse et conversion). Ces réactions sont pilotées par trois forces motrices majeures : les lois de la cinétique chimique, de la thermodynamique et de la dynamique des populations microbiennes. Cette thèse a pour objectif d'étudier l'impact d'un facteur alimentaire (pourcentage de concentrés incorporés dans la ration, supplémentation en huile) sur le fonctionnement du rumen et la biotransformation ruminale des constituants alimentaires en termes de dynamique et d'intensité. Cette thèse a combiné trois types d'approches : un essai *in vivo* sur des chèvres en milieu de lactation, deux essais *in vitro* (méthode du gaz-test) et une approche de modélisation mécaniste. *In vivo*, les réactions de biotransformation ont été évaluées par un suivi de la dynamique postprandiale et des mesures de bilans duodénaux. De plus, nous avons étudié l'influence réciproque des phénomènes ruminiaux et de l'animal-hôte (comportement d'ingestion, métabolisme, paramètres zootechniques, et qualité du lait) sur le long terme (6 semaines). Nos résultats sont en accord avec la plupart des études antérieures effectuées chez la chèvre ou la vache laitières. Les modifications du comportement d'ingestion observées après 6 semaines avec le régime riche en concentrés ont eu un effet sur les phénomènes digestifs ruminiaux. Les flux duodénaux d'acides gras ont expliqué les profils en acides gras du lait. Les études *in vitro* ont donné des résultats très cohérents par rapport à l'*in vivo* lorsque les animaux donateurs recevaient les régimes incubés. Enfin, nous avons développé un modèle mécaniste de fonctionnement de rumen *in vitro* décrivant de manière spécifique les lois physico-chimiques expliquant les dynamiques d'évolution du pH et de formation de gaz. Ce modèle aboutit à des résultats satisfaisants et pourrait être intégré à un modèle de rumen plus complet. La modélisation semble être le meilleur moyen pour intégrer toutes les réactions de biotransformation observées lors d'expérimentations.

Abstract

“Ruminal biotransformation” is a concept aggregating all the reactions occurring in the rumen (degradation, synthesis and conversion). These reactions are driven by three major driving forces: laws of chemical kinetics, thermodynamics and the dynamics of microbial populations. The principal objective of the thesis was to study how a dietary factor (percentage of concentrate in the ration, oil supplementation) can modify rumen function and the ruminal biotransformation of dietary components in terms of pattern and extent. To answer to this question, three approaches were used: an *in vivo* experiment on mid-lactation goats, two *in vitro* experiments (with the gas-test method) and the development of a mechanistic model. *In vivo* biotransformation reactions were assessed by post-feeding measurements or by duodenal flow determination. Further, the relationships between the rumen and the host animal (intake behaviour, metabolism, performance parameters, and milk quality) were studied over a period of 6 weeks. Our results were consistent with previous reports in goats and dairy cows. Animals adapted their intake behaviour in 6 weeks with the high-concentrate diet. As a consequence, modifications of ruminal digestion patterns were observed. Duodenal flow of fatty acids explained the milk fatty acid profile. The *in vitro* studies gave consistent results with the *in vivo* study when donor animals were fed the incubated diets. Finally, a mechanistic model of rumen functioning in *in vitro* devices was developed. It describes specifically the physicochemical laws explaining pH and gas production patterns. This model gives satisfying results and could be integrated to a larger mechanistic model of rumen. Modelling provides a logical framework within which to mathematically integrate all the biotransformation reactions observed in experiments.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Equations d'ajustement des cinétiques de dégradation des constituants alimentaires dans le réticulo-rumen. D'après Sauvant et Van Milgen (1995).	10
Tableau 2 : Composition moyenne de la salive en tampon (mEq / L) chez le veau ruminant, la vache et le mouton. D'après Guilloteau et al. (1995) (1) et Bailey and Balch (1961) (2). ..	20
Tableau 3 : Principales équations stœchiométriques simplifiées des fermentations dans le rumen. D'après Offner et Sauvant (2006).	31
Tableau 4 : Composition moyenne en acides gras des bactéries du rumen (régimes non supplémentés en lipides). (Sauvant et Bas, 2001).	38
Tableau 5 : Caractéristiques des rations et des animaux de la base de données chèvre-zootecnique (17 articles).	49
Tableau 6 : Caractéristiques des rations et des animaux de la base de données chèvre-rumen (10 articles).	50
Tableau 7 : Equations de prédiction des flux duodénaux d'AGPI en fonction de l'ingestion d'AGI et effet du pourcentage de concentrés de la ration sur les coefficients des équations de prédiction. D'après Glasser et al. (2008b).	62
Tableau 8 : Réponses moyennes des chèvres aux variations du pourcentage de concentrés de la ration. D'après Sauvant et al. (2007).	63
Tableau 9 : Chronologie de l'étude in vivo.	78
Tableau 10 : Résumé du traitement des données de l'essai in vivo.	79
Tableau 11 : Résumé du traitement statistique des données de l'essai in vivo.	80
Tableau 12 : Dégradation de terpènes en milieu ruminal.	245
Tableau 13 : Comparaison de plusieurs études : ingestion et flux duodénaux d'AG totaux et de C18 totaux, taux de biohydrogénation des acides oléique, linoléique et linoléique.	248
Tableau 14 : Tableau comparatif des effets du pourcentage de concentrés sur les paramètres physico-chimiques ruminiaux dans les essais in vitro (Articles 4 et 5) et in vivo (Article 1).	249
Tableau 15 : Tableau comparatif des effets du pourcentage de concentrés sur les paramètres physico-chimiques ruminiaux dans les essais in vitro (association des substrats L et H avec soit l'inoculum L soit l'inoculum H) (Article 4) et in vivo (Article 1).	252

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique du tractus digestif d'une vache.	4
Figure 2 : Définition de la « biotransformation ruminale ».	5
Figure 3 : Choix à faire lors des étapes des méthodes in vitro « batch ».	14
Figure 4 : Nombre de cellules bactériennes associées aux fibres végétales pendant l'incubation in situ de tiges de foin de dactyle : de 0 à 120 min d'incubation (a) et de 2 à 96 h d'incubation (b).	16
Figure 5 : Relation entre la teneur en paroi végétale et la colonisation microbienne d'un aliment après 3 heures d'incubation in situ. D'après Yang (1991).	17
Figure 6 : Evolution de la teneur en polysaccharides des microorganismes du rumen après un repas. (Sauvant et Van Milgen, 1995).	17
Figure 7 : Zones de pH dans le rumen. (Rémond et al., 1995).	20
Figure 8 : Relation entre le flux de liquide au duodénum et le pH du rumen. (Sauvant et al., 2006).	20
Figure 9 : Relation entre l'indice de mastication et le pH du rumen. (Sauvant et al., 2008a).	21
Figure 10 : Evolution postprandiale générique du pH ruminal et variables descriptives potentielles. D'après Dragomir et al. (2008).	21
Figure 11 : Exemples de cinétiques postprandiales du potentiel redox (Eh).	23
Figure 12 : Relation entre le potentiel redox (Eh) et le pH ruminal.	23
Figure 13 : Exemples de cinétiques postprandiales de la pression osmotique chez la chèvre laitière.	23
Figure 14 : Variation de la composition en CO ₂ et CH ₄ des gaz du rumen chez des moutons adultes recevant en deux repas égaux par jour du foin de dactyle et un mélange foin de dactyle + maïs aggloméré. D'après Bouvier (1977) cité par Vermorel (1995).	25
Figure 15 : Variation du ratio CO ₂ / CH ₄ des gaz du rumen chez des moutons adultes recevant à volonté, en deux repas par jour, un foin de graminée distribué sous forme hachée ou sous forme condensée. D'après Bouvier (1977) cité par Vermorel (1995).	25
Figure 16 : Variation de la production de CH ₄ d'une vache laitière recevant, en deux repas par jour, une ration composé de 1/3 de foin long et 2/3 d'aliment concentré aggloméré. D'après Kirchgessner et al (1982) cité par Vermorel (1995).	26
Figure 17 : Evolution de la proportion en CH ₄ par rapport à la production de gaz total lors de l'incubation in vitro de 72 h de rations mixtes pour vaches laitières. D'après Getachew et al. (2005).	26
Figure 18 : Variations du profil en AGV molaire dans le jus de rumen de bovins. Issu de la base de données Bovidig. (Sauvant et al., 2011).	27
Figure 19 : Exemples de cinétiques postprandiales de la concentration en ammoniac chez la vache laitière recevant différentes rations mixtes. (Jarrige et al., 1978).	27

Figure 20 : Evolution de la masse et du volume de la MS résiduelle de particules issues de la digestion in vitro dans du liquide de rumen de brome (a), de foin de luzerne (b) et d'ensilage de luzerne (c). D'après Wattiaux et al. (1992).	28
Figure 21 : Evolution de la densité d'un foin de brome (Δ), d'un foin de luzerne (\circ) et d'un ensilage de luzerne(\bullet) au cours de leur digestion in vitro dans du liquide de rumen. D'après Wattiaux et al. (1992).	29
Figure 22 : Résumé des principales voies des fermentations ruminales des polymères glucidiques.	30
Figure 23 : Evolution de la quantité résiduelle de NDF de quelques aliments après incubation dans le rumen. (Chapoutot et al., 2010).	31
Figure 24 : Teneur en paroi végétale et vitesse de dégradation des glucides pariétaux de fourrages. (Sauvant et Van Milgen, 1995).	32
Figure 25 : Schéma des fermentations des glucides dans le rumen et des voies d'utilisation de l'hydrogène. D'après Morgavi et al. (2010).	33
Figure 26 : Incubation in vitro de larges (symbole blanc) et petites (symboles noirs) particules de maïs utilisées comme sources d'énergie respectivement lentes et rapides avec du tourteau de soja (carrés) et du tourteau de soja hydrolysé (cercle) utilisées comme sources d'azote respectivement lentes et rapides.	35
Figure 27 : Relation intra-expérience entre les teneurs en N-NH ₃ et en urée du sang ou du lait. (Sauvant et al., 2001).	35
Figure 28 : Principales voies connues ou probables de la biohydrogénation ruminale des acides linoléique et linolénique. D'après Chilliard et al. (2007).	37
Figure 29 : Biohydrogénation ruminale de l'acide linoléique: détail des voies du trans-11 et du trans-10. D'après Shingfield et Griinari (2007).	37
Figure 30 : Synthèse des acides gras impairs et ramifiés par les bactéries du rumen. D'après Vlaeminck et al. (2006).	38
Figure 31 : Représentations schématiques des phénomènes ruminiaux et composition en acides gras du lait. D'après Chilliard (2007).	39
Figure 32 : Evolution du nombre de publications sur la modélisation mécaniste du rumen au cours du temps.(voir Annexe 1 pour le détail des publications).	42
Figure 33 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur le pH ruminal chez la chèvre laitière (\approx 4 h après la distribution du repas).	52
Figure 34 : Représentation schématique des variations journalières du pH ruminal selon le mode de distribution de la ration. D'après Mould (1988).	53
Figure 35 : Effet de la nature de la ration (ration « Fibre » contenant 21,3 % concentrés vs. ration « Amidon » contenant 49,1 % concentrés) sur la relation entre le pH et le potentiel redox. (Marden, 2007).	53
Figure 36 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur la concentration ruminale d'AGV totaux chez la chèvre (\approx 4 h après la distribution du repas).	55
Figure 37 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur la proportion molaire en acétate du jus de rumen chez la chèvre laitière (\approx 4 h après la distribution du repas).	56

Figure 38 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur la proportion molaire en propionate du jus de rumen chez la chèvre laitière (\approx 4 h après la distribution du repas). .	56
Figure 39 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur la proportion molaire en butyrate du jus de rumen chez la chèvre laitière (\approx 4 h après la distribution du repas).	57
Figure 40 : Influence du pourcentage de concentrés sur la production de CH ₄ /kg de MOD. (Sauvant et al., 2011).....	57
Figure 41 : Relation intra-expérience entre le rapport acétate/propionate du jus de rumen et le rapport ECH ₄ %Ebrute. (Sauvant et al., 2011).	58
Figure 42 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur la concentration ruminale en ammoniac chez la chèvre laitière (\approx 4 h après la distribution du repas).	58
Figure 43 : Influence du pourcentage de concentrés dans la ration sur la digestion ruminale de l'amidon. (Archimède et al., 1997).	60
Figure 44 : Influence du pourcentage de concentrés dans la ration sur la digestion ruminale des parois. (Archimède et al., 1997).....	60
Figure 45 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur la synthèse microbienne ruminale. D'après Archimède et al. (1997).....	61
Figure 46 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur l'ingestion chez la chèvre laitière en lactation.....	63
Figure 47 : Influence du pourcentage de concentrés sur la durée de mastication chez la chèvre laitière. D'après Sauvant et Giger-Reverdin (2008a).....	64
Figure 48 : Effet de la proportion de concentrés dans la ration sur la production laitière chez la chèvre laitière.	65
Figure 49 : Effet de la proportion de concentrés dans la ration sur le taux butyreux du lait chez la chèvre laitière et la vache laitière.....	66
Figure 50 : Effet de la proportion de concentrés dans la ration sur les matières grasses du lait sécrétées chez la chèvre laitière.....	67
Figure 51 : Effet de la proportion de concentrés dans la ration sur le taux protéique du lait chez la chèvre laitière et la vache laitière.....	67
Figure 52 : Effet de la proportion de concentrés dans la ration sur les matières protéiques du lait sécrétées chez la chèvre laitière.	68
Figure 53 : Stratégie de la thèse.	73
Figure 54 : Descriptif de l'essai in vivo.	77
Figure 55 : Descriptif des essais in vitro.	153
Figure 56 : Niveaux d'organisation étudiés dans la thèse.....	237
Figure 57 : Paramètres mesurés pour étudier la biotransformation ruminale.	238
Figure 58 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur le pH ruminal chez la chèvre (\approx 4 h après la distribution du repas).	240
Figure 59 : Relation entre la concentration ruminale en AGV totaux et le pH ruminal (Article 1).	240
Figure 60 : Relation entre le pH et le potentiel d'oxydo-réduction dans le rumen (Article 1).	241

Figure 61 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur la concentration ruminale en AGV totaux (a), les proportions molaires en acétate (b), propionate (c) et butyrate (d) chez la chèvre (\approx 4 h après la distribution du repas).	242
Figure 62 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur la concentration ruminale en ammoniac chez la chèvre (\approx 4 h après la distribution du repas).	243
Figure 63 : Relation entre ingestion et flux duodénaux d'AG totaux chez la chèvre laitière (en g / j).	246
Figure 64 : Résumé de l'effet du pourcentage de concentrés sur la biotransformation ruminale.....	254
Figure 65 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur l'ingestion chez la chèvre laitière.	255
Figure 66 : Relation entre la chute de pH ruminal entre 0 et 3 h après la distribution du repas et la proportion d'aliments ingérés 90 minutes (P90) après la distribution du repas chez la chèvre laitière.	257
Figure 67 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur la production laitière chez la chèvre laitière.	257
Figure 68 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur le taux protéique (a), et les matières protéiques du lait secrétées (b) chez la chèvre laitière.	258
Figure 69 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur le taux butyreux (a), et les matières grasses du lait secrétées (b) chez la chèvre laitière.	259
Figure 70 : Relation entre flux duodénaux de C18 totaux et leur sécrétion dans le lait (en g / j).	260
Figure 71 : Relation entre flux duodénaux d'acides gras (% de C18 duodénaux) et leur sécrétion dans le lait (en % de C18 secrétés dans le lait) : cis-9, cis-12, cis-15 C18 :3 (a) ; cis-9, cis-12 C18 :2 (b), C18:0 et cis-9 C18:1 (c).	261
Figure 72 : Relation entre flux duodénaux de C18:1 trans (en % de C18 duodénaux) et leur sécrétion dans le lait (en % de C18 secrétés dans le lait) : trans-11 + cis-9, trans-11 (a), trans 10 (b).	263

Les autorisations d'exploitation des figures 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 16, 18, 19, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 35, 40, 41 et 47, des tableaux 1, 4 et 8, et des articles 1 et 6, obtenus auprès des éditeurs de revues ou livres dont ils sont issus, sont disponibles à l'adresse suivante :

Secrétariat des Etudes doctorales
 Direction Scientifique
 19 avenue du Maine
 75732 PARIS CEDEX 15
 fiers@agroparistech.fr

Liste des abréviations¹

English		Français	
<i>Abbreviation</i>	<i>Meaning</i>	<i>Abréviation</i>	<i>Signification</i>
A:P	Acetate / propionate ratio	A:P	Rapport acétate / propionate
AA	Amino Acid	AA	Acide Aminé
ADF	Acid Detergent Fiber (Van Soest)	ADF	Fibre au détergent acide
ADFom	Acid Detergent Fiber expressed exclusive of residual ash. It corresponds to lignocelluloses (Van Soest)	ADFom	Lignocelluloses ou fibre au détergent acide exprimée en excluant les cendres (Van Soest)
ADL	Acid Detergent Lignin (Van Soest)	ADL	Lignine obtenue par la méthode à l'acide sulfurique (Van Soest)
ANOVA	Analysis of variance	ANOVA	Analyse de la variance
ATP	Adenosine triphosphate	ATP	Adénosine triphosphate
BCVFA	Branched-Chain Volatile Fatty Acids	AGVbr	Acides gras volatils ramifiés
BH ₂	Rumen Biohydrogenation	BH ₂	Biohydrogénation ruminale
BHBA	BetaHydroxyButyrate	BHBA	BétaHydroxyButyrate
BW	Body Weight	PV	Poids Vif
CH ₄	Methane	CH ₄	Méthane
CLA	Conjugated Linoleic Acid	CLA	Acide Linoléique Conjugué
CO ₂	Carbon dioxide	CO ₂	Dioxyde de carbone
CP	Crude Protein	PB	Protéines Brutes
df	Degrees of freedom	ddl	Degrés de liberté
DIM	Days in milk	DIM	Nombre de jours de lactation
DM	Dry Matter	MS	Matière Sèche
DMI	Dry Matter Intake	MSI	Matière Sèche Ingérée
DOM	Digestible Organic Matter	MOD	Matière Organique Digestible
ED	Effective degradability	ED	Dégradabilité effective
FA	Fatty Acid	AG	Acide Gras
	Unsaturated fatty acid	AGI	Acide Gras Insaturé
	Polyunsaturated fatty acid	AGPI	Acide Gras Polyinsaturé
FCM	Fat-Corrected Milk	PLC	Production Laitière Corrigée
FOM	Fermentable organic matter	MOF	Matière Organique Fermentescible
GLM	Generalized Linear Model	GLM	Modèle Linéaire généralisé
HFT	Hohenheimer Futterwerttest	HFT	Méthode <i>in vitro</i> de l'Université d'Hohenheim pour estimer la valeur nutritive des aliments (Allemagne)

¹ Classée selon l'ordre alphabétique anglais, la traduction française a été mise en face.

English		Français	
<i>Abbreviation</i>	<i>Meaning</i>	<i>Abréviation</i>	<i>Signification</i>
MFC	Milk Fat Content	TB	Taux Butyreux du lait
MPC	Milk Protein Content	TP	Taux Protéique du lait
n	Number of samples	n	Nombre d'échantillons
N	Nitrogen	N	Azote
NDF	Neutral Detergent Fiber (Van Soest)	NDF	Fibre au détergent neutre (Van Soest)
aNDFom	NDF assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash (Van Soest)	aNDFom	Fibre au détergent neutre analysée avec de l'amylase résistante à la chaleur et exprimée en excluant les cendres (Van Soest)
NEB	Net Energy Balance	BE	Bilan énergétique (exprimé en énergie nette)
NEFA	Non Esterified Fatty Acids	AGNE	Acides Gras Non Estérifiés
NE _L	Net energy for lactation	UFL	Unité Fourragère Lait = 1 700 kcal = 7,115 MJ
NH ₃	Ammonia	NH ₃	Ammoniac
NS	Non significant	NS	Non Significatif
PDI	Proteins Digestible at the level of intestine	PDI	Protéines Digestibles dans l'Intestin
PDIE	Proteins Digestible at the level of intestine when energy is limiting	PDIE	Protéines Digestibles dans l'Intestin en situation d'énergie fermentescible limitante pour les microorganismes
PDIN	Proteins Digestible at the level of intestine when nitrogen is limiting	PDIN	Protéines Digestibles dans l'Intestin en situation d'azote fermentescible limitant pour les microorganismes
OM	Organic Matter	MO	Matière Organique
R ²	Coefficient of Determination	R ²	Coefficient de détermination
RMSE	Root Mean Square Deviation	ETR	Ecart-type résiduel
RMY	Raw Milk Yield	PL	Production Laitière brute
SAS	Statistical Analysis System	SAS	
SC	Soluble Carbohydrates	SS	Sucres solubles
SEM	Standard error of the means		Erreur-type de la moyenne
TCA	Trichloroacetic acid	TCA	Acide Trichloracétique
TMR	Total Mixed Ration		Ration mixte
VFA	Volatile Fatty Acid	AGV	Acide Gras Volatil

Liste des publications

Publications scientifiques (revues et colloques soumis à l'agrément d'un comité de lecture)

Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., **Serment, A.**, Broudiscou, L. P., 2011. Influences des régimes et de leur fermentation dans le rumen sur la production de méthane par les ruminants. INRA Productions Animales. 24 : 433-446.

Serment, A., Sauvant, D., 2010. A mechanistic model of pH and gas exchanges in the rumen and its *in vitro* application. In: Sauvant, D., Van Milgen, J., Faverdin, P. et Friggens, N. (eds.) 7th International Workshop on Modelling Nutrient Digestion and Utilisation in Farm Animals, Paris, France, 10-12 September, 2009. p 148-157. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

Serment, A., Schmidely, P., Giger-Reverdin, S., Chapoutot, P., Sauvant, D., 2011. Effects of the percentage of concentrate on rumen fermentation, nutrient digestibility, plasma metabolites and milk composition in mid-lactation goats. Journal of Dairy Science 94 : 3960-3972.

Serment, A., Giger-Reverdin, S., 2012. Effects of the percentage of concentrate on intake pattern in mid-lactation goats. Applied Animal Behaviour Science. <http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2012.08.004>

Serment, A., Broudiscou, L. P., Sauvant, D., Schmidely, P., Effects of the dietary percentage of concentrate on fiber, starch and fatty acid flows in the duodenum and on ruminal biotransformation of monoterpenes in mid-lactation goats. Journal of Dairy Science (en préparation).

Serment, A., Giger-Reverdin, S., Schmidely, P., Dhumez, O., Broudiscou, L. P., Sauvant, D., *In vitro* fermentation and methane production during the incubation of total mixed rations differing by the percentage of concentrate in rumen fluid from goats fed these diets. Journal of the Science of Food and Agriculture (en préparation).

Serment, A., Schmidely, P., Giger-Reverdin, S., Dhumez, O., Broudiscou, L. P., Sauvant, D., Effects of the dietary percentage of concentrate and oil supplementation on the *in vitro* fermentation, methane production and fatty acid profile. Journal of the Science of Food and Agriculture (en préparation).

Résumés de communications ou de posters à des congrès

Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., **Serment, A.**, 2012. Difficulties encountered in modeling CH₄ output by ruminants. International Symposium on Emissions of Gas and Dust from Livestock, St Malo, France, 10-13 June, 2012 (abstract).

Sauvant, D., **Serment, A.**, Giger-Reverdin, S., 2012. Limits in modelling CH₄ production from principles of rumen fermentation stoichiometry. 8th INRA-Rowett Symposium on Gut Microbiology, Gut microbiota: friend or foe? Clermont-Ferrand, France, 17-20 June, 2012, 133. (poster).

Sauvant, D., **Serment, A.**, Giger-Reverdin, S., 2012. Limits in modelling CH₄ production from VFA stoichiometry of rumen fermentation. Meeting of the Animal Science Modelling Group, Phoenix, Arizona, 14 July, 2012 (communication orale).

Serment, A., Sauvant, D., 2009. Physicochemical mechanistic model of an *in vitro* gas test system. 7th International Workshop on Modelling Nutrient Digestion and Utilisation in Farm Animals, Paris, France, 10-12 September, 2009. p 33. INRA, AgroParisTech, Paris, France. (poster).

Serment, A., Sauvant, D., 2009. Modèle mécaniste physico-chimique de fermenteur *in vitro* gaz-test. 3^{èmes} Journées d'Animation Scientifique du Département de Physiologie Animale et Systèmes d'Élevage, Tours, France, 7-9 Octobre, 2009. p 116. INRA, Tours, France. (communication orale).

Serment, A., Schmidely, P., Giger-Reverdin, S., Sauvant, D., 2010. Effet du pourcentage de concentrés sur les paramètres ruminiaux et sanguins, la production et la qualité du lait chez la chèvre en milieu de lactation. 17^{ème} Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants, Paris, France, 8-9 décembre 2010, 305. (poster).

Serment, A., Giger-Reverdin, S. 2012. Evolution de la variabilité individuelle du comportement d'ingestion de la chèvre laitière liée à un changement de régime. 19^{èmes} Rencontres Recherches Ruminants, Paris, France, 5-6 décembre 2012. (poster accepté)

Serment, A., Giger-Reverdin, S., Sauvant S., 2012. Modelling C and H rumen stoichiometry from *in vitro* measurements. 8th INRA-Rowett Symposium on Gut Microbiology, Gut microbiota: friend or foe? Clermont-Ferrand, France, 17-20 June, 2012, 134. (poster).

CHAPITRE 1 : Introduction générale

Introduction

A l'échelle mondiale, le cheptel de ruminants représentait, en 2010, 3,4 milliards de têtes (42 % de bovins, 31 % d'ovins et 27 % de caprins) (FAO, 2012). Les ruminants occupent une place importante dans la chaîne alimentaire de l'homme avec :

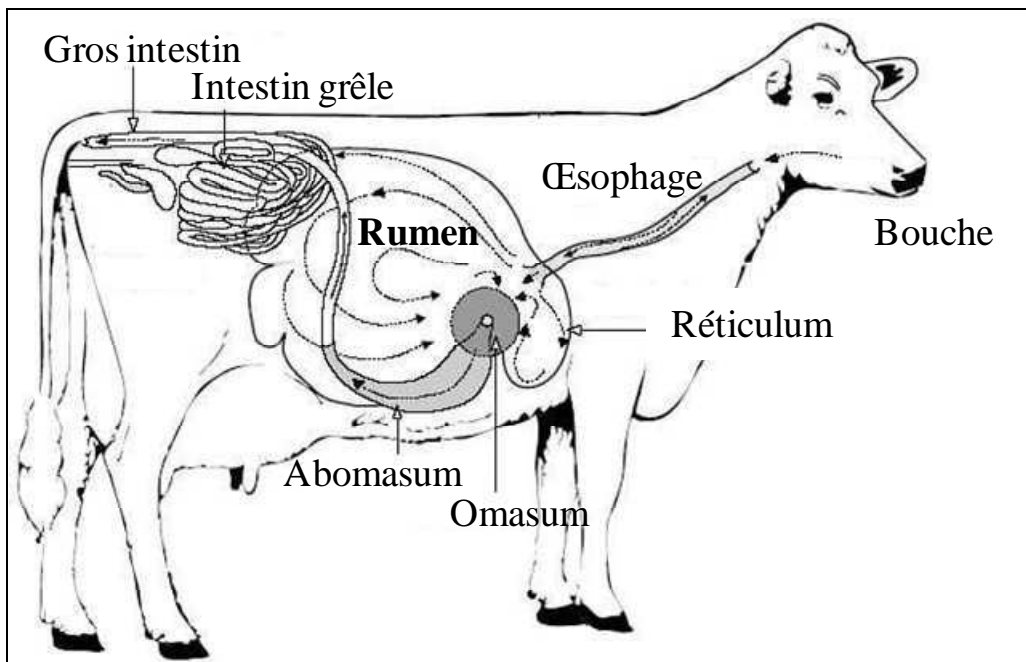
- une production de viande de 76 millions de tonnes (82 % bovins, 11 % ovins, 7 % caprins), soit un quart de la production mondiale de viande ;
- et une production laitière de 626 millions de tonnes (95,7 % vache, 1,6 % brebis, 2,7 % chèvre) en 2010 (FAO, 2012).

Dans son rapport « Livestock's long shadow », la FAO (Steinfeld et al., 2006) prévoit une augmentation de la production laitière d'ici 2050 de 10 % pour les pays développés et de 80 % pour les pays en voie de développement, pour répondre à l'augmentation de la consommation de ce produit, liée à l'évolution démographique et à l'accroissement de la part des produits animaux dans l'alimentation dans les pays en voie de développement. Outre ces enjeux de production, les productions de ruminants doivent prendre en compte des demandes multiples, parfois contradictoires, venant de l'aval des filières et du consommateur (qualité et sécurité sanitaire des produits) et du citoyen (maîtrise des impacts environnementaux, respect du bien-être animal), tout en restant compétitives d'un point de vue économique.

Les ruminants jouent un rôle essentiel dans la valorisation des surfaces fourragères (prairies et productions fourragères) qui représentaient environ 94 millions de tonnes de MS en France pour la campagne 2008 - 2009 (Agreste, 2011). L'amélioration génétique des troupeaux au cours de ces dernières années a conduit à une augmentation du potentiel de production des animaux. En France, ce gain génétique a été de l'ordre de 60 à 112 L par an entre 1984 et 2004 pour les principales races bovines, de 3 à 6 L par an selon les races ovines entre 1984 et 2001 et d'environ 13 L par an pour l'espèce caprine entre 1990 et 2005 (Jussiau et al., 2006). Dans ce contexte, les fourrages ne peuvent pas couvrir à eux seuls les besoins nutritionnels des animaux à fort potentiel de production, et doivent être complétés par des aliments concentrés plus riches en énergie, azote et minéraux. Ces aliments concentrés peuvent être produits sur l'exploitation (céréales autoconsommées, ...), ou achetés à l'extérieur sous forme de matières premières en l'état (céréales, protéagineux, coproduits industriels) ou d'aliments composés fabriqués par l'industrie (mélange d'aliments concentrés). En 2009, la production française d'aliments composés représentait 4,9 et 0,6 millions de tonnes pour les bovins et les ovins-caprins, respectivement, soit un quart de la production totale d'aliments composés (Agreste, 2011). D'après les estimations d'Y. Dronne (Dronne, 2003 ; AFSSA, 2000), les aliments composés ne représenteraient que 30 à 40 % des aliments concentrés utilisés chez les herbivores. Chez la vache laitière, ce ratio serait plutôt de l'ordre de 60 % (Dronne, 2003).

Pour valoriser ce type de ration, les ruminants ont la particularité de disposer de trois compartiments pré-stomacaux différents et d'un estomac (animaux polygastriques) : rumen (ou panse), réticulum (ou réseau), omasum et abomasum (ou caillette) (**Figure 1**). On associe

souvent le réseau avec le rumen sous le terme réticulo-rumen, du fait de l'unité morphologique fonctionnelle qu'ils constituent. Chez un bovin adulte, ce compartiment peut contenir entre 70 et 75 % du contenu total du tube digestif, et représente 8 à 15 % du poids vif de l'animal (Jarrige, 1978). Les aliments ingérés par le ruminant subissent tout d'abord la mastication ingestive, ce qui permet le broyage partiel et le mélange des aliments à la salive. Ils sont ensuite « stockés » transitoirement dans le rumen à partir duquel ils peuvent subir une nouvelle mastication, la rumination. Les constituants solubles sont libérés et les tissus internes des aliments sont exposés à la digestion par des microorganismes peuplant le rumen. On considère que la proportion de la matière organique digestible des aliments digérée au niveau du réticulo-rumen est en moyenne de l'ordre de $2/3$, avec des disparités importantes selon les rations et les constituants (Sauvant et al., 1995b). Le rumen assure 75 à 100 % de la digestion des glucides pariétaux de la ration, 50 à 100 % de celle des glucides non pariétaux, 40 à 90 % de celle des protéines (Journet et al., 1995).



*Figure 1 : Représentation schématique du tractus digestif d'une vache.
Babcock Institute (2011)*

Le rumen est le siège de nombreuses réactions : dégradations et fermentations, synthèses et conversions de molécules. Cet ensemble de réactions peut être regroupé sous le terme de « **biotransformation ruminale** » (**Figure 2**), résultant des trois forces motrices majeures qui pilotent l'activité ruminale : les dynamiques des populations microbiennes, les lois de la cinétique chimique et de la thermodynamique.

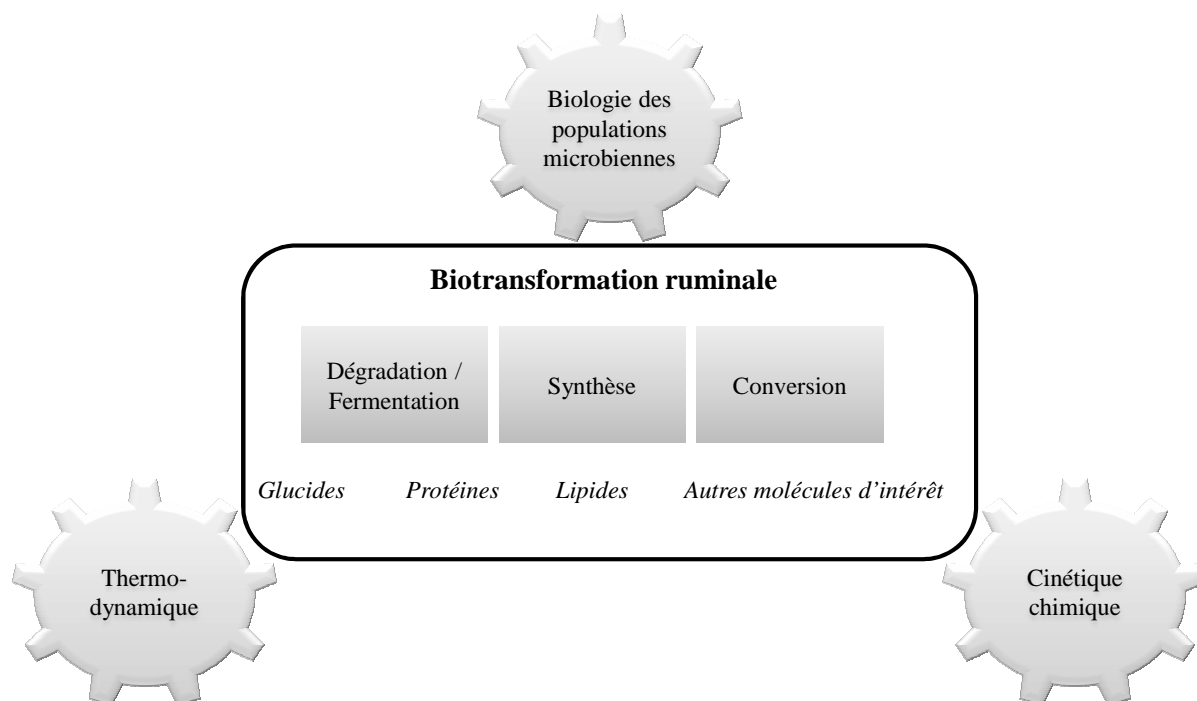


Figure 2 : Définition de la « biotransformation ruminale ».

La première partie de ce document est consacrée à une étude bibliographique dans laquelle nous nous attacherons essentiellement à décrire les phénomènes de biotransformation des constituants majeurs de la ration (glucides, protéines, lipides), en essayant de privilégier un angle dynamique. La biodégradation de molécules secondaires, type huiles essentielles, pigments, terpènes ou molécules toxiques (mycotoxines,...) ne sera pas évoquée ici.

Dans une première partie, nous nous intéresserons aux méthodes d'étude de la biotransformation dans le rumen. Nous décrirons ensuite l'écosystème ruminal et la dynamique de biotransformation des constituants de la ration dans le rumen. Nous étudierons ensuite comment sont modélisés ces phénomènes. Enfin, nous verrons comment les biotransformations sont modifiées par un facteur expérimental : le pourcentage de concentrés incorporés dans les rations.

I. Méthodes d'étude de la biotransformation des constituants de la ration dans le rumen

Dans cette partie, nous traiterons des différentes méthodes qui permettent d'étudier la biotransformation dans le rumen sous les aspects quantitatif et dynamique. Nous commencerons par étudier les méthodes *in vivo*, puis, nous nous intéressons aux méthodes *in situ* et *in vitro*.

I.1. Méthodes *in vivo*

I.1.1 Méthodes *in vivo* pour estimer la dynamique de biotransformation

a) Principe

L'étude *in vivo* de la dynamique de biotransformation dans le rumen nécessite un accès au contenu ruminal et éventuellement duodénal. Cet accès passe principalement par des prélèvements répétés de jus et / ou de contenu ruminal. Plusieurs méthodes de prélèvements sont possibles. La méthode la plus répandue est l'utilisation d'animaux fistulés du rumen. Quand les animaux ne sont pas équipés de fistules, l'intubation œsophagienne ou la ruminocentèse (appelée également trocardage du rumen) peuvent être utilisées (Doreau, 2008). Même si ces méthodes sont moins invasives, elles sont peu utilisées en recherche du fait de leurs nombreux inconvénients. En effet, avec l'intubation œsophagienne, l'échantillon prélevé risque d'être contaminé par de la salive et avec la ruminocentèse, il y a risque d'abcès ou de péritonite (Duffield et al., 2004). Elles ne sont pas envisageables pour des prélèvements effectués en cinétique, que seule la présence de fistule rend possible. D'autre part, elles ne permettent pas le prélèvement de contenu solide. Ces deux méthodes sont principalement utilisées par les vétérinaires par exemple pour la détection d'acidose (Kleen et al., 2004 ; Enemark, 2009).

b) Matériels et méthodes

Une canule ruminale autorise des prélèvements répétés de jus et / ou de contenu ruminal. L'étude de la dynamique des indicateurs de la biotransformation est généralement faite par prélèvements successifs autour de la distribution des repas sur une demi-journée (Tice et al., 1993 ; Abijaoudé et al., 2000a) ou une journée complète (Khorasani et al., 2001 ; Cantalapiedra-Hijar et al., 2009). Le rythme de prélèvements est variable selon les auteurs, pouvant aller de prélèvements toutes les demi-heures (Khorasani et al., 2001) à des intervalles de 2 ou 3 heures (Tice et al., 1993). La dynamique de biotransformation est suivie par l'analyse de ces prélèvements. Notons que la canule ruminale autorise également la pose de sonde pH à l'intérieur du rumen qui permet des mesures en continu. Cette technique est utilisée notamment dans les études sur l'acidose sub-clinique (Desnoyers et al., 2008a ; Colman et al., 2010).

c) Avantages et limites

L'opération de canulation est simple à réaliser. Elle est pratiquée par des personnes formées à la chirurgie et habilitées à réaliser cette opération, dans des locaux adaptés (salles d'opération). Le risque d'infection est faible, et les animaux équipés semblent être peu perturbés par leur canule qu'ils peuvent conserver pendant plusieurs années (Doreau, 2008). Néanmoins, à notre connaissance, aucune étude spécifique n'a évalué les conséquences des canules du tube digestif sur la douleur ou le mal-être de ces animaux. Par contre, les techniciens animaliers responsables des soins de ces animaux n'observent pas de comportements spécifiques apparents. Cette pratique commence néanmoins à être de plus en plus contestée.

La technique de prélèvement par la canule du rumen est également très simple à réaliser. L'analyse de ces prélèvements permet de suivre la dynamique de paramètres physico-chimiques (pH, potentiel d'oxydo-réduction, ...) et de produits terminaux de la digestion (acides gras volatils - AGV, ammoniac - NH_3). Les populations microbiennes présentes peuvent être analysées à partir de ces prélèvements. Cette méthode permet d'obtenir des informations sur le fonctionnement du rumen en réponse à une ration ou à un élément ajouté dans la ration, mais pas d'étudier un aliment ou un constituant de la ration en particulier. De plus, les facteurs étudiés par essai sont limités par le nombre d'animaux disponibles.

Enfin, cette technique ne permet pas de mesurer la dynamique de critères-clé comme la production de gaz dans le rumen. Cela rend ainsi impossible la réalisation de bilans quantitatifs fermentaires précis (bilans C, H, AGV produits).

I.1.2 Bilan *in vivo* de l'intensité des biotransformations ruminales

a) Principe

Le bilan *in vivo* des biotransformations se produisant dans le rumen se réalise en quantifiant les effluents de matières. Pour cela, il s'agit de prélever en sortie de rumen des fractions de digesta.

b) Matériels et méthodes

La mesure des flux des digesta nécessite des animaux opérés ayant une canule simple en T ou une canule réentrante au niveau de la caillette ou, plus souvent, au niveau du duodénum (Harmon et Richards, 1997). Dans le cas des canules simples, les animaux doivent ingérer un ou plusieurs marqueurs nécessaires à la mesure du flux digestif au niveau de la canule. Le choix du marqueur est déterminé par plusieurs caractéristiques (Faichney, 1975) : il doit être indigestible, semblable physiquement ou associé à ce qu'il doit marquer, ne pas affecter le tractus digestif et la population microbienne, ne pas être affecté par la population microbienne, sa méthode de détermination doit lui être spécifique et ne doit pas interférer avec les autres analyses. Parmi les marqueurs pouvant être utilisés, nous pouvons citer le chrome EDTA, le polyéthylène glycol, marqueurs de la phase liquide, et le chrome mordancé, les terres rares (ytterbium, europium), marqueurs de la phase solide. La technique de référence est la technique du double marquage, avec un marquage simultané des phases liquide et solide (Faichney, 1995). Néanmoins, l'oxyde de chrome (Cr_2O_3) est un marqueur

très couramment utilisé (Titgemeyer, 1997). Le marqueur est administré à une quantité journalière constante, soit incorporé dans la ration, soit par infusion (dans le rumen). Des prélèvements de contenu digestif sont effectués à intervalles réguliers pour pouvoir être représentatifs du nycthémère (Sauvant et al., 1995b).

c) Avantages et limites

Ces méthodes sont très intéressantes pour estimer la disparition ou la synthèse de nutriments dans le rumen et le flux de nutriments sortant du rumen. Néanmoins, de nombreux facteurs peuvent biaiser les résultats. Les flux des digesta sont largement influencés par l'ingestion des animaux. Or, les animaux utilisés pour ces mesures peuvent modifier leur ingestion par rapport aux situations normales de production (cases de digestibilité, animaux opérés) (Titgemeyer, 1997). L'utilisation du Cr₂O₃ comme marqueur est critiquable car il n'est ni un marqueur de la phase liquide, ni un marqueur de la phase solide (Faichney, 1995) et ne semble pas se mélanger complètement dans le contenu ruminal (Corbett et al., 1959). Néanmoins, il est bon marché, facile à utiliser et à doser. Les points négatifs du Cr₂O₃ peuvent potentiellement entraîner des résultats non représentatifs. Enfin, les prélèvements par des canules simples en T ne sont pas forcément complètement représentatifs, car tous les digesta passant par le duodénum n'atteignent pas la canule (Titgemeyer, 1997).

Les méthodes *in vivo* évoquées dans le paragraphe précédent présentent de nombreux avantages notamment concernant la diversité des mesures possibles, leur précision car les mesures sont directement réalisées sur les animaux. Cependant, elles présentent de nombreuses limites : utilisation d'animaux canulés, impossibilité d'étudier des éléments de la ration individuellement (sauf s'ils sont marqués, par des terres rares, par exemple)... D'autres méthodes complémentaires et en partie alternatives ont donc été proposées : les méthodes *in situ* et *in vitro*.

I.2. Méthode *in situ*

I.2.1 Principe

La méthode *in situ*, appelée également *in sacco* ou méthode des sachets nylon, a pour objectif d'évaluer la vitesse et l'ampleur de la dégradation des aliments dans le rumen. Elle dérive de la méthode des poches de soie utilisée par Quin et al. (1938). Elle a été particulièrement utilisée dès la fin des années 1970 pour mesurer la dégradabilité de la fraction azotée des aliments et a ainsi été à la base de nombreux systèmes d'évaluation de la valeur azotée des aliments : système PDI en France (Vérité et al., 1987) et système AAT-PBV en Scandinavie (Madsen, 1985). Cette méthode permet également l'étude des cinétiques de dégradation des constituants pariétaux (Chapoutot, 1998) et de l'amidon (Nocek et Tamminga, 1991 ; Offner et al., 2003) des aliments.

I.2.2 Matériels et méthodes

Ces méthodes nécessitent des animaux fistulés pour l'incubation de sachets en polyester ou nylon contenant les échantillons d'aliments (préalablement broyés, appelés substrats), suspendus dans le rumen. Les sachets sont retirés à des temps choisis. Des analyses sur les résidus de substrats sont ensuite réalisées. Plusieurs variantes méthodologiques ont été proposées, notamment concernant la quantité de substrats à mettre dans les sachets ou la grille de broyage à utiliser. En France, elle a été standardisée pour mesurer la dégradation des constituants azotés alimentaires (Michalet-Doreau et al., 1987).

L'ajustement des cinétiques de dégradation repose généralement sur des modèles simples, notamment le modèle monomoléculaire d'Ørskov et McDonald (1979) (**Tableau 1**). L'aliment ou l'un de ses constituants est considéré comme étant composé de 3 fractions majeures : soluble (f_s), potentiellement digestible (f_d) et indigestible ($f_i = 1 - f_s - f_d$) (Sauvant et Van Milgen, 1995). La fraction f_s est directement utilisable par les microorganismes, alors que la fraction f_d est progressivement dégradée à un taux de dégradation relatif supposé constant (k_d). L'équation (1) du **Tableau 1** peut être complexifiée en ajoutant par exemple un temps de latence (L), qui représente la phase précédant les processus de dégradation de la fraction f_d (équation 2, **Tableau 1**), ou en intégrant l'influence du transit pour calculer la « dégradabilité théorique » (équations 3 et 4, **Tableau 1**).

I.2.3 Avantages et limites

Les avantages de cette technique reposent sur sa facilité de mise en œuvre et sur la connaissance des caractéristiques dynamiques des processus de dégradation qu'elle permet d'obtenir (Sauvant et al., 1995b). Les mesures sont réalisées directement dans le rumen, c'est-à-dire dans les conditions les plus proches des conditions naturelles de dégradation.

Pourtant, cette technique présente de nombreux inconvénients. Elle est considérée comme coûteuse et longue (Gosselink et al., 2004). Elle nécessite l'utilisation d'animaux fistulés. De plus, la taille des pores du sachet peut entraîner une sélection des microorganismes entrant dans le sachet (Michalet-Doreau et Ould-Bah, 1992). Cette méthode est difficilement applicable pour les aliments solubles ou les aliments dont les particules de petite taille peuvent s'échapper du sachet sous une forme non dégradée (Cone et al., 1994). D'autre part, même en procédant à des lavages des sachets après l'incubation, les résidus de sachets restent contaminés en microorganismes, ce qui peut introduire des biais (Michalet-Doreau et Nozière, 1999). Par ailleurs, cette méthode souffre d'une faible répétabilité et d'une faible reproductibilité (Michalet-Doreau et Aufrère, 1990).

Tableau 1 : Equations d'ajustement des cinétiques de dégradation des constituants alimentaires dans le réticulo-rumen. D'après Sauvant et Van Milgen (1995).

(1)	Dégradation sans temps de latence :	$Dt = fs + fd * (1 - \exp(-kd * t))$
(2)	Dégradation avec temps de latence :	$Dt = fs + fd * (1 - \exp(-kd * (t - L)))$
(3)	Dégradation + transit, sans temps de latence :	$DT = fs + fd * (kd / (kd + kp))$
(4)	Dégradation + transit, avec temps de latence :	$DT = fs + fd * (kd / (kd + kp)) * \exp(-kp * L)$

Dt: dégradation à l'instant t

DT : dégradation théorique (« effective degradability »)

fs : fraction soluble

fd : fraction insoluble dégradabile

kd : taux de dégradation relatif à la fraction fd (h^{-1})

kp : taux de transit relatif (h^{-1})

L : temps de la latence discret avant digestion (h)

t : durée d'incubation (h)

I.3. Méthodes *in vitro*

Le terme « *in vitro* » peut s'appliquer aux méthodes fermentaires utilisant du fluide et / ou contenu ruminal et aux méthodes enzymatiques (type pepsine-cellulase de Aufrère et Demarquilly (1989)). Cette partie concerne uniquement les méthodes fermentaires.

I.3.1 Principe

Les méthodes fermentaires consistent à incuber un substrat (ration, aliment, additif, ...), pendant une durée définie, en présence d'un inoculum constitué d'une population microbienne (fluide et / ou contenu ruminal) et d'une solution saline tamponnée. Ces méthodes nécessitent des animaux donneurs, fistulés du rumen. Ces animaux sont néanmoins moins sollicités dans une même journée qu'avec la méthode *in situ*. Notons qu'il est également possible de substituer le contenu ruminal par des fèces du fait de leur contenu microbien (Cone et al., 2002 ; Rymer et al., 2005a).

Il existe plusieurs systèmes *in vitro*. On distingue les systèmes en flux continu ou semi-continu des systèmes fermés de type « batch ».

I.3.2 Systèmes en flux continu ou semi-continu

a) Matériels et méthodes

Ces systèmes fonctionnent avec un apport continu de solution tampon, un apport continu ou discontinu d'aliment, et une sortie continue des produits de fermentation et des microorganismes (Slyter et al., 1964 ; Hoover et al., 1976 ; Czerkawski et Breckenridge, 1977). Dans le cas des systèmes continus de type Hoover (Hoover et al., 1976 ; Broudiscou et al., 1997), dit à double effluent, les phases solides et liquides sont séparées en sortie. Czerkawski et Breckenridge (1977) ont mis au point le système RUSITEC (Rumen Simulation Technique) où les liquides sont évacués en cours de fermentation, tandis que les solides sont enfermés dans des sachets de nylon (Durand et al., 1988 ; Giger-Reverdin et al., 1993). Les expériences durent plusieurs jours : jusqu'à 20 jours (Blanchart et al., 1989) pour

la méthode RUSITEC, 7 jours pour la méthode continue de Broudiscou et al (1997). Ces systèmes permettent d'étudier des cinétiques, mais aussi d'effectuer des mesures de bilan.

b) Avantages et limites

Ces systèmes rendent possible un bon renouvellement de la population microbienne sur le long-terme et l'adaptation des microorganismes aux substrats et aux facteurs étudiés (Durand et al., 1988 ; Broudiscou et al., 1997). Ils permettent d'étudier à la fois les aspects cinétiques et les bilans de la fermentation. En effet, le RUSITEC permet la mesure simultanée de la plupart des paramètres de fermentation : taux de disparition de la MS, production d'AGV, de gaz, de NH₃ et de protéosynthèse microbienne (Blanchart et al., 1989). Il évite l'accumulation dans le milieu des produits de fermentation qui risquent d'entraîner des déviations fermentaires (Blanchart et al., 1989).

En revanche, ces systèmes sont lourds à mettre en œuvre et donc difficiles à utiliser en routine. Dans le cas du RUSITEC, l'aliment est conditionné en sachet nylon. La porosité des sachets pourrait autoriser des pertes de particules et freiner les échanges de gaz, de liquides et de microorganismes entre l'intérieur et l'extérieur des sachets. De plus, le rythme d'alimentation d'un repas par jour qui est différent du rythme habituel d'alimentation, peut introduire des différences de résultats avec l'*in vivo*. Ce système pourrait sous-alimenter les microorganismes dans les périodes les plus éloignées de l'approvisionnement en substrat (Blanchart et al., 1989).

D'autre part, à notre connaissance, il ne semble pas exister d'étude comparative entre les résultats issus de flux duodénaux *in vivo* et de fermenteurs à double effluent.

I.3.3 Systèmes « batch »

a) Matériels et méthodes

Les techniques « batch » sont dérivées de la méthode de Tilley et Terry (1963) qui permet de déterminer la digestibilité apparente de la MS ou de la MO d'aliments, mais en ont supprimé la dernière étape qui consiste en un traitement à la pepsine chlorhydrique, qui simule la digestion des aliments dans la caillette. Ces techniques ne simulent donc que les phénomènes ruminiaux.

Dans un récipient, un échantillon du substrat est mis en présence d'un inoculum, pendant une durée relativement courte (maximum 120 h (Calabro et al., 2008)) par rapport aux systèmes en flux continu ou semi-continu. Il y a donc un apport unique de substrat et de solution tampon et aucune sortie d'effluents ou de substrat après le démarrage de l'expérimentation. Pendant l'incubation, les conditions de température et d'anaérobiose se rapprochent autant que possible de celles du rumen.

Il existe quelques méthodes *in vitro* de référence (voir plus loin pour les méthodes gaz-test). Néanmoins, les équipes travaillant avec ces méthodes les ont toutes adaptées à leurs objectifs expérimentaux et à leurs contraintes. La **Figure 3** représente les différentes étapes de ces méthodes et les choix méthodologiques pouvant être faits concernant le prélèvement de contenu ruminal, le type de solution tampon, le traitement du substrat et de l'inoculum (Rymer et al., 2005a).

Différentes mesures sont possibles : AGV, protéines microbiennes, dégradation de la MS et de la matière organique (MO), etc... Les prélèvements et mesures sont généralement faits en fin d'incubation ou à des temps donnés pendant l'incubation pour étudier la cinétique de fermentation (Maaroufi et al., 2009). Au cours de ces 30 dernières années, de nombreuses équipes ont mesuré le volume de gaz produit, car cette mesure permet d'estimer la digestibilité de la MO des aliments (Menke et al., 1979). Elle nécessite des dispositifs spécifiques automatisés ou non : seringues (Menke et al., 1979), « liquid displacement system » (Beuvink et al., 1992), « pressure transducer » (Pell et Schofield, 1993 ; Theodorou et al., 1994 ; Cone et al., 1996 ; Mauricio et al., 1999 ; Adesogan et al., 2005). Ces méthodes sont appelées « gaz-test ». De nombreux auteurs ont cherché des outils mathématiques pour interpréter les courbes de production de gaz cumulée obtenues avec ces méthodes (France et al., 2000).

b) Avantages et limites

L'avantage premier de ces techniques est leur adaptabilité aux objectifs expérimentaux en termes de protocole (**Figure 3**) et de mesures réalisées. Elles permettent d'étudier les vitesse et intensité de dégradation des substrats, mais également les quantités de produits de fermentation (AGV, protéines microbiennes, gaz...) (Mauricio et al., 1999), en cinétiques ou non. La facilité de la mesure de la production de gaz est un réel avantage surtout dans le contexte actuel du questionnement sur la production de méthane des ruminants (Getachew et al., 2005).

Les méthodes *in vitro* « batch » ont une répétabilité et une reproductibilité acceptables (Gosselink et al., 2004 ; Rymer et al., 2005b). Leur coût est très variable selon le niveau d'automatisation du système (Getachew et al., 1998 ; Mauricio et al., 1999). D'autre part, selon plusieurs auteurs, ces méthodes sont rapides (Cone et al., 1996 ; Williams et al., 2005) et simples à mettre en œuvre (Coles et al., 2005 ; Williams et al., 2005). Elles permettent l'évaluation simultanée d'une grande quantité de substrats (Getachew et al., 1998 ; Doreau, 2008). Les méthodes *in vitro* semblent être une alternative intéressante à la méthode *in situ* pour l'étude des aliments solubles ou ayant de petites particules (Cone et al., 1996).

La principale limite de ces systèmes consiste dans le fait que ce sont des systèmes fermés à l'opposé du rumen, induisant une accumulation des produits terminaux qui peut inhiber le développement des populations microbiennes (Lopez et al., 1998). L'apport important de bicarbonate dans la salive artificielle pour tamponner la chute de pH liée à la production d'AGV (non absorbés) entraîne une surestimation de la production de CO₂ fermentaire par ces systèmes (Mould et al., 2005). Les systèmes n'utilisant que du jus sans contenu solide ruminal (Menke et al., 1979 ; Pell et Schofield, 1993 ; Cone et al., 1996) ont le désavantage de ne prendre en compte qu'en partie l'activité fermentaire des bactéries attachées aux particules alimentaires.

L'étude en cinétique nécessite de stopper les fermentations de certains flacons ou seringues pour pouvoir effectuer des prélèvements. Ainsi pour une cinétique donnée, les prélèvements sont effectués sur des flacons différents (Getachew et al., 2005 ; Maaroufi et al., 2009). Les méthodes gaz-test permettent de préserver l'échantillon, permettant ainsi de

réaliser des mesures répétées de gaz sur le même flacon (Coles et al., 2005). L'inconvénient est qu'en général, seul le gaz est mesuré en cinétique et que les autres critères sont mesurés uniquement en fin d'incubation (Garcia-Gonzalez et al., 2008 ; Goiri et al., 2009).

Nous utiliserons la méthode de Menke et al. (1979) lors de notre travail expérimental. Cette technique est reconnue à l'échelle internationale et est utilisée dans de nombreux laboratoires. Cette technique est très répétable (CV = 1,7 %) et permet l'étude d'une cinquantaine d'échantillons simultanément. Même si ce système n'est pas automatisé, impliquant ainsi potentiellement un nombre d'erreurs et une durée de manipulation supérieurs aux systèmes automatisés (Cone et al., 1996), il est plus facilement adaptable à l'étude de cinétiques de plusieurs critères mesurés simultanément (Maaroufi et al., 2009).

Il n'existe pas de méthode optimale pour l'étude de la biotransformation dans le rumen. Les méthodes *in vivo* présentent l'avantage d'être directement représentatives du fonctionnement digestif de l'animal, mais sont lourdes à mettre en place et ne permettent pas l'étude simultanée de nombreux facteurs expérimentaux et de leurs interactions. Les méthodes *in vitro* sont au contraire très adaptables pour leur mise en œuvre et la multiplicité des mesures à réaliser mais elles sont moins représentatives des processus physiologiques. Croiser ces différentes méthodes pourrait être intéressant, car les critères mesurés ne sont pas les mêmes.

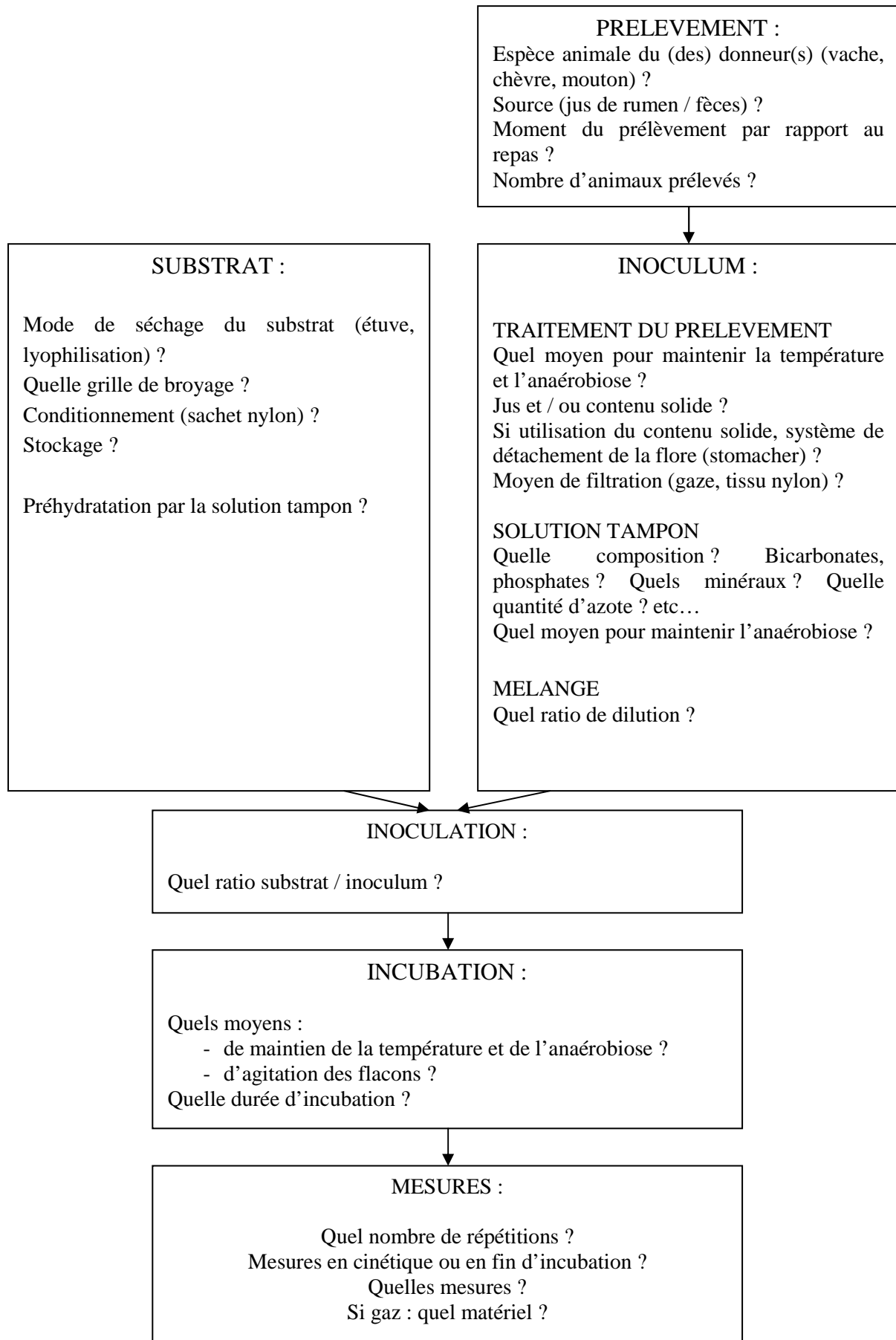


Figure 3 : Choix à faire lors des étapes des méthodes in vitro « batch »

II. Dynamique du devenir des aliments dans le rumen

Le réticulo-rumen constitue un écosystème anaérobie strict où une diversité de microorganismes permet la dégradation des constituants de la ration. Dans cette partie, nous décrirons les microorganismes présents dans le rumen ainsi que les paramètres physico-chimiques de cet écosystème. Nous verrons ensuite la dégradation et la transformation des constituants majeurs de la ration (protéines, glucides et lipides). Ces éléments seront décrits sous l'angle de la dynamique postprandiale et d'un point de vue quantitatif.

II.1. Ecosystème du rumen

II.1.1 Paramètres biotiques

Les microorganismes du rumen se caractérisent par leur grande diversité. On y trouve bactéries, protozoaires et champignons.

a) Bactéries

Les bactéries sont les microorganismes les plus nombreux du rumen. Elles représentent 50 % de la biomasse microbienne et leur concentration peut atteindre 10^{11} cellules vivantes / mL de contenu ruminal (Hungate, 1966). Leur taille est comprise entre 0,3 et 50 μm (Yokoyama et Johnson, 1988). La flore ruminale se caractérise par son extrême diversité. Environ 200 espèces ont été isolées, dont une trentaine spécifique du rumen, présentant des activités enzymatiques variées. Hungate (1966) a proposé une classification fonctionnelle : bactéries cellulolytiques, amylolytiques, hémicellulolytiques, saccharolytiques, protéolytiques, méthanogènes, lipolytiques, etc... que d'autres auteurs continuent à utiliser (Dehority, 2003). Les bactéries peuvent également être classifiées selon leur environnement : bactéries libres présentes dans la phase liquide, associées à des particules alimentaires solides, attachées à la surface des protozoaires ou encore associées à l'épithélium ruminal (Czerkawski et Cheng, 1988 ; McAllister et al., 1994).

Les bactéries du rumen ont été étudiées par des méthodes de cultures bactériennes, lourdes à mettre en œuvre, qui ont permis l'isolement et l'identification d'un nombre important de souches bactériennes. L'introduction de nouvelles techniques offre des perspectives d'études intéressantes. L'analyse des séquences des ARN ribosomiaux (ARNr) 16S permet d'améliorer la description de la diversité génétique et des relations phylogénétiques (Case et al., 2007). Le développement de la métagénomique, qui consiste à séquencer l'ensemble des génomes microbiens d'un échantillon, offre des perspectives pour, par exemple, identifier de nouveaux gènes codant pour des enzymes ou avoir accès à des bactéries qu'on était jusqu'alors incapable de mettre en culture (Singh et al., 2008).

Les bactéries associées aux particules alimentaires sont numériquement supérieures aux autres catégories (Minato et al., 1993). Elles représentent jusqu'à 75 % de la population microbienne totale (Koike et al., 2003). Ces bactéries sont responsables de la majorité de l'activité enzymatique dans le rumen (Williams et Strachan, 1984 ; Minato et al., 1993) : 88 à 91 % pour les endoglucanases et xylanases, 70 % pour les amylases et 75 % pour les

protéases (Miron et al., 2001). Cette population bactérienne joue donc un rôle de pivot dans la digestion des aliments dans le rumen, leur dynamique de colonisation pouvant impacter la dynamique de digestion. Les mécanismes de colonisation ont été décrits dans la revue de Miron et al. (2001). Néanmoins, même si la colonisation des particules alimentaires par les bactéries est centrale dans les processus de dégradation des aliments, la dynamique de ce processus n'est pas complètement connue (Edwards et al., 2007). L'adhésion initiale des bactéries se produit très rapidement : après 10 minutes pour Koike et al. (2003) (**Figure 4a**), 1 % de la MS du substrat colonisée après 15 minutes chez Yang (1991). L'augmentation du nombre de bactéries attachées se poursuit dans la suite de l'incubation jusqu'à 24 ou 48 h selon les espèces bactériennes, s'expliquant à la fois par de nouvelles adhésions au substrat de bactéries libres dans le milieu et par la prolifération des bactéries déjà attachées (Koike et al., 2003) (**Figure 4b**). De nombreux facteurs peuvent affecter l'adhésion bactérienne : facteurs liés aux bactéries (âge, condition du glycocalyx, compétition bactérienne), liés au substrat (surface, hydratation, charge ionique...), liés à l'environnement (pH, température, oxygénation, ...) (Miron et al., 2001). Yang (1991) a montré qu'à 3 heures après le début de l'incubation, la colonisation était très dépendante de la teneur en paroi végétale (**Figure 5**), puisque les constituants pariétaux représentent une surface d'adhésion importante pour les microorganismes.

La dégradation des glucides peut être également retardée par un stockage transitoire de polysaccharides par les bactéries (Sauvant et Van Milgen, 1995). La mise en réserve atteint un maximum entre 1 à 2 heures après le début du repas puis diminue lentement au rythme de l'utilisation du substrat par les bactéries (**Figure 6**) créant ainsi un délai de 5 à 10 heures dans la dynamique de l'utilisation des glucides.

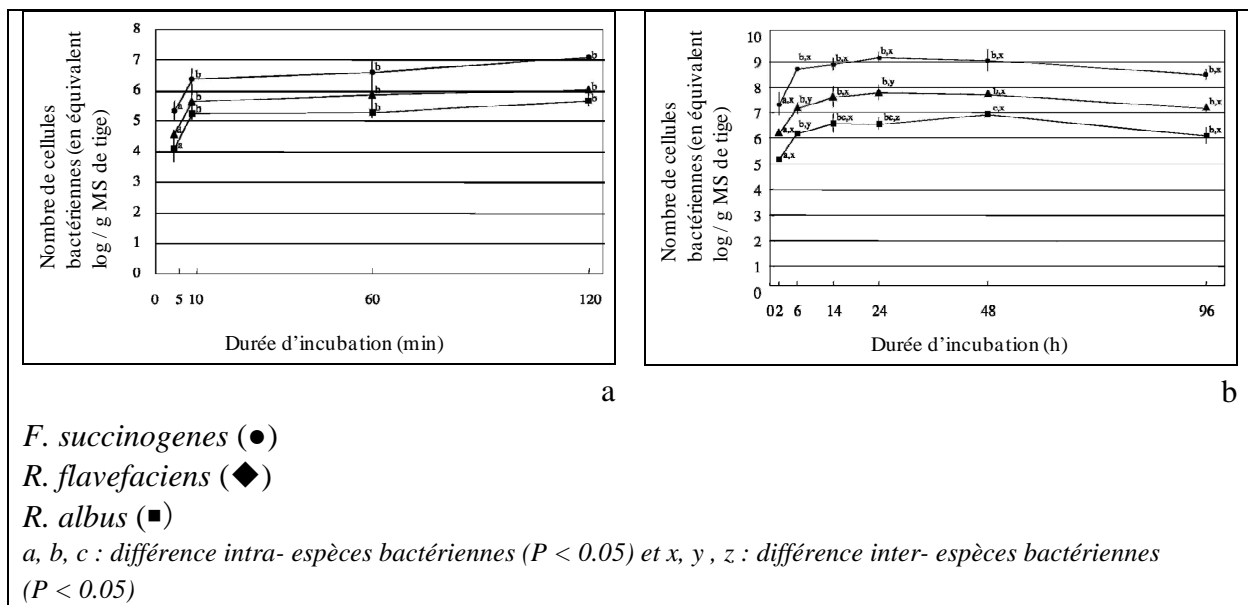


Figure 4 : Nombre de cellules bactériennes associées aux fibres végétales pendant l'incubation in situ de tiges de foin de dactyle : de 0 à 120 min d'incubation (a) et de 2 à 96 h d'incubation (b).

D'après Koike et al. (2003)

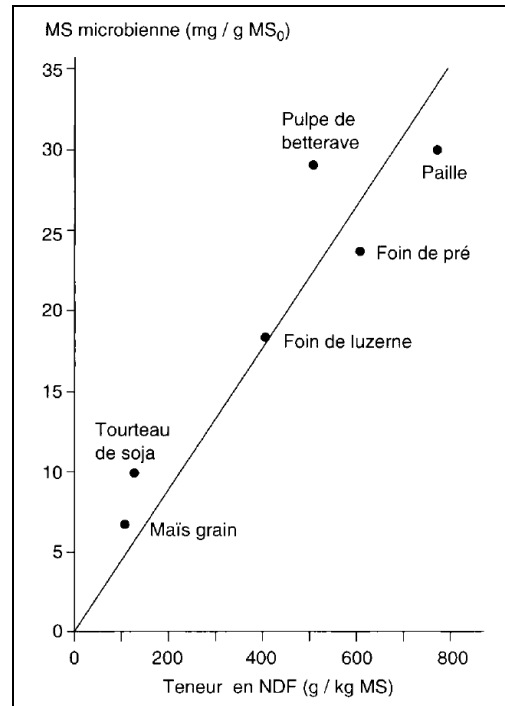


Figure 5 : Relation entre la teneur en paroi végétale et la colonisation microbienne d'un aliment après 3 heures d'incubation in situ. D'après Yang (1991).

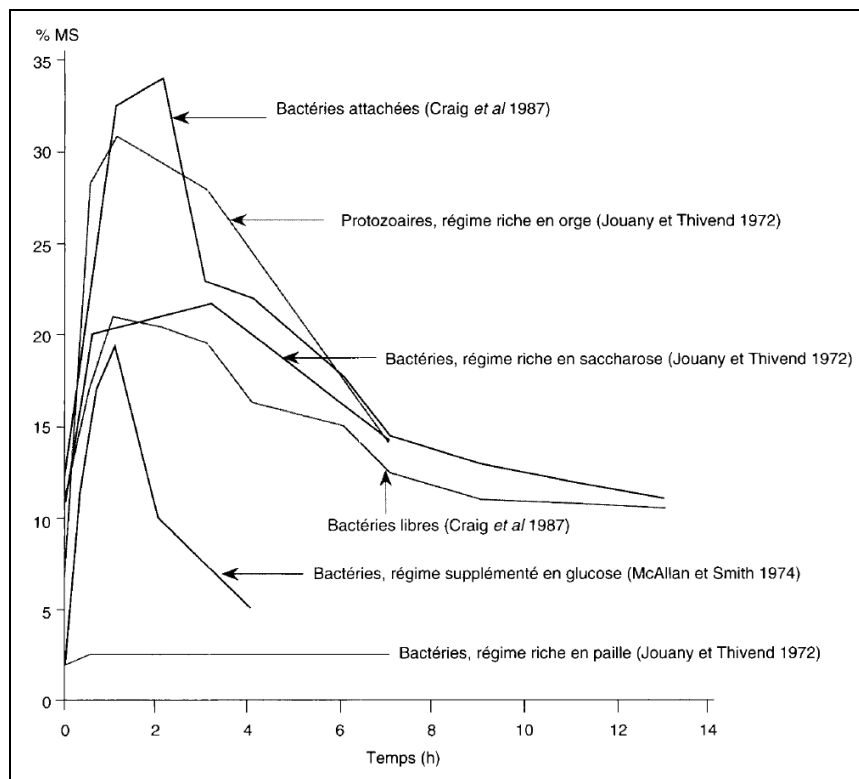


Figure 6 : Evolution de la teneur en polysaccharides des microorganismes du rumen après un repas. (Sauvant et Van Milgen, 1995).

b) Protozoaires

Les protozoaires présents dans le rumen font partie principalement de l'embranchement des ciliés et sont représentés majoritairement par deux groupes : les holotriches et les entodiniomorphes. Ils représentent 40 % de la biomasse microbienne et leur concentration est évaluée à 10^6 cellules vivantes / mL de contenu ruminal. Leur taille varie de 20 à 150 μm selon les espèces (Fonty et al., 1995).

Les protozoaires participent à la digestion des constituants de la ration. Certains protozoaires peuvent digérer les parois et les chloroplastes, ingérer des grains d'amidon, des glucides solubles et des bactéries. La **Figure 6** montre la dynamique de la teneur en polysaccharides des protozoaires. Le stockage de ces molécules par les protozoaires (Jouany et Thivend, 1972), tout comme celui effectué par les bactéries évoqué dans le paragraphe précédent, induit un délai dans la dégradation de ces molécules, estimé à 7 h avec un régime riche en orge (Sauvant et Van Milgen, 1995).

La concentration des ciliés entodiniomorphes diminue pendant environ 4 h après la prise d'un grand repas, puis augmente dans l'intervalle de 4 à 8 h suivant ce repas, pour enfin rediminuer après 8 h. La première phase s'explique par un effet de dilution et par une vidange accrue du rumen au moment des repas ; la seconde phase correspond à la phase de division des ciliés et à la stabilisation du milieu ; la dernière phase correspond à un appauvrissement du milieu en nutriments (Fonty et al., 1995). Différents exemples de variations journalières de la concentration en protozoaires du rumen ont été compilés par Dehority (2003).

c) Champignons

Les champignons trouvés dans le rumen sont anaérobies stricts, ce qui est assez rare pour le groupe des champignons. Ils ne possèdent pas de mitochondries, ni de cytochromes. On décrit trois genres : un pluri-flagellé, *Neocallimastix*, deux uniflagellés, *Piromonas* et *Caecomyces*. Leur concentration est estimée à 10^3 zoospores / mL de contenu (Jouany, 1994), soit de l'ordre de 8 % de la biomasse microbienne du rumen (Orpin et Joblin, 1988).

Ils sécrètent des enzymes impliquées dans la digestion des glucides et protéines.

II.1.2 Paramètres abiotiques

Les facteurs abiotiques du rumen représentent l'ensemble des facteurs physico-chimiques influençant la flore et la faune microbiennes.

a) pH et pouvoir tampon

Le pH doit être compris entre 6 et 7 pour assurer une bonne prolifération des microorganismes (**Figure 7**). Le pH ruminal est la résultante de différents éléments : production d'acides, leur absorption, leur sortie avec les digesta, et effet de tampons contenus dans la salive et dans la ration.

La principale source de variation du pH est la fermentation des aliments qui conduit à la formation d'acides (AGV et acide lactique) pouvant faire baisser le pH du fait de leurs pKa inférieurs à 7. Cette chute de pH est compensée par une sécrétion salivaire intense : 100 à 190 L par jour pour la vache, 6 à 15 L par jour pour le mouton (Sautet, 1995), à pouvoir

tampon élevé par sa teneur en bicarbonates et en phosphates (**Tableau 2**). La sécrétion salivaire est difficile à mesurer, mais peut être estimée par excès par le flux de liquide au duodénum (FLD) (Jacques et al., 1989). La **Figure 8** montre la relation positive qui existe entre le pH et le FLD. Le recyclage salivaire étant très corrélé à l'activité masticatoire des animaux, il existe également une relation entre pH et indice de mastication (**Figure 9**). Les aliments de la ration ont également une valeur tampon intrinsèque (Giger-Reverdin et al., 2002). La vitesse d'absorption des AGV à travers la paroi ruminale (différente selon les AGV) (Dijkstra et al., 1993 ; Nozière et al., 2010) ainsi que la sortie des digesta sont également à prendre en compte dans la détermination du pH. Après un repas, le pH diminue du fait de la production d'acides, puis augmente. Dragomir et al. (2008) ont proposé de décrire l'évolution postprandiale du pH ruminal par plusieurs critères (pH initial, pH final, pH minimal, temps du pH minimal, durée quand le pH est inférieur à 6, ...) (**Figure 10**) pour remplacer l'utilisation de la valeur moyenne du pH considérée comme insatisfaisante.

Des déviations du pH de la zone dite de normalité ont été observées et sont la conséquence de déviations fermentaires générées par des déséquilibres alimentaires (**Figure 7**). Une chute importante et prolongée du pH ruminal avec des valeurs pouvant être inférieures à 5,0 (seuil d'irréversibilité si l'animal continue à ingérer des glucides rapidement fermentescibles) correspond à une acidose aiguë, grave, parfois mortelle pour l'animal (Martin et al., 2006). Plus fréquente en élevage, l'acidose sub-clinique (SARA : SubAcute Ruminant Acidosis), encore appelée chronique ou latente est, quant à elle, définie par des périodes de baisse du pH courtes et modérées mais fréquentes. Le pH ruminal moyen est alors compris entre 5,50 et 6,25 (Sauvant et al., 1999). Certains auteurs calculent l'aire de la courbe ou la durée quand le pH est inférieure à une valeur seuil comprise entre 5,5 et 6,0 (Krehbiel et al., 1995; Beauchemin et al., 2003; AlZahal et al., 2007). L'acidose subclinique est l'une des préoccupations majeures de la nutrition des ruminants compte tenu des conséquences sur la santé des animaux, la diminution de la production et donc les performances économiques des élevages (Martin et al., 2006).

Inversement, un animal peut être en état d'alcalose (libération excessive de NH_3) quand les valeurs de pH ruminal sont supérieures à 7,5 (Rémond et al., 1995). En effet, Bartley et al. (1976) ont observé des symptômes de l'alcalose chez des animaux ayant un pH ruminal de 7,4. Néanmoins, des animaux peuvent présenter un pH supérieur à 7,5 sans être en alcalose (après une mise à jeun).

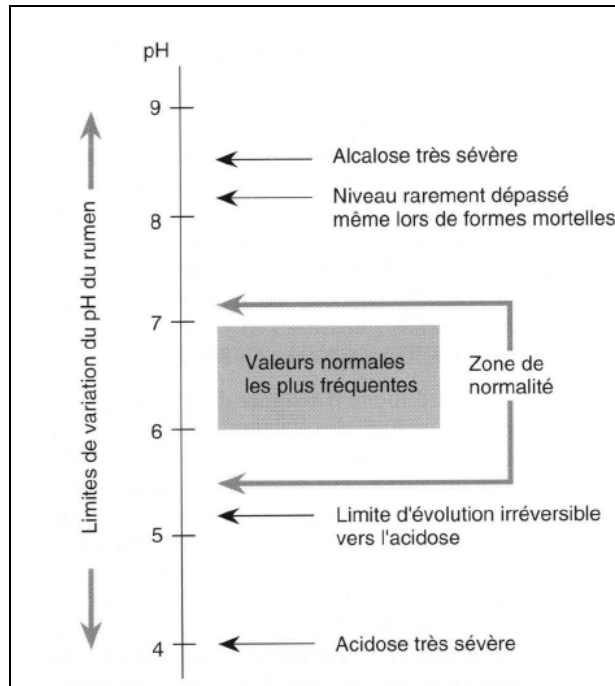


Figure 7 : Zones de pH dans le rumen. (Rémond et al., 1995).

Tableau 2 : Composition moyenne de la salive en tampon (mEq / L) chez le veau ruminant, la vache et le mouton. D'après Guilloteau et al. (1995) (1) et Bailey and Balch (1961) (2).

Tampon	Veau ruminant ¹	Vache (salive mixte) ²	Vache (salive de la glande parotide) ²	Mouton ¹
HCO ₃ ⁻	72-120	126	127	104
HPO ₄ ²⁻	12-47	26	23	52

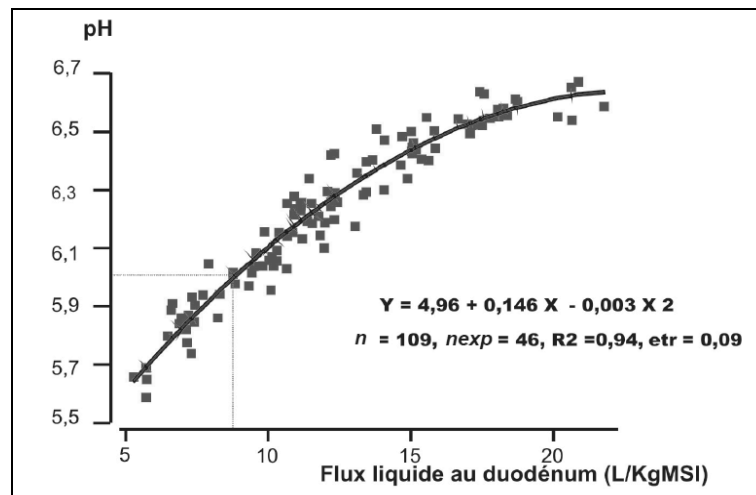


Figure 8 : Relation entre le flux de liquide au duodénum et le pH du rumen. (Sauvant et al., 2006).

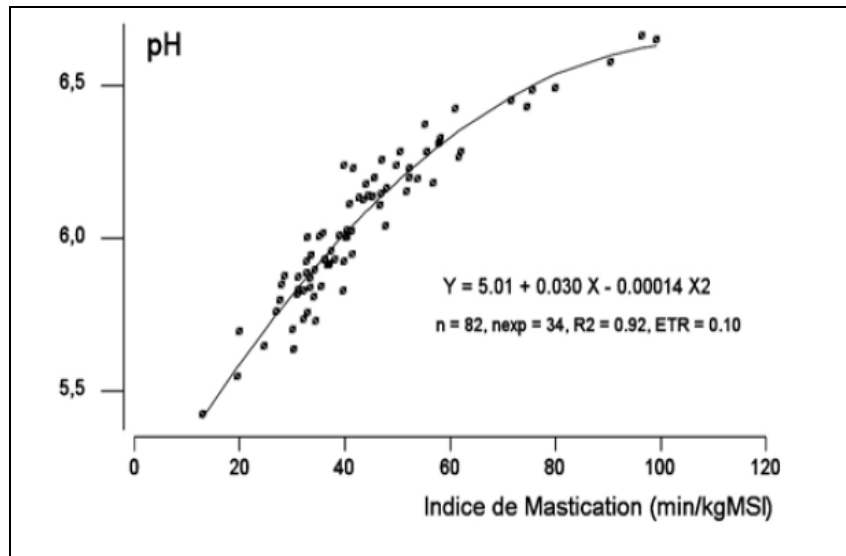


Figure 9 : Relation entre l'indice de mastication et le pH du rumen. (Sauvant et al., 2008a).

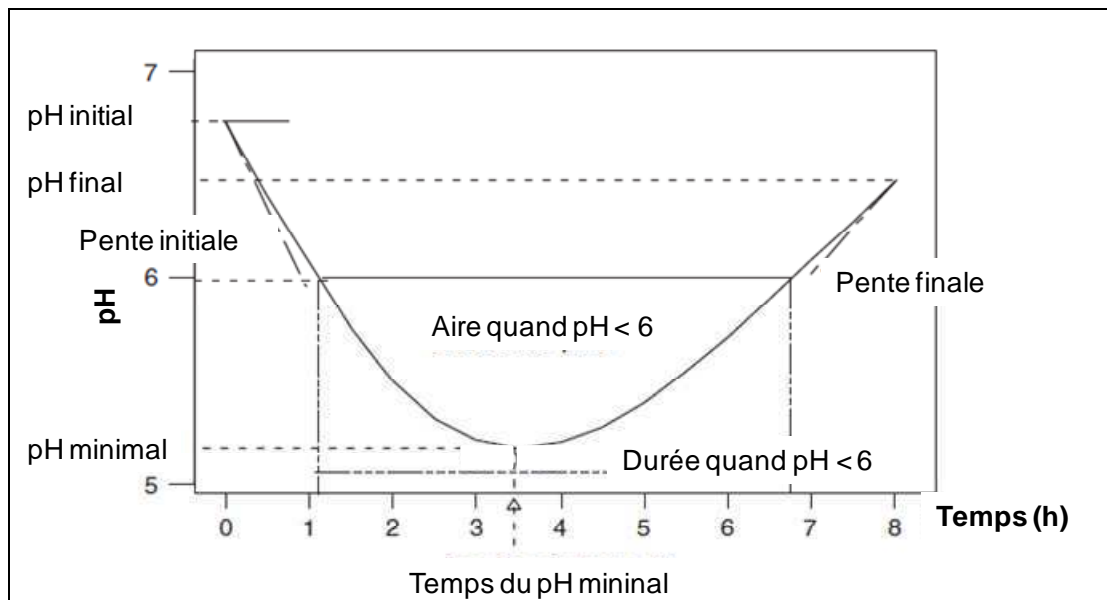


Figure 10 : Evolution postprandiale générique du pH ruminal et variables descriptives potentielles. D'après Dragomir et al. (2008).

b) Température

La température du milieu ruminal est constante et est comprise entre 38 et 40°C (Clarke, 1977). Cette température peut varier avec l'intensité des fermentations et peut monter jusqu'à 41°C. Selon Church (1976), seul l'abreuvement (eau froide) ou l'ingestion de fourrage gelé peut faire chuter la température de 5 à 10°C. Il faut près de une à deux heures pour qu'elle retrouve sa valeur initiale. Néanmoins les conséquences de cette chute de température sont très faibles (Dehority, 2003). Les protozoaires ne peuvent pas survivre à une température supérieure à 40°C, surtout lorsque de telles températures sont maintenues pendant une longue période (Hungate, 1966).

c) Anaérobiose et potentiel d'oxydo-réduction

Le rumen est caractérisé par des conditions d'anaérobiose. Néanmoins, de très faibles quantités d'oxygène peuvent entrer dans le milieu via l'alimentation, l'ingestion d'eau ou par diffusion à partir du sang (Marounek et al., 1982). Dans des conditions normales de fonctionnement du rumen, le potentiel d'oxydo-réduction est négatif et varie de -150 à -250 mV (Broberg, 1958 ; Barry et al., 1977 ; Marden et al., 2005) lorsqu'il est mesuré par rapport à l'électrode standard à hydrogène. L'activité microbienne est capable de corriger les écarts de potentiel redox et de maintenir le milieu très réducteur. Elle permet également d'éliminer les très faibles entrées d'oxygène dans le milieu (principalement les bactéries anaérobiques facultatives) (Rémond et al., 1995 ; Dehority, 2003). Le potentiel redox augmente après le repas et ensuite diminue (**Figure 11**) (Marounek et al., 1982 ; Mathieu et al., 1996 ; Andrade et al., 2002 ; Marden et al., 2005). Le potentiel redox est généralement lié négativement au pH ruminal (**Figure 12**) néanmoins cette relation n'est pas toujours significative (Julien et al., 2010).

d) Humidité et pression osmotique

La teneur en eau du contenu ruminal est en moyenne de 85 %. Cette valeur n'est cependant pas homogène dans l'ensemble du rumen. Les apports en eau se réalisent par l'abreuvement, la salivation et dans une moindre mesure par l'alimentation.

La pression osmotique du jus de rumen est proche ou plus élevée que celle du sang ce qui favorise les échanges d'eau et de molécules à travers la paroi du rumen. Le sens de ces échanges sont résumés dans la synthèse de Carter et Grovum (1990). La pression osmotique varie avec l'ingestion et l'abreuvement (**Figure 13**) (Bergen, 1972 ; Bennink et al., 1978 ; Giger-Reverdin et al., 1997). Elle est en moyenne de 250 mOsm/L avant l'ingestion d'un repas et peut atteindre 350 à 400 mOsm / L dans les 30 à 90 minutes suivant le repas (Rémond et al., 1995). En effet, il a été montré que la dissolution des minéraux des aliments ingérés et la production d'AGV par fermentation microbienne étaient les principaux facteurs déterminant l'augmentation de la pression osmotique (Bennink et al., 1978; Focant, 1986).

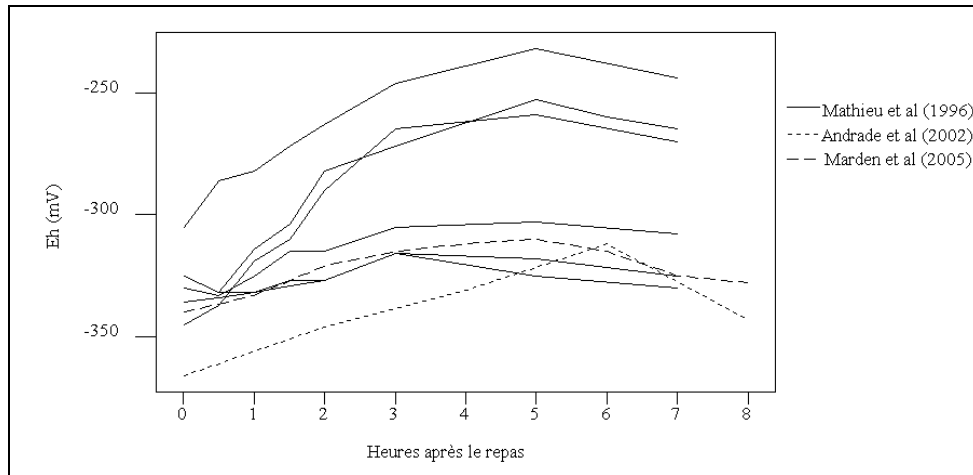


Figure 11 : Exemples de cinétiques postprandiales du potentiel redox (Eh).
Les valeurs de Eh sont données ici sans correction de l'électrode standard à hydrogène.

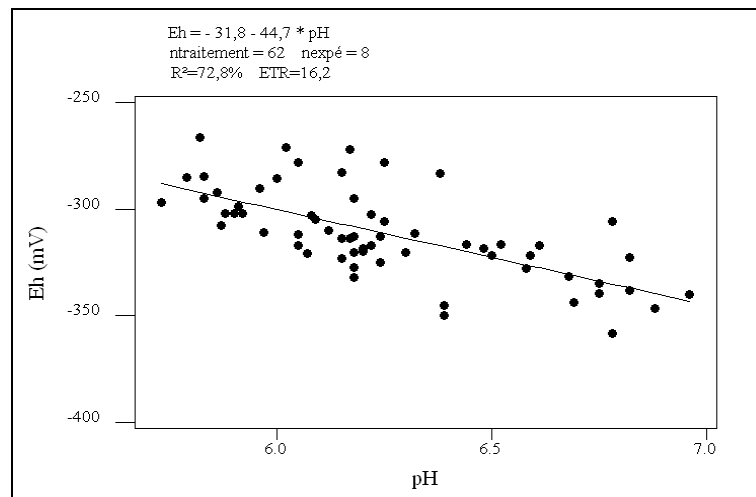


Figure 12 : Relation entre le potentiel redox (Eh) et le pH ruminal.
Le trait gras indique la relation intra-expérimentation. Les valeurs de Eh sont données ici sans correction de l'électrode standard à hydrogène. Compilation de données d'après Mathieu et al. (1996), Andrade et al. (2002) et Marden et al. (2005).

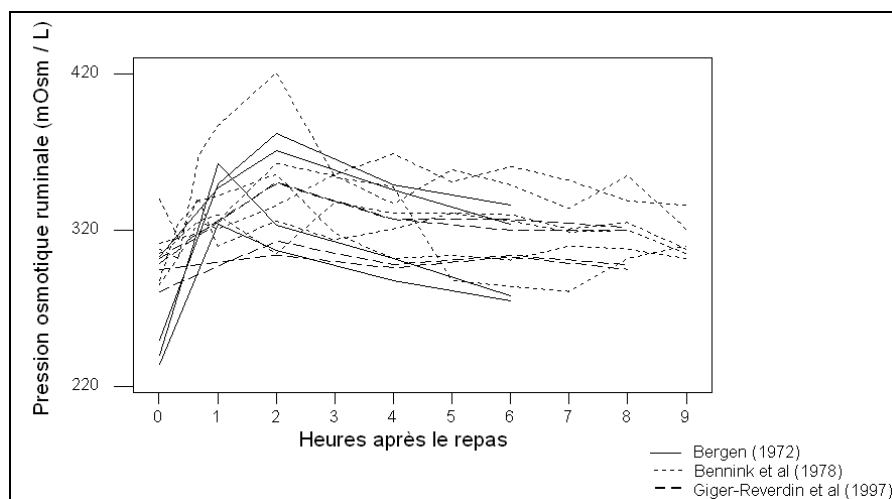


Figure 13 : Exemples de cinétiques postprandiales de la pression osmotique chez la chèvre laitière.

e) Métabolites

Le métabolisme microbien conduit à la production de gaz, d'acides organiques (AGV, acide lactique) et d'ammoniac (NH_3). La partie II.2 de cette bibliographie détaille leur formation.

Gaz

D'après Bouvier (1977), les gaz présents dans le rumen sont constitués de CO_2 (65 %), de CH_4 (entre 25 et 30 %), d'azote (5 %) et d'hydrogène (< 1 %) (Vermorel, 1995). Des traces d'oxygène ont également été détectées (voir II.1.2.c de ce chapitre). Ces proportions varient après un repas et en fonction de la nature et du niveau d'apports des aliments. La **Figure 14** montre la dynamique *in vivo* de concentration des gaz dans le rumen. La concentration en CO_2 augmente après un repas (1 h après le repas) puis diminue. La production de CO_2 est à relier avec l'intensité des fermentations dans le rumen et certainement à la forte neutralisation des acides produits par le bicarbonate. L'évolution est inverse pour la concentration en CH_4 (**Figure 14**). Le ratio $\text{CO}_2 / \text{CH}_4$ varie donc au cours de la journée (**Figure 15**). La diminution de la concentration en CH_4 en début de cinétique postprandiale est due, non pas à une réduction de la production de CH_4 , mais à une production en proportion plus importante de CO_2 . En effet, la **Figure 16** met en évidence un pic de la production de méthane après le repas. D'autre part, *in vitro*, Getachew et al. (2005) ont montré que la proportion de CH_4 augmentait au cours de l'incubation de rations mixtes pour vaches laitières (**Figure 17**), suggérant que la production de CH_4 plus tardive était reliée à la dégradation des fibres contenues dans la ration. Les gaz sont éliminés par éructation.

AGV

Chez les bovins, les proportions des AGV produits dans le rumen sont en moyenne de 66 % pour l'acétate, 19 % pour le propionate, 11 % pour le butyrate et 4 % pour AGV mineurs (isobutyrate, valérate, isovalérate) pour des animaux nourris avec des rations riches en fourrages de qualité moyenne (Sauvant et al., 2011). Le profil des AGV peut varier autour de ces valeurs (**Figure 18**) en fonction du type de régime (points autour du profil de référence). Le rapport acétate / propionate (C2 / C3) de ce profil est d'environ 3,5. La vitesse de production de ces AGV varie selon le type d'AGV et le niveau d'alimentation des animaux (ordre de grandeur entre 0,7 et 6 mmol d'AGV produits / minute) (Martin et al., 1999). Les AGV produits sont, soit absorbés au niveau de la paroi du rumen, mais de manière différentielle selon le type d'AGV (Dijkstra et al., 1993), soit ils sortent du réticulo-rumen par l'orifice réticulo-omasal au sein de la phase liquide. Leurs concentrations dans le rumen correspondent au bilan entre leur production et leurs sorties du rumen. Après un repas, leur concentration augmente pour ensuite diminuer lentement.

NH_3

Des exemples de cinétiques postprandiales de NH_3 sont donnés à la **Figure 19**. Le NH_3 peut être absorbé au niveau de la paroi du rumen pour être ensuite transformé en urée au niveau du

foie. Il est majoritairement prélevé par les microorganismes du rumen comme substrat à leur croissance.

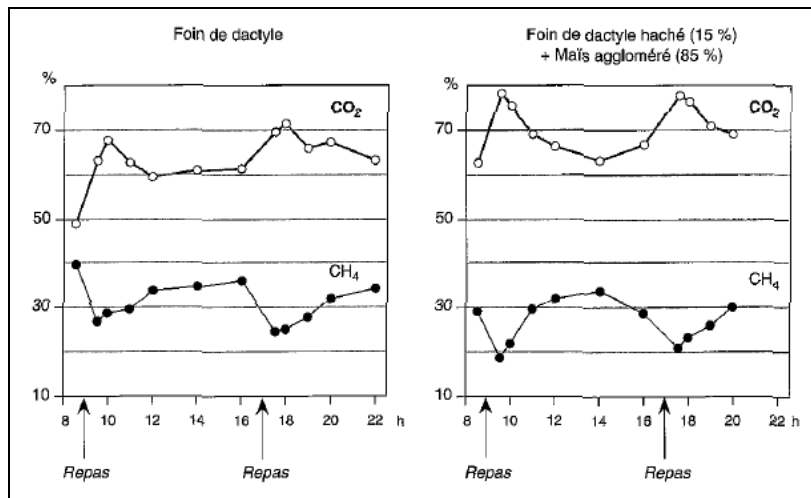


Figure 14 : Variation de la composition en CO₂ et CH₄ des gaz du rumen chez des moutons adultes recevant en deux repas égaux par jour du foin de dactyle et un mélange foin de dactyle + maïs aggloméré. D'après Bouvier (1977) cité par Vermorel (1995).

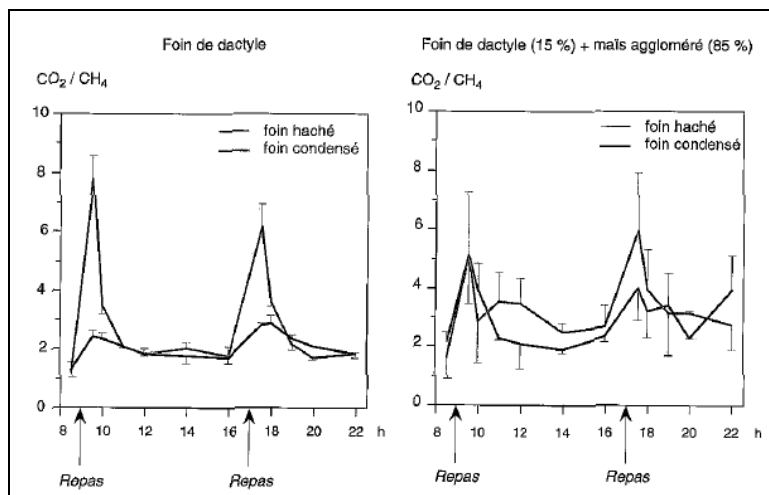


Figure 15 : Variation du ratio CO₂/CH₄ des gaz du rumen chez des moutons adultes recevant à volonté, en deux repas par jour, un foin de graminée distribué sous forme hachée ou sous forme condensée. D'après Bouvier (1977) cité par Vermorel (1995).

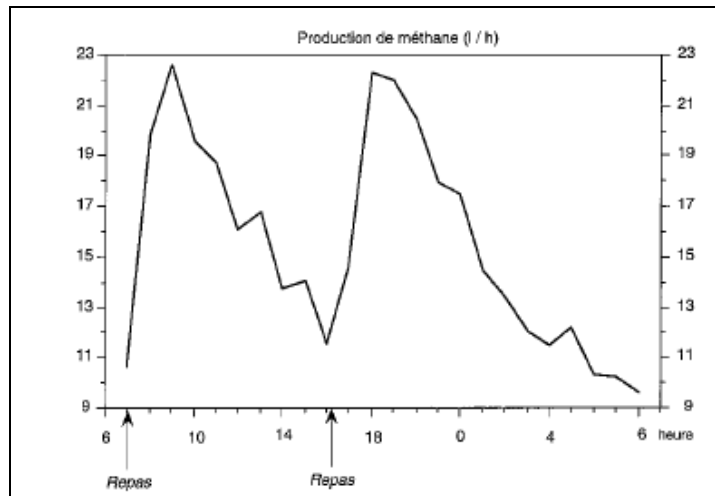


Figure 16 : Variation de la production de CH_4 d'une vache laitière recevant, en deux repas par jour, une ration composée de 1/3 de foin long et 2/3 d'aliment concentré aggloméré. D'après Kirchgessner et al (1982) cité par Vermorel (1995).

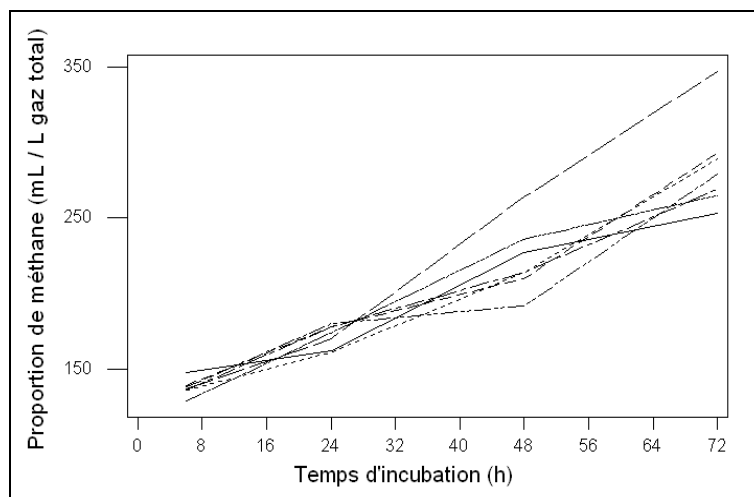


Figure 17 : Evolution de la proportion en CH_4 par rapport à la production de gaz total lors de l'incubation *in vitro* de 72 h de rations mixtes pour vaches laitières. D'après Getachew et al. (2005).

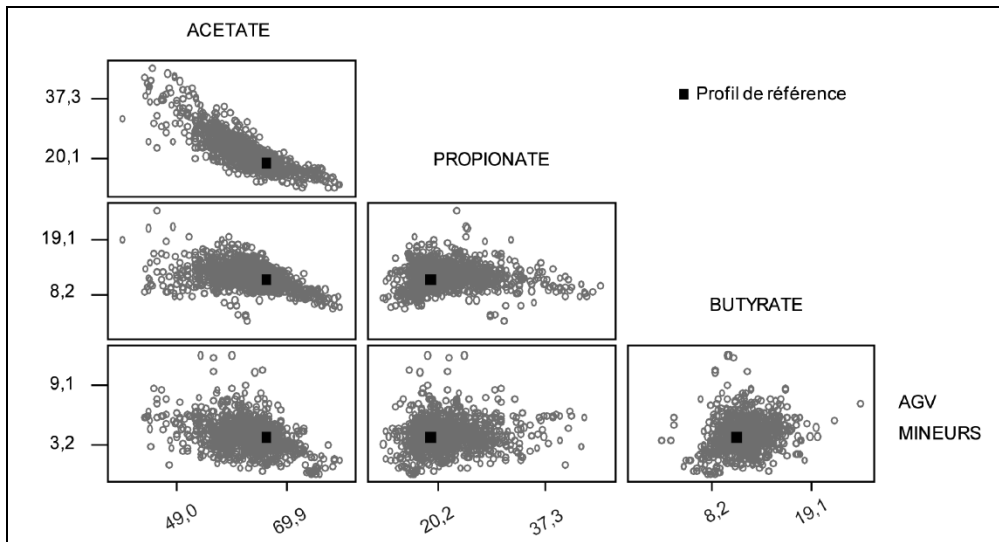


Figure 18 : Variations du profil en AGV molaire dans le jus de rumen de bovins. Issu de la base de données Bovidig. (Sauvant et al., 2011).

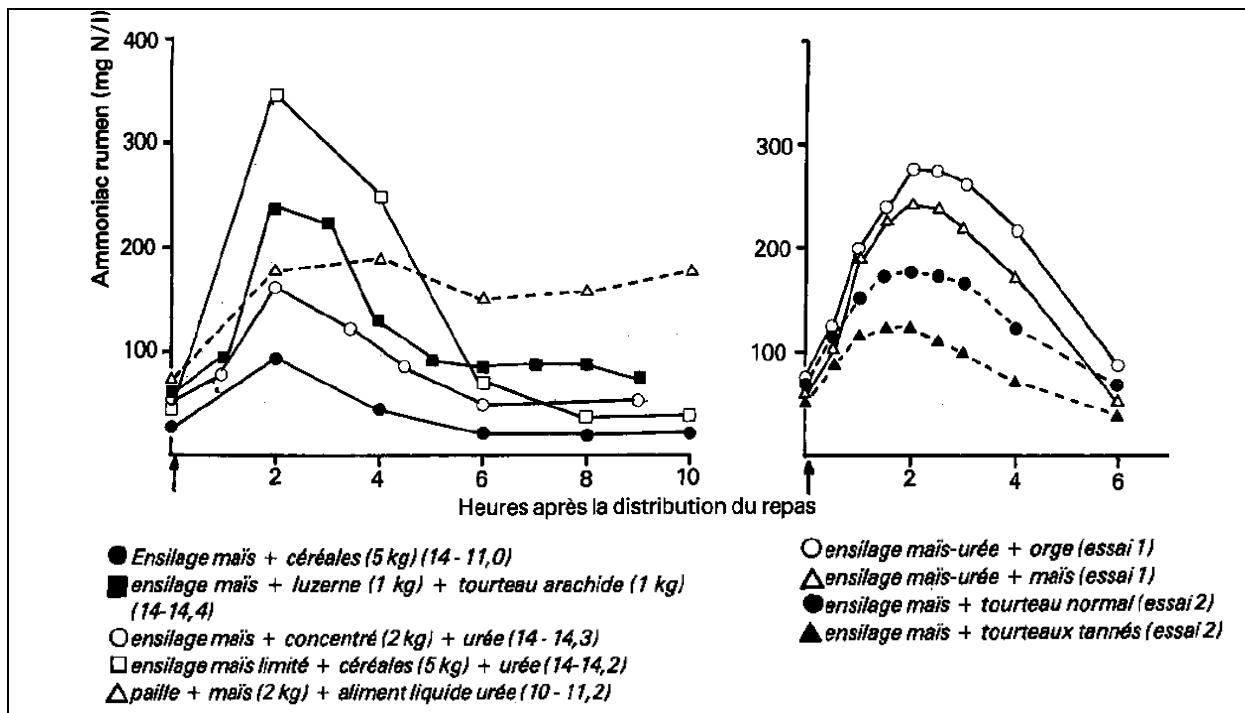


Figure 19 : Exemples de cinétiques postprandiales de la concentration en ammoniac chez la vache laitière recevant différentes rations mixtes. (Jarrige et al., 1978).

II.1.3 Transits / temps de séjour

La digestion ruminale des constituants de la ration est le produit de leur vitesse de dégradation ruminale et de leur temps de séjour dans le rumen (inverse du taux de passage) (Owens et Goetsch, 1986). Le temps de séjour des fractions indigestibles est compris entre 25 et 60 heures (Rémond et al., 1995). Il dépend de nombreux facteurs (Michalet-Doreau et Sauvant, 1989) : le niveau d'ingestion des animaux, la densité énergétique de la ration (pourcentage de concentré), la nature des constituants de la ration (nature du fourrage et du concentré) et sa forme de présentation (taille).

Au début de l'incubation de particules alimentaires, les particules diminuent en masse et restent stables en volume ce qui provoque une diminution de leur densité (**Figure 20** et **Figure 21**) (Wattiaux et al., 1992). La densité diminue surtout du fait de l'accumulation des gaz de fermentation dans les cellules de particules. De 9 à 27 h d'incubation, le volume des particules diminue plus que leur masse, donc leur densité augmente. Ainsi les petites particules, plus denses, peuvent se retrouver facilement au fond du rumen et s'écouler plus rapidement par l'orifice réticulo-omasal vers la suite du tube digestif (Rémond et al., 1995).

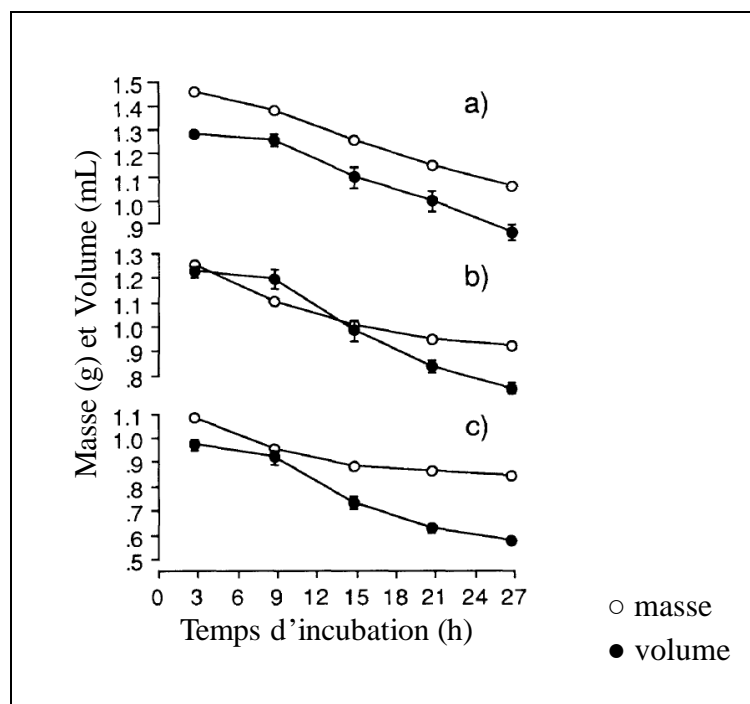


Figure 20 : Evolution de la masse et du volume de la MS résiduelle de particules issues de la digestion in vitro dans du liquide de rumen de brome (a), de foin de luzerne (b) et d'ensilage de luzerne (c). D'après Wattiaux et al. (1992).

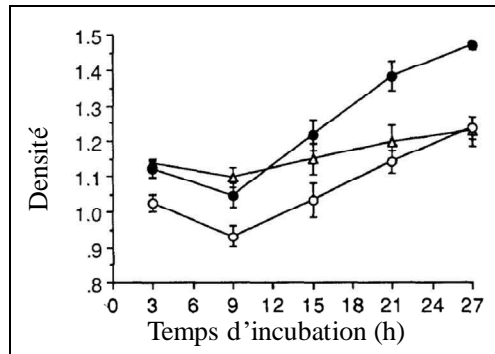


Figure 21 : Evolution de la densité d'un foin de brome (Δ), d'un foin de luzerne (\circ) et d'un ensilage de luzerne (\bullet) au cours de leur digestion in vitro dans du liquide de rumen. D'après Wattiaux et al. (1992).

II.2. Biotransformation des constituants de la ration dans le rumen : dégradation, synthèse et conversion

L'objectif de cette partie est de décrire les phénomènes de biotransformation de constituants de la ration dans le rumen. Les relations entre les phénomènes ruminiaux et les conséquences métaboliques pour l'animal seront également évoquées.

II.2.1 Glucides

a) Les différents types de glucides de la ration

Les rations des ruminants sont constituées de plusieurs types de glucides répartis dans les différents tissus des végétaux. Nous ferons la distinction entre les glucides pariétaux et les glucides présents dans les contenus cellulaires.

La paroi végétale est constituée de polysides amorphes (pectines et hémicelluloses) et de fibres de cellulose. Notons qu'elle contient également des substances non glucidiques comme de la lignine et des cires (Colonna et al., 1995 ; Jarrige et al., 1995). La paroi végétale représente 30 à 40 % de la MS des fourrages jeunes et 60 à 75 % de la MS des fourrages plus tardifs (Sauvant et al., 1995b).

Les glucides intracellulaires sont essentiellement constitués de sucres solubles (glucose, fructose, saccharose,...) et de polysides de réserve (Colonna et al., 1995 ; Jarrige et al., 1995). L'amidon, polyside de réserve, est présent dans de nombreux aliments concentrés (céréales : 40 à 70 % de la MS ; graines de protéagineux : 35 à 50 % de la MS, tables INRA-AFZ (2004)).

b) Dégradation des glucides

La dégradation des glucides dans le rumen s'effectue en deux phases : l'hydrolyse, puis la fermentation (**Figure 22**). La phase d'hydrolyse consiste en la dégradation des polymères glucidiques en oses à 5 ou 6 atomes de carbone. Cette hydrolyse est réalisée par les enzymes produites par les microorganismes. Les oses ainsi produits sont ensuite fermentés par les microorganismes par le processus de glycolyse en molécules à 3 atomes de carbone (acide pyruvique) (**Tableau 3**). A partir de l'acide pyruvique, plusieurs voies métaboliques sont alors possibles aboutissant à la formation des AGV et du lactate (Russell et Wallace, 1988).

Les AGV produits sont principalement les acides acétique (C₂), propionique (C₃), butyrique (C₄), valérique (C₅) et caproïque (C₆). Les principales équations de ces différentes voies sont résumées dans le **Tableau 3**. Ces voies fonctionnent simultanément et dans des proportions variables, en fonction du type de régime (**Figure 18** et voir partie II.1.2.e) de ce chapitre). Les AGV peuvent être également produits à partir de la dégradation des acides aminés. Lorsqu'ils sont ramifiés, ils engendrent des AGV du même type. Ainsi les acides isobutyrique (C₄) et isovalérique (C₅) sont formés respectivement à partir de la dégradation de la valine et de la leucine (Allison, 1969).

Les cinétiques de dégradation des différents aliments ont été mieux connues grâce à la méthode *in situ* (voir I.2 de ce chapitre). Ces études ont montré que les constituants pariétaux peuvent présenter des dynamiques de dégradation très différentes suivant les aliments avec, pour certains, un temps de latence très important (Sauvant et Van Milgen, 1995) (**Figure 23**). La vitesse de dégradation des glucides pariétaux des fourrages est négativement liée à la teneur en paroi végétale (**Figure 24**). Les cinétiques de dégradation de l'amidon sont très variables selon l'aliment, le type d'amidon et les traitements technologiques appliqués. On peut ainsi distinguer l'amidon « lent » (maïs, sorgho, ...) peu soluble et lentement dégradable, de l'amidon « rapide » (orge, avoine, ...) facilement soluble et dégradable (Sauvant et al., 1994). Les valeurs de taux de dégradation des différents types de glucides et leurs facteurs de variation ont été synthétisés dans la revue de Nozière et al. (2010). Les différences de cinétiques de dégradation ont un impact sur la vitesse de production des AGV (et leur profil) et la fourniture en énergie aux microorganismes. En effet, les phénomènes de fermentation décrits ci-dessus permettent de synthétiser des molécules d'ATP utilisables pour l'entretien et la croissance microbienne (**Tableau 3**).

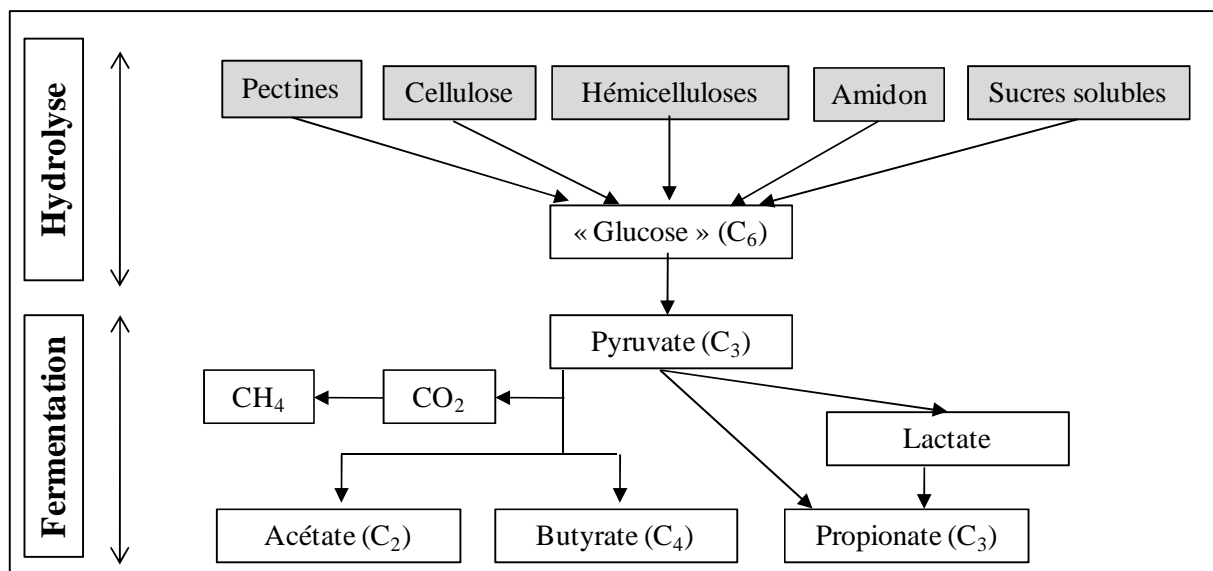


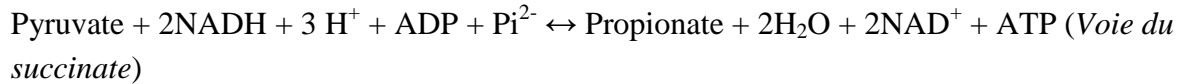
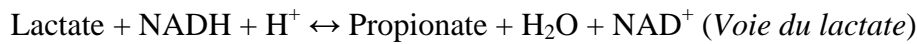
Figure 22 : Résumé des principales voies des fermentations ruminales des polymères glucidiques.

Tableau 3 : Principales équations stœchiométriques simplifiées des fermentations dans le rumen. D'après Offner et Sauvart (2006).

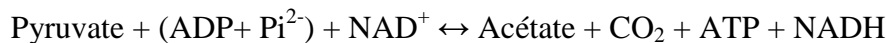
Pyruvate (glycolyse) :



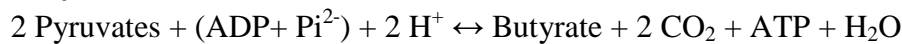
Propionate :



Acétate :



Butyrate :



Valérate :

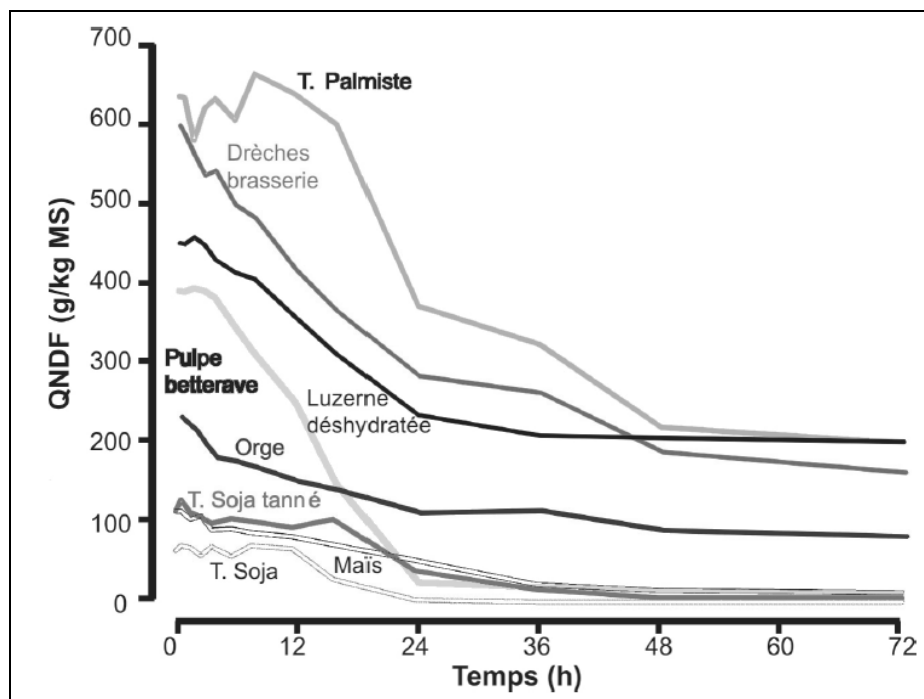
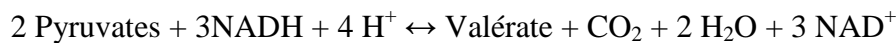


Figure 23 : Evolution de la quantité résiduelle de NDF de quelques aliments après incubation dans le rumen. (Chapoutot et al., 2010).

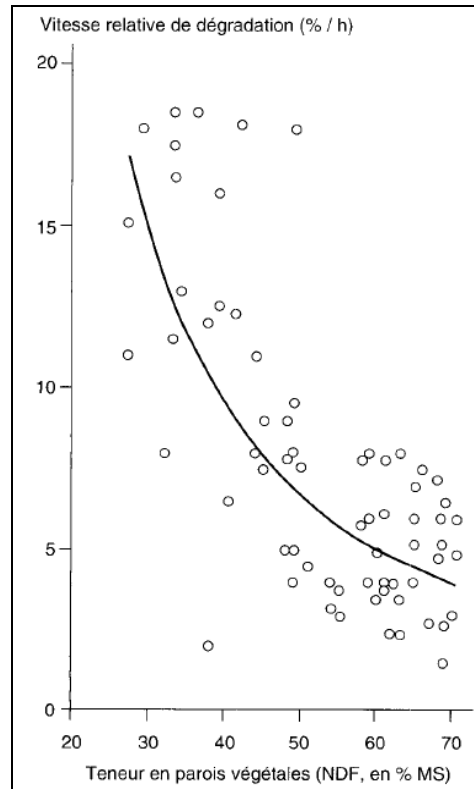
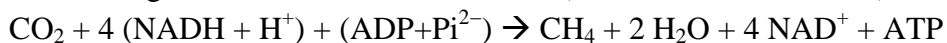


Figure 24 : Teneur en paroi végétale et vitesse de dégradation des glucides pariétaux de fourrages. (Sauvant et Van Milgen, 1995).

c) Autres produits issus de la dégradation des glucides

Les différentes voies de dégradation des glucides sont associées à la production et / ou l'utilisation d'hydrogène moléculaire, d'énergie sous forme d'ATP et la production de CO₂ (**Tableau 3**). L'hydrogène est utilisé dans différentes voies métaboliques résumées dans la **Figure 25**. La baisse de concentration en hydrogène liée à cette utilisation est essentielle pour le bon déroulement des oxydations des substrats, stimulant ainsi leur dégradation et favorisant la croissance et l'activité de nombreux microorganismes (Demeyer et Fievez, 2000).

Selon Czerkawzki (1986), *in vitro*, 48 % de l'hydrogène moléculaire serait impliqué dans l'élaboration du CH₄, 33 % dans la synthèse des AGV impairs, 12 % dans les synthèses microbiennes et 2 % dans la saturation des acides gras. Le CH₄ peut être synthétisé par les bactéries méthanogènes selon la réaction suivante (Offner et Sauvant, 2006) :



Lors de la formation d'acétate et de butyrate, des surplus d'hydrogène moléculaire sont produits alors que la production de propionate est consommatrice d'hydrogène (**Tableau 3**). Ainsi, le ratio entre ces AGV est déterminant vis-à-vis de l'intensité de la production de CH₄. Le CH₄ représente une perte en énergie et en carbone, néanmoins sa formation est essentielle pour l'écosystème du rumen, comme accepteur terminal d'hydrogène.

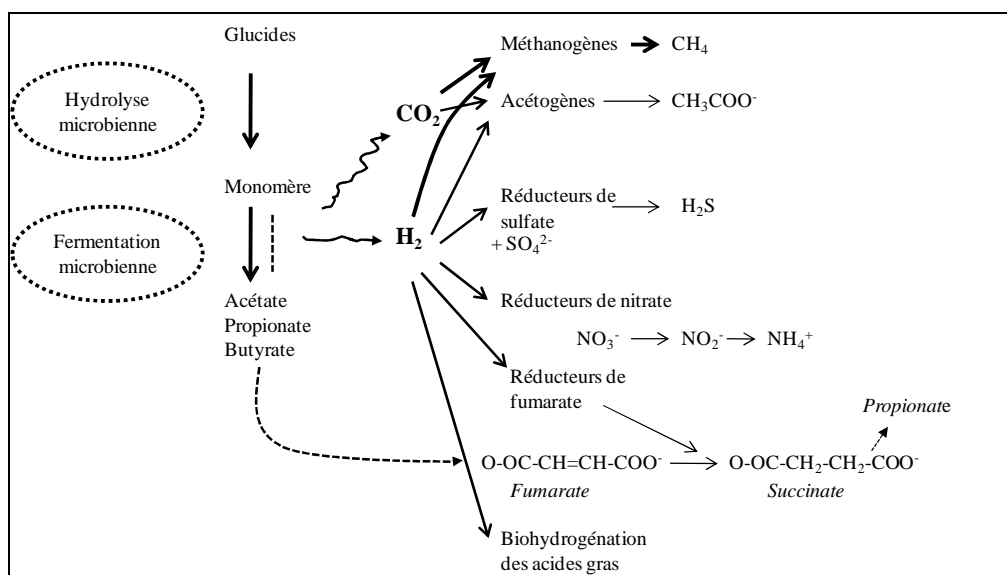


Figure 25 : Schéma des fermentations des glucides dans le rumen et des voies d'utilisation de l'hydrogène. D'après Morgavi et al. (2010).

d) Conséquences sur le métabolisme des animaux et la qualité des produits

Chez les ruminants, les AGV contribuent à environ 70 % des besoins en énergie des animaux (Bergman, 1990). La plupart des AGV sont absorbés au niveau de la paroi ruminale. Le propionate est dirigé vers le foie où il constitue le principal substrat de la néoglucogenèse quand sa disponibilité n'est pas limitante (Bobe et al., 2004). Chez la chèvre, une très faible proportion de propionate peut néanmoins échapper à la néoglucogenèse et être utilisé comme précurseur des AG impairs au niveau de la glande mammaire (Massart-Leën et al., 1983). L'acétate et le β -hydroxybutyrate (issu de l'oxydation du butyrate dans l'épithélium ruminal (Journet et al., 1995), sont moins métabolisés par le foie que le propionate (Nozière et al., 2010). Ils sont des précurseurs de la synthèse *de novo* des AG du lait ou du tissu adipeux, et constituent par ailleurs des substrats préférentiels dans les tissus en substitution du glucose (sauf pour les territoires utilisateurs obligatoires de glucose, système nerveux central par exemple). Ces AG synthétisés sont des AG pairs dont la chaîne comprend entre 4 et 16 atomes de carbone dans la glande mammaire et entre 12 et 16 atomes de carbone dans les tissus périphériques. Ils représentent sur une base molaire 40 % des AG du lait, les 60 % restants correspondant au prélèvement plasmatique d'AG (C16:0, C18 et plus) dont une partie est désaturée par la Δ^9 -désaturase active sur le C14:0, le C16:0 et le C18:0 par ordre croissant. Les enzymes mises en jeu dans la synthèse des AG du lait sont l'acétyl-CoA carboxylase, le complexe acide gras synthétase, et la Δ^9 -désaturase, bien que de nombreuses autres enzymes soient impliquées dans le processus de sécrétion de la matière grasse laitière (Chilliard et al., 2001 ; Bernard et al., 2008 ; Harvatine et al., 2009).

II.2.2 Protéines

a) Dégradation des protéines alimentaires

Les microorganismes du rumen hydrolysent, grâce aux enzymes (protéases, peptidases) qu'ils libèrent dans le milieu, les protéines en peptides puis en acides aminés. Les acides aminés sont ensuite désaminés pour former du NH_3 et des chaînes carbonées qui seront fermentées en AGV (voir partie II.2.1.b) de ce chapitre) (Wallace et Cotta, 1988). L'activité protéolytique dans le rumen dépend essentiellement de la densité de la population microbienne. La vitesse d'hydrolyse des protéines alimentaires est fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques, comme leur solubilité ou leurs structures primaire, secondaire et tertiaire (Jouany et al., 1995). Les traitements technologiques que les matières premières peuvent subir, le tannage (Zelter et al., 1970) ou des traitements thermiques (Colonna et al., 1995), peuvent également modifier les vitesses d'hydrolyse des protéines. La **Figure 26** est un exemple de la dégradation des protéines, la concentration en NH_3 et l'évolution de la taille de la population bactérienne lors de l'incubation *in vitro* de maïs avec des tailles de particules différentes et du tourteau de soja hydrolysé ou non (Newbold et Rust, 1992).

b) Synthèse microbienne

La synthèse microbienne de protéines est déterminée par la densité et le taux de croissance de la population microbienne et par le rendement avec lequel elle utilise les substrats et l'énergie disponibles. La synthèse de protéines microbienne peut se faire de deux manières : à partir de NH_3 et de chaînes carbonées et par incorporation d'AA issus de la protéolyse (voie minoritaire). L'existence des compartiments « peptides » et « acides aminés » peut engendrer un délai de 8 à 9 heures entre la dégradation ruminale d'une protéine et la synthèse microbienne qui en résulte (Sauvant et Van Milgen, 1995). Les protéines microbiennes assurent 60 à 70 % de l'apport protéique des ruminants (Demeyer et Fievez, 2000).

c) Conséquences

L'urée produite dans le foie à partir du NH_3 ruminal peut être recyclée par la salive ou à travers la paroi du rumen, ou lorsque ces processus sont saturés, l'urée peut être éliminée par la voie du lait ou par l'urine. Ce processus de recyclage est essentiel dans le cas des rations pauvres en protéines ou en N dégradable. Une relation linéaire entre le NH_3 ruminal et l'urée du lait ou du sang a été déterminée (**Figure 27**).

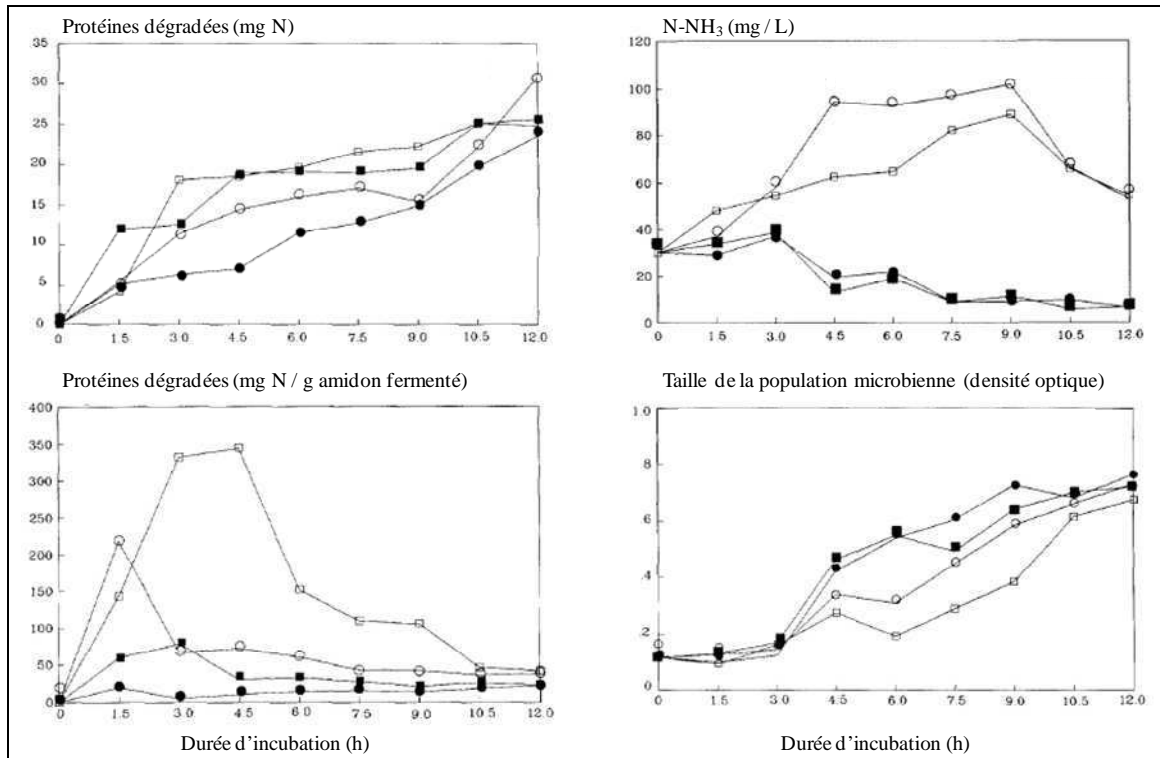


Figure 26 : Incubation in vitro de larges (symbole blanc) et petites (symboles noirs) particules de maïs utilisées comme sources d'énergie respectivement lentes et rapides avec du tourteau de soja (carrés) et du tourteau de soja hydrolysé (cercle) utilisées comme sources d'azote respectivement lentes et rapides. Dégradation des protéines (en mg N et en mg N / g d'amidon fermenté), concentration en ammoniac et taille de la population microbienne, D'après Newbold et Rust (1992).

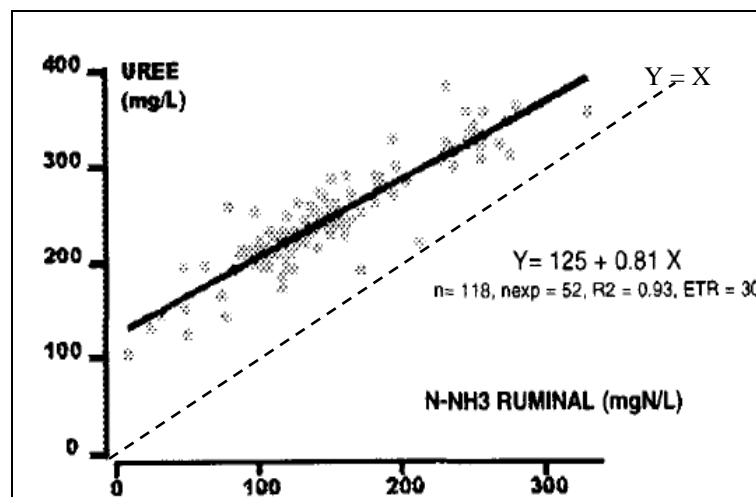


Figure 27 : Relation intra-expérience entre les teneurs en N-NH₃ et en urée du sang ou du lait. (Sauvant et al., 2001).

II.2.3 Lipides

a) Dégradation des lipides et biohydrogénation des AG insaturés dans le rumen

La digestion des lipides chez les ruminants a fait l'objet de nombreuses revues (Jenkins, 1993 ; Doreau et Chilliard, 1997 ; Harfoot et Hazlewood, 1997 ; Sauvart et Bas, 2001 ; Jenkins et al., 2008).

Les lipides de la ration sont principalement composés de galactolipides, phospholipides (pour les fourrages) et de triglycérides (pour les aliments concentrés). Ces lipides subissent tout d'abord une lipolyse libérant les AG des triglycérides. *Anaerovibrio lipolytica* est la principale bactérie impliquée dans cette lipolyse (Lourenço et al., 2010).

Les AG libres insaturés peuvent alors subir des réactions d'isomérisation et de biohydrogénation. Les isomérases transforment les liaisons *cis* en liaison *trans*. Les réductases saturent quant à elles les doubles liaisons. Les principales voies connues ou probables de la biohydrogénation ruminale des acides linoléique (*cis*-9, *cis*-12 C18:2), linoléique (*cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3) et oléique (*cis*-9 C18:1) sont décrites dans la **Figure 28**. La biohydrogénation du *cis*-9, *cis*-12 C18:2 et du *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3 conduit à la formation d'acide stéarique (C18:0) suite à une isomérisation et une série de réductions. Les vitesses de réactions sont différentes, notamment la dernière réduction est plus lente et fonction du pH. Ainsi, les flux digestifs sortant du rumen contiennent plus de C18:1 *trans* que de C18:2 et C18:3 *trans*. Parmi les différentes voies métaboliques de biohydrogénation de ces AGPI, les voies du *trans* 11 et du *trans* 10 sont souvent rencontrées (**Figure 29**), principalement celle du *trans*-11. La voie du *trans*-10 s'observe principalement avec des rations riches en amidon et/ou une supplémentation en huiles végétales ou de poisson (Bauman et Griinari, 2001 ; Shingfield et Griinari, 2007). L'hydrogénation entraîne la disparition de plus de 70 % du *cis*-9 C18:1, plus de 80 % du *cis*-9, *cis*-12 C18:2 et plus de 90 % des *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3. L'importance de ces réactions est très dépendante de la composition des rations. Une méta-analyse traitant des flux d'AG chez les ruminants et leurs facteurs de variation a été réalisée récemment (Glasser et al., 2008b ; Schmidely et al., 2008).

Les bactéries responsables de la biohydrogénation peuvent être classées selon 2 groupes : les bactéries dont la croissance est inhibée par l'acide linoléique (dose inférieure à 200 µg / mL) et ayant une activité butyrate-kinase supérieure à 600 U / mg de protéines (*Butyrivibrio proteoclasticus* et *Butyrivibrio hungatei*) et les bactéries non inhibées par l'acide linoléique et ayant une activité butyrate-kinase inférieure à 40 U / mg de protéines (*Butyrivibrio fibrisolvens* et *Pseudobutyrvibrio spp.*) (Lourenço et al., 2010). Cette nouvelle classification remet en cause celle proposée par Harfoot et Hazlewood (1997) qui classaient les bactéries impliquées dans la biohydrogénation en 2 groupes : les bactéries du groupe A, capables d'hydrogéner les acides linoléique et linoléique en *trans*-11 C18:1, et les bactéries du groupe B, capables d'hydrogéner les acides linoléique et linoléique en C18:0. Les bactéries *Butyrivibrio spp* ne sont pas responsables de l'hydrogénation de l'acide linoléique en *trans*-10, *cis*-12 C18:2 (**Figure 29**), qui est certainement due à *Propionibacterium acnes* et dans une moindre mesure à *Megasphaera elsdenii* (Lourenço et al., 2010).

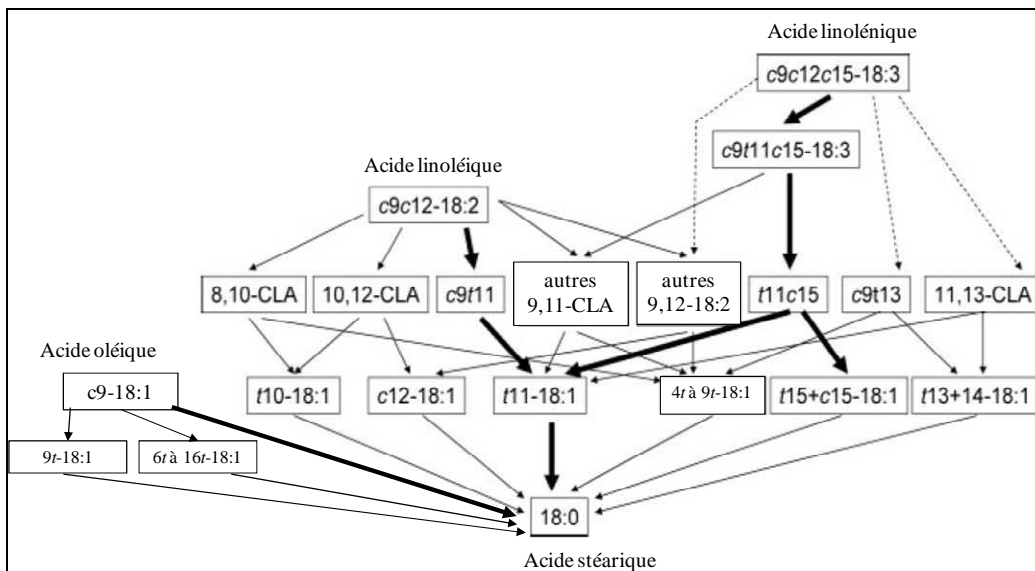


Figure 28 : Principales voies connues ou probables de la biohydrogénation ruminale des acides linoléique et linoléique. D'après Chilliard et al. (2007).

En gras : voies majeures ; en traits pleins : voies probables suggérées par les études in vitro ; en pointillés : voies probables avec des intermédiaires à préciser. Lorsque les configurations cis ou trans ne sont pas indiquées, toutes les combinaisons peuvent exister.

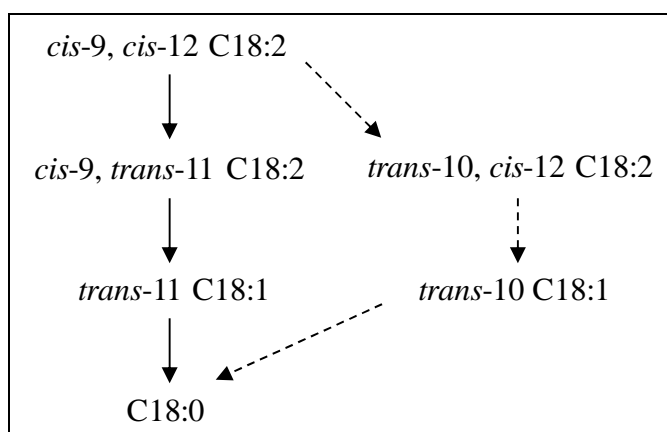


Figure 29 : Biohydrogénation ruminale de l'acide linoléique: détail des voies du trans-11 et du trans-10. D'après Shingfield et Grinari (2007).

b) *Synthèse microbienne de lipides*

Les microbes du rumen sont capables de synthétiser leurs propres lipides. Il s'agit d'AG à chaînes linéaires pairs et impairs et d'AG ramifiés (Sauvant et Bas, 2001 ; Vlaeminck et al., 2006) (**Tableau 4**). Les précurseurs de ces synthèses sont l'acétate, le propionate, l'isovalérate, l'isobutyrate et les chaînes carbonées ramifiées issues de la dégradation des acides aminés ramifiés (valine, leucine, isoleucine). La synthèse des AG impairs et ramifiés par les bactéries du rumen est schématisée dans la **Figure 30**.

Tableau 4 : Composition moyenne en acides gras des bactéries du rumen (régimes non supplémentés en lipides). (Sauvant et Bas, 2001).

Acides gras	Nombre ⁽¹⁾	% des AG	Ecart type
C12:0	31	1,4	1,1
C14:0	33	3,2	1,4
Iso C15	15	2,0	1,0
Anteiso C15	15	2,9	1,1
C15:0	18	2,9	1,8
Iso C16	15	1,0	0,6
C16:0	35	22,9	4,5
C16:1	15	1,1	0,9
Iso C17	15	0,7	0,2
AnteisoC17	15	1,0	0,04
C17:0	23	1,1	0,6
C18:0	35	39,0	12,0
C18:1 trans	17	2,9	1,4
C18:1 cis	17	2,5	1,4
Total C18:1	35	10,4	5,4
C18:2	35	3,0	1,9
C20:0	16	1,0	0,3
C22:0	15	0,4	0,2

⁽¹⁾ Ne sont considérés que les acides pour lesquels au moins 15 valeurs ont été documentées.

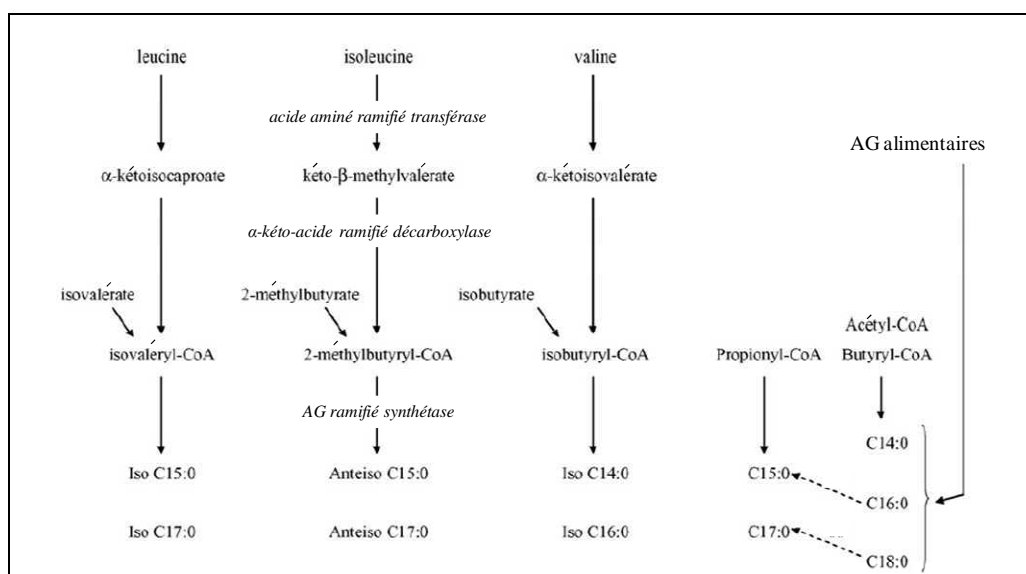


Figure 30 : Synthèse des acides gras impairs et ramifiés par les bactéries du rumen. D'après Vlaeminck et al. (2006).

c) Conséquences sur la composition en AG du lait (Figure 31)

La glande mammaire prélève des AG des triglycérides circulants (principalement en C16 et C18) dans le sang artériel. Elle peut également prélever dans le plasma des AG non estérifiés, en particulier en cas de mobilisation des réserves adipeuses en début de lactation. Ces prélèvements représentent 60 % des AG du lait et peuvent s'accroître lors d'une supplémentation lipidique ou en cas de mobilisation de réserves corporelles (début de lactation). De plus, la glande mammaire peut désaturer le C14:0, C16:0, C18:0 (environ 50 % du prélèvement sanguin) et *trans*-11 C18:1 (10 à 40 %) grâce à la Δ^9 -désaturase pour former respectivement du *cis*-9 C14:0, *cis*-9 C16:0, *cis*-9 C18:1 et *cis*-9, *trans*-11 C18:2. Cette action a un effet inverse à la biohydrogénation ruminale en diminuant le degré de saturation des AG du lait et favorisant ainsi la fluidité des MG du lait nécessaire à sa sécrétion et à sa bonne digestion par le ruminant non sevré. Cette désaturation est la principale source de CLA (*Conjugated Linoleic Acid*) du lait *cis*-9, *trans*-11 C18:2 (Chilliard et al., 2007).

Enfin, les AG à chaîne longue, principalement *trans*-10, *cis*-12 C18:2, en interaction probable avec d'autres AG *trans* (*cis*-10, *trans*-12 CLA, *trans*-9, *cis*-11 et *trans*-10 18:1) peuvent exercer une inhibition sur la synthèse mammaire *de novo* des AG courts et moyens et faire chuter la sécrétion de matières grasses dans le lait chez la vache laitière (Bauman et al., 2011 ; Shingfield et al., 2010). Des approches moléculaires ont montré, au niveau de la glande mammaire, des diminutions d'expression de facteurs de transcription impliqués dans la synthèse d'AG, comme la SREBP1 (*sterol regulatory element-binding protein*) et la S14 (*thyroid hormone-responsive spot 14*) (Bauman et al., 2011).

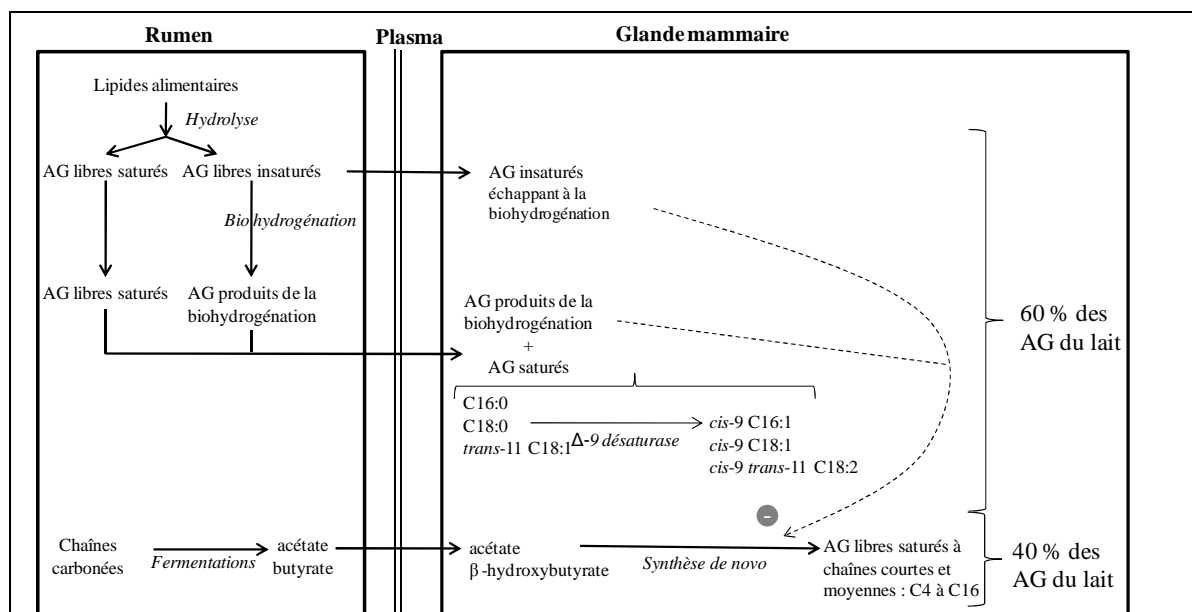


Figure 31 : Représentations schématiques des phénomènes ruminiaux et composition en acides gras du lait. D'après Chilliard (2007).

III. Modélisation mécaniste de la biotransformation dans le rumen

Le réticulo-rumen est un écosystème complexe en raison de la grande diversité des microorganismes qui y vivent, des substrats qu'il contient, des voies métaboliques qui s'y mettent en place, etc... La recherche expérimentale a fourni et fournit encore de grandes quantités de données qui nécessitent d'être synthétisées et agrégées afin de dégager de nouveaux questionnements de recherche. La modélisation est une méthode de choix pour contribuer à la réalisation de ces objectifs

Dans cette partie, nous verrons en premier lieu les différents types de modèles qui existent pour décrire la digestion chez les ruminants. Parmi ces types de modèles, nous détaillerons ensuite les modèles mécanistes de rumen existants, du fait de leur caractère explicatif des phénomènes se déroulant dans le rumen et intégratif des données expérimentales. Néanmoins, ces modèles présentent de nombreuses limites et nous ferons un point sur les voies d'amélioration actuellement proposées.

III.1. Typologies des modèles existants en nutrition des ruminants

Les approches de la modélisation appliquées à la nutrition des ruminants sont très diversifiées. Les modèles utilisés peuvent être caractérisés selon trois classes (France et Thornley, 1984).

III.1.1 Modèles statiques vs. dynamiques

Les modèles statiques ne prennent pas en compte le temps comme variable. En d'autres termes, le processus considéré se maintient dans un état stationnaire « moyen ». Ils sont généralement utilisés pour prédire des valeurs moyennes et faire des bilans à l'échelle de la journée.

Les modèles dynamiques, quant à eux, prennent en compte le temps comme variable. Il est souvent matérialisé dans des équations différentielles par rapport au temps (Sauvant, 1992).

III.1.2 Modèles empiriques vs. mécanistes

Les modèles empiriques décrivent les propriétés externes du système considéré (Sauvant, 1992) sans en connaître les rouages internes (= boîte noire) (Sauvant, 1988). Il s'agit d'ajuster des données expérimentales, rassemblées sous forme de bases de données, pour dégager des lois générales et prévoir des modifications de ces lois selon des facteurs de variations. Les modèles peuvent être statiques (réponse à un facteur) ou dynamiques (courbes de croissance) (Sauvant, 1992). Les systèmes d'unités d'alimentation, comme celui créé par l'INRA, sont basés sur ce type de modélisation (Vérité et al., 1987). Parmi les méthodes de modélisation empirique, la méta-analyse est un outil efficace pour analyser et synthétiser des ensembles de données (Sauvant et al., 2008b).

Au contraire, les modèles mécanistes ont pour objectif d'expliquer le comportement d'un système à un niveau donné en se basant sur des processus aux niveaux sous-jacents. La

majorité des modèles mécanistes en nutrition animale sont basés sur une représentation compartimentale du système accompagnée d'un ensemble d'équations différentielles, déterministes et dynamiques attribuées à chacun des compartiments.

La modélisation mécaniste n'exclut pas complètement la modélisation empirique. En effet, lors de la construction de modèles mécanistes, les relations sur lesquelles ils s'appuient sont souvent issues de la modélisation empirique (Sauvant, 1992).

III.1.3 Modèles déterministes vs. stochastiques

Les modèles déterministes, basés sur des paramètres moyens sans variabilité associée, effectuent des prédictions sans distribution de probabilité associée.

Les modèles stochastiques, encore appelés probabilistes, basés sur des paramètres aléatoires ou des distributions de probabilité, réalisent des prédictions de valeurs en précisant la quantité et la variance associée (Sauvant, 1992).

Dans la suite, nous nous intéresserons spécifiquement à la modélisation mécaniste, déterministe et dynamique des biotransformations dans le rumen, car ces modèles sont explicatifs par nature et intègrent des données dynamiques expérimentales sous-jacentes. L'objectif de ces modèles est de rendre compte fidèlement les variations liées au régime ou à la dynamique des particules ou des micro-populations en intégrant à ces modèles les facteurs explicatifs des variations observées.

III.2. Modèles mécanistes de rumen

III.2.1 Evolution du nombre de modèles mécanistes de rumen au cours du temps

De nombreux modèles de rumen ont été développés. La **Figure 32** illustre le nombre de publications traitant de la modélisation mécaniste du rumen au cours du temps. Les publications représentées dans cette figure comprennent les publications initiales de nouveaux modèles de rumen (voir partie III.2.3.a) de ce chapitre), les améliorations apportées aux modèles préexistants ou des sous-modèles de certains phénomènes se produisant dans le rumen.

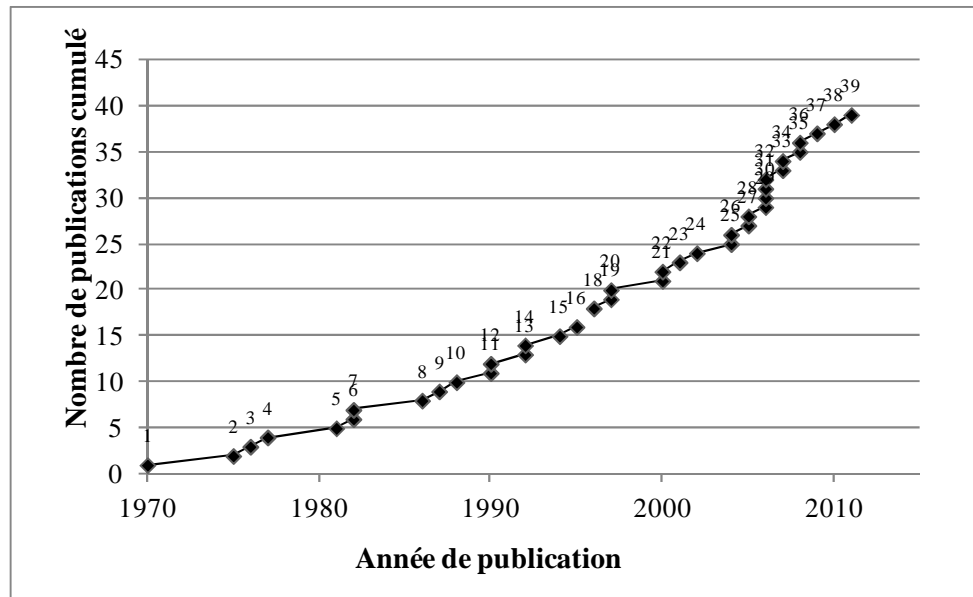


Figure 32 : Evolution du nombre de publications sur la modélisation mécaniste du rumen au cours du temps.(voir Annexe 1 pour le détail des publications).

III.2.2 Représentation du système ruminal

Le système ruminal peut tout d’abord être défini par sa frontière qui est, en général, la paroi ruminale. Il s’agit d’un système ouvert, avec, en entrée, les aliments ingérés et la salive produite par l’animal et, en sortie, l’absorption des nutriments à travers la paroi et le passage de digesta dans la suite du tube digestif (Sauvant, 1988). Quasiment tous les modèles de rumen représentent les phénomènes suivants : dégradation et sorties de différentes classes de substrats, croissance et sortie de plusieurs classes de microorganismes et quantifications de produits terminaux des fermentations (les AGV par exemple) (Dijkstra et France, 1996 ; Bannink, 2007).

Lors du développement d’un modèle de rumen, il s’agit de faire des choix de représentation, choix souvent déterminés par les objectifs du modèle (développement d’un phénomène en particulier). Parmi ces choix, nous pouvons citer :

- le nombre de compartiments à considérer dans le système (Sauvant, 1988 ; Offner, 2003) :
 - le nombre de populations microbiennes et, s’il y en a plusieurs, le type de distinction : distinction par fonction (cellulolytiques, amylolytiques, protozoaires) ou par le mode fixation aux particules (attachées, libres). Dijkstra et al. (1992) ont adopté la distinction par fonction, alors que Lescoat et Sauvant (1995) ont choisi la distinction par mode de fixation ;
 - le nombre de fractions alimentaires considérées :
 - par type de nutriments : glucides / protéines / lipides / matières minérales ; avec des niveaux de détails de la composition chimique variés : distinction fibres / amidon / glucides solubles pour les glucides (Baldwin et al., 1987 ; Dijkstra et al., 1992 ; Petruzzi et al., 2002),

- protéines / AA / NH₃ pour les matières azotées (Baldwin et al., 1987),
AG saturés / insaturés pour les lipides (Dijkstra et al., 2000) ;
- selon la dégradabilité et la solubilité des fractions considérées :
dégradables vs. non dégradables (Dijkstra et al., 1992; Petruzzi et al.,
2002) voire une différenciation selon les vitesses de dégradation
(Lescoat et Sauvant, 1995), solubles vs. insolubles (Baldwin et al.,
1987; Dijkstra et al., 1992; Petruzzi et al., 2002) ;
- par taille de particules (Baldwin et al., 1987 ; Petruzzi et al., 2002) ;
- le nombre de substances issues de la dégradation des aliments : profil en AGV,
AA, etc...
- le type de relations entre les différentes variables d'état (Sauvant, 1988) :
 - relations entre les différentes fractions alimentaires (particules d'une taille à
l'autre, passages à des métabolites intermédiaires) et les substances issues de la
dégradation des aliments ;
 - relations entre les microorganismes et les fractions alimentaires ;
 - relations entre les microorganismes et les substances issues de la dégradation
des aliments ;
 - relations entre les microorganismes (prédation) ;
- le type de contrôle : pH, taux de passage, etc...

Les équations différentielles pour représenter les cinétiques de dégradation sont diversifiées : loi d'action de masse, cinétique de Michaelis et Menten (Mertens, 2005). Les équations non linéaires peuvent poser problème lors de l'intégration.

III.2.3 Principaux modèles de rumen et études comparatives

a) Principaux modèles de rumen

Les premiers modèles mécanistes de rumen datent des années 1970 sous l'impulsion notamment de l'Américain R. L. Baldwin (Baldwin et al., 1970 ; Reichl et Baldwin, 1975; Ulyatt et al., 1976 ; Baldwin et al., 1977). Le nombre de publications a ensuite progressivement augmenté. Parmi les publications de références de la modélisation du rumen entier, nous pouvons citer :

- le modèle « Molly » développé par Baldwin et al. (1987) à l'université de Davis (Californie),
- le modèle « Cornell Net Carbohydrate and Protein System » développé par l'université de Cornell (New York) depuis 1992 (Russell et al., 1992 ; Sniffen et al., 1992), modèle statique,
- le modèle de Danfaer (1990),
- le modèle de Dijkstra et al. (1992),
- le modèle de Lescoat et Sauvant (1995).

b) Etudes comparatives des modèles de rumen

Des études comparatives de ces modèles ont été effectuées par différents auteurs. Il existe deux types d'études comparatives : les études qualitatives et les études quantitatives.

Les études comparatives qualitatives sont essentielles pour le développement de nouveaux modèles. Elles mettent en évidence les approches déjà utilisées, les similitudes et différences entre les modèles, ce qui permet de réduire les temps de mise au point des nouveaux modèles. Parmi ces études, nous pouvons citer celles de : Sauvart (1988), Sauvart et al. (1995a), Dijkstra et France (1996), Sauvart (1997) et Offner (2003).

Les études quantitatives permettent d'évaluer la qualité de simulation des modèles considérés. Pour cela, il s'agit de développer des bases de données sur les critères d'entrée des modèles (rations alimentaires, caractéristiques des animaux) et de sortie (paramètres ruminiaux, flux digestifs) et d'effectuer des simulations. Une analyse comparative des résultats obtenus permet d'identifier les forces et faiblesses des modèles, ce qui est très utile pour le développement des futurs modèles. Parmi ces études, nous pouvons citer celles de : Ramangasoavina et Sauvart (1993), Kohn et al. (1995), Bannink et Visser (1997), Bannink et al. (1997), Offner et Sauvart (2004).

c) Résultats des études comparatives : faiblesses des principaux modèles de rumen

Les études comparatives de Bannink et al. (1997) et d'Offner et Sauvart (2004) ont montré que les modèles de rumen (Baldwin et al., 1987 ; Danfaer, 1990 ; Dijkstra et al., 1992; Russell et al., 1992 ; Lescoat et Sauvart, 1995) ne prédisent pas précisément la dégradation des fibres et le profil en AGV résultant des fermentations. La représentation des compartiments microbiens est également à améliorer (Bannink et al., 1997). Les interactions digestives sont peu prises en compte ou non validées (Offner, 2003). Les modèles sont basés sur l'hypothèse d'une alimentation en continu, alors qu'en réalité les animaux s'alimentent sur plusieurs repas au cours de la journée, ce qui cause des fluctuations actuellement non prises en compte dans les modèles de rumen (Bannink et al., 1997 ; Offner et Sauvart, 2004). Aucune détermination mécaniste du pH n'a été proposée (Bannink, 2007) et la prédiction de la production de gaz n'est pas incluse dans ces modèles (Benchaar et al., 1998). Ainsi les modèles mécanistes ne proposent pas de meilleures prédictions que les modèles empiriques. Face aux faiblesses de ces modèles de rumen, de nombreuses améliorations ont été par la suite apportées.

III.2.4 Vers une amélioration des modèles de rumen

Les modèles de rumen publiés après le milieu des années 1990 sont pour la plupart, soit issus des modèles préexistants cités plus haut ou très apparentés à ces modèles, soit des sous-modèles d'une partie du fonctionnement du rumen développés indépendamment d'un modèle de rumen initial (par exemple : dynamique de la phase liquide et des particules dans le rumen et prédiction quantitative de leur sortie du rumen (Seo et al., 2007 ; Seo et al., 2009), biohydrogénation des AG (Moate et al., 2004 ; Ribeiro et al., 2007 ; Moate et al., 2008).

Pour illustrer l'évolution des modèles de rumen préexistants, nous pouvons prendre l'exemple du modèle de Dijkstra et al. (1992) qui a été amélioré par développement de certaines de ses parties ou par ajout de nouvelles parties :

- activité des protozoaires et relations entre protozoaires et bactéries (Dijkstra, 1994) ;

- production de méthane (Mills et al., 2001), développé ensuite par Bannink et al. (2005) et Ellis et al. (2010) ;
- dégradation de la matière grasse, biohydrogénation des AG et influence sur l'activité microbienne (Dijkstra et al., 2000) ;
- métabolisme de l'azote et du phosphore (Kebreab et al., 2004).

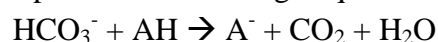
Dans cette partie, nous nous focaliserons sur quelques points en voie d'amélioration.

a) *Représentations du pH ruminal*

Dans les modèles mécanistes de rumen, le pH est généralement considéré comme une variable d'entrée ou lorsqu'il est une « sortie » du modèle, son estimation est faite de façon empirique (Bannink, 2007). Chez Lescoat et Sauvant (1995) et chez Mills et al. (2001), le pH est déterminé par rapport à la concentration en AGV comme le proposent Tamminga et van Vuuren (1988), chez Argyle et Baldwin (1988), par rapport aux concentrations en AGV et en lactate. Chez Pitt et al. (1996), le pH est calculé en fonction de la teneur en NDF effectif (eNDF) du régime. Ces approches sont assez peu satisfaisantes compte tenu de l'importance de ce paramètre dans le fonctionnement ruminal : il est à la fois un résultat des fermentations et un facteur déterminant des réactions (Bannink, 2007). Une modélisation mécaniste passerait par l'intégration de tous les facteurs pouvant jouer sur le pH : production de salive, production d'AGV, sortie des AGV par absorption à travers la paroi ruminale (passive ou par transporteur) ou par sortie des digesta (Kebreab et al., 2009). Jusqu'à présent, très peu d'études ont cherché à modéliser le pH d'une façon plus mécaniste (Pitt et al., 1996 ; Imamidoost et Cant, 2005 ; Offner et Sauvant, 2006).

L'approche d'Offner et Sauvant (2006) est novatrice, car elle est basée sur la prise en compte des principes de la thermodynamique appliqués au métabolisme microbien. Cette étude représente un compartiment ions hydrogène (H^+) en lien avec la production des acides organiques qui se dissocient entre leurs formes acide et basique (acides lactique, acétique, propionique, butyrique, valérique), le H_2 , le CO_2 et le bicarbonate. Les variations du pH ruminal sont issues des variations du compartiment H^+ ($pH = -\text{Log}[H^+]$). Malgré cet effort mécaniste, les prédictions du pH de ce modèle ne sont pas satisfaisantes, ce qui est sûrement dû à un problème de représentation de la dissociation des acides. De plus, un compartiment comme le compartiment H^+ peut entraîner des problèmes d'instabilité du modèle du fait de sa petite taille et de son turnover rapide.

L'approche d'Imamidoost et Cant (2005) est particulièrement intéressante, car elle s'appuie sur les lois de la chimie des solutions. Elle prend en compte à la fois les tampons contenus dans la salive et l'aliment, les productions d'acides organiques lors des fermentations ainsi que leur disparition par absorption ou par passage avec les digesta. Les quantités de tampons et d'acides organiques sont liées par l'équation chimique suivante :



avec AH la forme acide des acides organiques et A^- la forme basique

Le modèle d'Imamidoost et Cant (2005) repose sur l'hypothèse forte que ces espèces chimiques sont constamment en équilibre (Kohn et Dunlap, 1998) et ne fait pas intervenir de

compartiment H^+ . La dynamique de pH est enfin déterminée par l'équation d'Henderson et d'Hasselbach :

$$pH = pKa + \log ([A^-] / [AH])$$

Les prédictions de ce modèle sont globalement assez satisfaisantes.

Notons que les modèles d'Imamidoost et Cant (2005) et d'Offner et Sauvant (2006) permettent de mettre en évidence la production de gaz (CO_2) à partir des bicarbonates de la salive lors de la dissociation des acides organiques en bases.

b) Prédiction du profil en AGV

La prédiction du profil en AGV des modèles mécanistes du rumen est considérée comme imprécise (Bannink et al., 1997) et comme l'un des plus grands points faibles des modèles mécanistes de rumen (Sauvant, 1997). Cette prédiction, en particulier celle des proportions en acétate, propionate et butyrate, est pourtant essentielle pour la compréhension et la prédiction d'autres variables comme le méthane, le pH (quand la détermination est empirique, voir partie III.2.4.a) de ce chapitre), la production de lait et le bilan énergétique (Morvay et al., 2011).

La prédiction du profil en AGV dans les modèles de Baldwin et al. (1987), Dijkstra et al. (1992) et Danfaer (1990) repose sur les équations empiriques de production en AGV proposées par Murphy et al. (1982). Néanmoins, ces équations ne sont pas fiables pour les régimes riches en concentrés (Sauvant, 1997). Lescoat et Sauvant (1995) ont également utilisé des équations empiriques de profils en AGV dérivées d'analyse statistique de données de la littérature (méta-analyse) sur le critère pourcentage de concentrés (Lescoat et Sauvant, 1994). La modélisation empirique et notamment la méta-analyse a été fortement utilisée pour trouver de meilleurs coefficients de stoechiométrie et ainsi améliorer ces prédictions. Tout comme Murphy et al. (1982), Bannink et al. (2006) et Sveinbjörnsson et al. (2006) ont trouvé des coefficients différents pour les régimes à base de fourrages et les régimes riches en concentrés. L'utilisation de ces coefficients nécessite d'avoir une connaissance précise de la composition chimique de la ration (glucides solubles, amidon, hémicellulose, cellulose et protéine), avec l'inconvénient d'une précision insuffisante de l'analyse chimique de certains composants, notamment celle des hémicelluloses (Nozière et al., 2011). Dans leur approche, Friggens et al. (1998) ont supprimé la discontinuité entre fourrages et concentrés, mais cette approche reste assez restrictive, car elle s'applique uniquement aux ovins et avec des rations à base d'ensilage d'herbe. Nozière et al. (2011) ont, quant à eux, choisi des coefficients stoechiométriques à partir de la composition chimique de la ration, mais en supprimant l'utilisation des fractions cellulose et hémicelluloses et en les remplaçant par le NDF digestible et la MO digestible qui sont des mesures plus couramment rapportées dans la littérature et plus précises d'un point de vue analytique.

Très peu d'auteurs ont essayé de décrire de façon mécaniste le profil en AGV, notamment par l'introduction des principes de la thermodynamique dans les modèles de rumen (Kohn et Boston, 2000 ; Offner et Sauvant, 2006).

c) *Estimation de la production de gaz*

L'estimation de la production de gaz n'est pas incluse dans les modèles de rumen « historiques » (Baldwin et al., 1987 ; Dijkstra et al., 1992 ; Lescoat et Sauvant, 1995), et il faut attendre la fin des années 1990 pour qu'une telle fonction (la production de CH₄) soit ajoutée aux modèles de Baldwin et al. (1987) et de Dijkstra et al. (1992) (Benchaar et al., 1998). Dans ces nouvelles versions de modèles, la production de méthane est basée sur le bilan en hydrogène moléculaire. L'hydrogène issu des fermentations des glucides et des protéines est utilisé pour la croissance microbienne et pour la biohydrogénation des AG insaturés. L'hydrogène restant est alors disponible pour la réduction du CO₂ en CH₄ (Benchaar et al., 1998). Les prédictions de ces modèles modifiés ont été évaluées comme étant meilleures par rapport à celles issues d'équations empiriques (Benchaar et al., 1998). Cependant, les modèles de ce type sous-estiment la quantité de CH₄ émis par les animaux, car ils ne prennent pas en compte la production de méthane au niveau de l'intestin qui peut atteindre 13 % de la production de CH₄ totale chez des ovins (Murray et al., 1976). Le modèle de Mills et al. (2001) repose sur le même type de structure que celle proposée par Benchaar et al. (1998). La précision de ces modèles est néanmoins très dépendante des prédictions en AGV.

Pour conclure, les modèles mécanistes de rumen sont des outils intéressants pour mieux expliquer les phénomènes ruminiaux et intégrer les données de la littérature. Néanmoins, ces modèles présentent encore des insuffisances sur certaines parties, et notamment sur la détermination du pH, la prédiction de la croissance microbienne et la partition des carbone et hydrogène entre les différentes voies métaboliques.

IV. Influence du pourcentage de concentrés sur les biotransformations ruminales, comportement d'ingestion, performances zootechniques, rejets et qualité des produits

Les phénomènes de biotransformations décrits dans la partie II de cette bibliographie peuvent être largement influencés par des facteurs alimentaires. Parmi ces facteurs, nous nous sommes focalisés sur le pourcentage de concentrés dans la ration. En effet, ce facteur est intéressant d'un point de vue pratique, car il est connu depuis très longtemps et couramment utilisé dans les exploitations pour fournir plus d'énergie et ainsi augmenter la productivité des animaux.

Dans cette partie, nous nous attacherons à décrire les modifications induites par le pourcentage de concentrés sur l'écosystème ruminal et les phénomènes de biotransformation. Nous nous intéresserons également aux conséquences de ce facteur sur les paramètres zootechniques et la qualité des produits.

Le modèle animal choisi pour les travaux expérimentaux de cette thèse est la chèvre laitière, du fait du dispositif expérimental de l'UMR INRA – AgroParisTech MoSAR. C'est la raison pour laquelle nous nous intéresserons plus spécifiquement à cette espèce dans cette partie. Nous tâcherons également de comparer les données des caprins à celles des bovins. Pour cela, nous nous appuierons sur plusieurs bases de données.

IV.1. Description des bases de données utilisées

IV.1.1 Bases de données chèvres

Pour constituer notre base de données, nous avons choisi des articles traitant de l'effet du pourcentage de concentrés chez la chèvre laitière. Nous souhaitons rassembler des données concernant à la fois des caractéristiques zootechniques des animaux (ingestion, production laitière) et des paramètres ruminiaux. Le nombre d'articles compilant ces deux caractéristiques étant faible, nous avons choisi de constituer deux bases de données distinctes : une sur les données zootechniques, l'autre sur les paramètres ruminiaux. La base de données « zootechnique » rassemble 17 articles et considère les publications avec une alimentation en rations mixtes (10 articles) et les distributions séparées de fourrages et de concentrés (7 articles). Ce dernier type de distribution correspond à des publications plus anciennes. La base de données « rumen » rassemble 10 publications. Nous avons élargi notre champ de sélection des articles traitant des femelles en lactation avec ceux traitant des femelles tarées, non gestantes (5 articles). Les caractéristiques de ces bases de données sont présentées dans le **Tableau 5** et le **Tableau 6**. Les deux bases de données n'étant pas constituées sur le même critère de sélection, les résultats d'une base ne seront pas extrapolables à l'autre. La liste des articles sélectionnés est donnée en Annexe 2.

Pour traiter la base de données « zootechniques », nous avons utilisé le modèle statistique suivant :

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta (\alpha)_{ij} + a_k * \%Conc + b_l * \%Conc^2 + \varepsilon_{ijkl}$$

avec Y_{ijkl} la variable étudiée, α_i l'effet du mode distribution de l'alimentation ($i =$ ration complète vs. fourrages et concentrés séparés), β_j l'effet de l'expérimentation hiérarchisé dans le mode de distribution. Nous avons testé un effet linéaire et quadratique du pourcentage de concentrés (%Conc) dans la ration. Nous avons posé le même modèle statistique pour le traitement de la base de données « rumen », mais avec α_i l'effet du stade physiologique (lactation vs. entretien).

Tableau 5 : Caractéristiques des rations et des animaux de la base de données chèvre-zootecnique (17 articles).

Caractéristiques de la ration	Type de rations	Ration complète	Fourrages + Concentrés
		(10 articles)	(7 articles)
	Concentré (% MS)	46,0 ± 16,25 (nexp = 15 ; ntrait = 44)	55,5 ± 23,93 (nexp = 9 ; ntrait = 21)
	NDF (% MS)	41,8 ± 7,01 (nexp = 13 ; ntrait = 40)	42,0 ± 7,24 (nexp = 3 ; ntrait = 8)
	ADF (% MS)	24,0 ± 5,88 (nexp = 10 ; ntrait = 32)	22,6 ± 6,42 (nexp = 3 ; ntrait = 8)
	Protéines Brutes (% MS)	15,7 ± 1,31 (nexp = 13 ; ntrait = 38)	16,7 ± 2,25 (nexp = 4 ; ntrait = 10)
	Extrait étheré (% MS)	4,2 ± 1,75 (nexp = 6 ; ntrait = 18)	3,06 ± 1,70 (nexp = 2 ; ntrait = 5)
Caractéristiques des animaux et des produits	Stade (j / mise-bas)	50,0 ± 36,6 (nexp = 14 ; ntrait = 42)	55,0 ± 48,9 (nexp = 9 ; ntrait = 21)
	Ingestion (kg MSI / j)	2,48 ± 0,550 (nexp = 15 ; ntrait = 44)	1,94 ± 0,566 (nexp = 9 ; ntrait = 21)
	Production de lait brut (kg / j)	3,02 ± 1,069 (nexp = 15 ; ntrait = 44)	2,69 ± 1,351 (nexp = 9 ; ntrait = 21)
	TB (g / kg)	37,4 ± 9,30 (nexp = 13 ; ntrait = 34)	34,5 ± 7,69 (nexp = 7 ; ntrait = 17)
	TP (g / kg)	30,6 ± 1,71 (nexp = 12 ; ntrait = 30)	33,8 ± 5,06 (nexp = 7 ; ntrait = 17)
	MG (g / j)	120 ± 61,5 (nexp = 13 ; ntrait = 34)	76,0 ± 34,65 (nexp = 7 ; ntrait = 17)
	MP (g / j)	104 ± 28,6 (nexp = 12 ; ntrait = 30)	73,4 ± 31,63 (nexp = 7 ; ntrait = 17)

Tableau 6 : Caractéristiques des rations et des animaux de la base de données chèvre-rumen (10 articles).

		Animaux en lactation (5 articles)	Animaux à l'entretien (5 articles)
Caractéristiques de la ration	Type de rations	Ration complète	Ration complète
	Concentré (% MS)	51,4 ± 15,42 (nexp = 7 ; ntrait = 16)	30,3 ± 24,9 (nexp = 11 ; ntrait = 29)
	NDF (% MS)	42,5 ± 3,99 (nexp = 5 ; ntrait = 12)	50,0 ± 13,07 (nexp = 10 ; ntrait = 27)
	Protéines Brutes (% MS)	15,5 ± 1,80 (nexp = 6 ; ntrait = 14)	16,7 ± 2,25 (nexp = 10 ; ntrait = 27)
Caractéristiques des animaux et des produits	Ingestion (kg MSI / j)	2,58 ± 0,358 (nexp = 7 ; ntrait = 16)	0,88 ± 0,102 (nexp = 5 ; ntrait = 11)
	Production de lait brut (kg / j)	3,12 ± 0,850 (nexp = 7 ; ntrait = 16)	-
	TB (g / kg)	31,5 ± 5,23 (nexp = 7 ; ntrait = 16)	-
	TP (g / kg)	30,0 ± 1,63 (nexp = 7 ; ntrait = 16)	-
	MG (g / j)	100 ± 35,4 (nexp = 7 ; ntrait = 16)	-
	MP (g / j)	93,6 ± 26,0 (nexp = 7 ; ntrait = 16)	-
Paramètres du rumen	pH	6,12 ± 0,271 (nexp = 7 ; ntrait = 16)	6,64 ± 0,259 (nexp = 11 ; ntrait = 29)
	[AGV] (mmol / L)	96,3 ± 26,9 (nexp = 4 ; ntrait = 10)	85,0 ± 13,3 (nexp = 11 ; ntrait = 29)
	Acétate / Propionate	3,41 ± 0,337 (nexp = 4 ; ntrait = 10)	3,65 ± 0,45 (nexp = 11 ; ntrait = 28)
	Acétate (% AGV totaux)	65,7 ± 1,87 (nexp = 4 ; ntrait = 10)	68,3 ± 3,82 (nexp = 11 ; ntrait = 29)
	Propionate (% AGV totaux)	19,4 ± 1,50 (nexp = 4 ; ntrait = 10)	18,9 ± 1,86 (nexp = 11 ; ntrait = 28)
	Butyrate (% AGV totaux)	10,9 ± 1,63 (nexp = 4 ; ntrait = 10)	8,36 ± 3,081 (nexp = 11 ; ntrait = 29)
	[N-NH ₃] (mg / L)	159 ± 116,7 (nexp = 6 ; ntrait = 14)	216 ± 88,5 (nexp = 11 ; ntrait = 29)

IV.1.2 Base de données « Bovidig »

La base de données « Bovidig » est développée depuis plus de 15 ans au sein de l'UMR INRA – AgroParisTech MoSAR sous la responsabilité de Daniel Sauvant. Elle regroupe 534 publications et 2016 traitements et concerne des études de digestion effectuées sur des bovins. Elle a été exploitée ici par Daniel Sauvant (en octobre 2011) pour construire des modèles empiriques de lois de réponse de différentes variables (pH ruminal, ...) au pourcentage de concentrés. Pour cela, parmi les publications de cette base, seules les expériences focalisées sur le pourcentage de concentrés, ou la teneur en NDF des rations, ont été sélectionnées. Le même type de modèles statistiques que ceux utilisés pour les caprins a été appliqué.

IV.2. Effets du pourcentage de concentrés sur l'écosystème ruminal

IV.2.1 Paramètres biotiques

Les populations microbiennes présentes dans le rumen sont souvent spécialisées dans la dégradation de substrats particuliers et sont dépendantes des conditions du milieu ruminal, le pH notamment. Une augmentation du pourcentage de concentrés dans la ration, et en particulier la substitution de fourrages par des céréales, peut entraîner des modifications importantes de ces populations.

L'effet du pourcentage de concentrés sur les populations bactériennes a été étudié par Latham et al. (1971), Oshio et al. (1987) et Tajima et al. (2001). Augmenter le pourcentage de concentrés augmente l'importance relative des populations bactériennes de type amylolytique (*Ruminobacter amylophilus* [anciennement appelé *Bacteroides amylophilus*], *Prevotella ruminicola* [ex-*Bacteroides ruminicola*] par exemple) et diminue les populations cellulolytiques (*Byturivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes* [ex-*Bacteroides succinogenes*], par exemple). L'activité des bactéries cellulolytiques est réduite par l'augmentation du pourcentage de concentrés (Martin et al., 2001 ; Brossard et al., 2006). Cela peut être expliqué par la pression de sélection exercée par le pH sur les populations microbiennes, l'apport de concentrés diminuant le pH (voir partie suivante). De plus, la baisse du pH ruminal (inférieur à 6,2) est un facteur connu de réduction de l'attachement bactérien aux constituants pariétaux (Shriver et al., 1986).

Le nombre de protozoaires augmente avec l'accroissement du pourcentage de concentrés dans la ration (Abe et al., 1973 ; Grubb et Dehority, 1975 ; Franzolin et Dehority, 1996 ; Ramos et al., 2009). Néanmoins, pour un pourcentage de concentrés supérieur à 60 %, la concentration en protozoaires commence à diminuer, en lien avec une chute de pH importante (Mackie et al., 1978).

La population fongique diminue avec des régimes riches en amidon ou en sucres solubles et augmente avec les régimes riches en ligno-cellulose (Grenet et al., 1989). Elle est également dépendante des conditions du milieu ruminal et notamment le pH. Le pH est défavorable à la population fongique quand il est inférieur à 5,5 (Grenet et al., 1989). Ainsi l'augmentation du pourcentage de concentrés diminue la population fongique (De Smet et al., 1992).

IV.2.2 Paramètres abiotiques

a) *pH*

Que ce soit chez les bovins ou chez les caprins, le pH ruminal diminue avec une augmentation du pourcentage de concentrés dans la ration (**Figure 33**). Notons que sur cette figure, le pH apparaît plus bas chez les bovins que chez les caprins et que les coefficients de curvilinéarité sont de sens opposé. On peut supposer qu'il existe une différence entre ces deux espèces. En effet, il est possible que bovins et caprins aient des comportements masticatoires et des capacités de recyclage salivaire différents. Néanmoins, les différences observées sur la **Figure 33** pourraient être liées aux différences d'échantillonnage des données de la littérature entre les deux espèces : nombre de publications, nature des rations par exemple.

Cette chute de pH peut être reliée à une diminution de la quantité de tampons dans le rumen et une production d'acides plus importante. En effet, l'apport de concentrés dans la ration réduit la mastication des animaux (voir partie IV.4.1 de ce chapitre) et par conséquent la sécrétion salivaire de tampons. D'autre part, la concentration en AGV totaux peut être augmentée (voir partie IV.2.2.d de ce chapitre) au moins chez la vache laitière (**Figure 36**). Les régimes riches en concentrés peuvent favoriser des concentrations en acide lactique plus fortes (Slyter, 1976), dont la valeur de pKa (pKa = 3,80) est plus faible par rapport à ceux de l'acétate, propionate ou butyrate (pKa = 4,80) (Rémond et al., 1995).

Notons que les animaux qui reçoivent des rations mixtes sont, en théorie, moins exposés aux effets sur le pH (Mould, 1988). En effet, les rations mixtes minimisent les variations journalières du pH ruminal observées lorsque les aliments concentrés sont distribués de manière dissociée des fourrages (**Figure 34**).

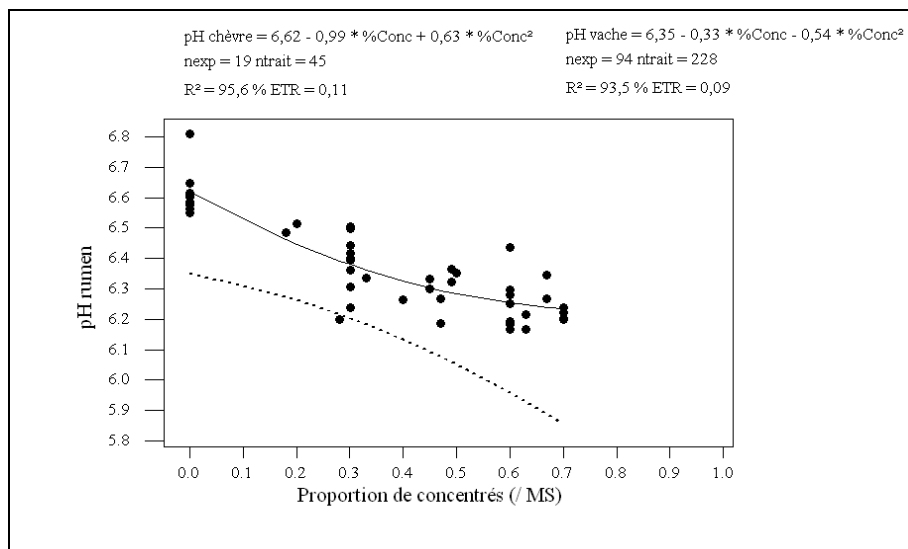


Figure 33 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur le pH ruminal chez la chèvre laitière (≈ 4 h après la distribution du repas).

Le trait plein indique la relation intra-expérience chez les chèvres. Le trait en pointillés indique la relation intra-expérience chez les bovins. Graphique issu du traitement de la base de données chèvre-rumen et de Bovidig.

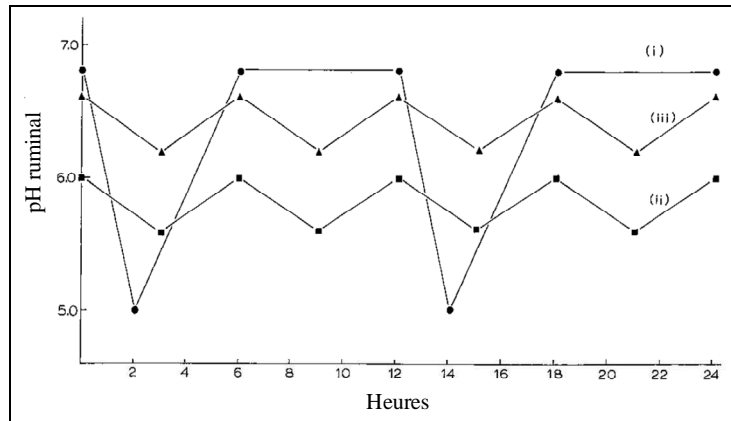


Figure 34 : Représentation schématique des variations journalières du pH ruminal selon le mode de distribution de la ration. D'après Mould (1988).

(i) Fourrage supplémenté deux fois par jour avec des concentrés (●), (ii) Aliment riche en concentrés distribué ad libitum (■), (iii) Ration complète (▲).

b) Potentiel redox

Etant donnée la relation linéaire négative entre le potentiel redox et le pH (voir partie II.1.2 de chapitre), le potentiel redox est augmenté par l'augmentation du pourcentage de concentrés (Marden, 2007). Cela s'observe numériquement chez Julien et al. (2010) mais non significativement.

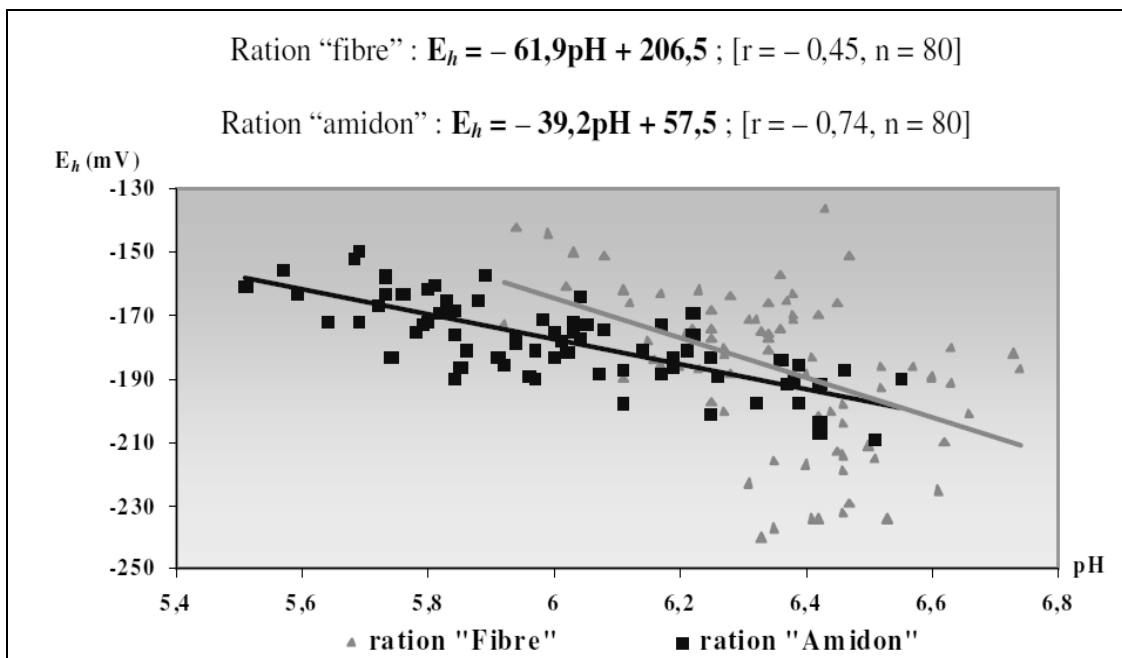


Figure 35 : Effet de la nature de la ration (ration « Fibre » contenant 21,3 % concentrés vs. ration « Amidon » contenant 49,1 % concentrés) sur la relation entre le pH et le potentiel redox. (Marden, 2007).

(Le potentiel redox de ce graphique correspond à la différence de potentiel entre l'électrode de platine et l'électrode standard à hydrogène)

c) Pression osmotique

La pression osmotique n'est pas modifiée (Giger-Reverdin et al., 1997) ou est accrue par l'augmentation du pourcentage de concentrés (Bennink et al., 1978). Néanmoins, la variation de la pression osmotique semble être plus déterminée par les teneurs en glucides rapidement fermentescibles de la ration que par le pourcentage de concentrés (Giger-Reverdin et al., 1997).

d) Métabolites

L'accroissement du pourcentage de concentrés augmente généralement la concentration ruminale en AGV totaux chez les bovins (**Figure 36**). Chez la chèvre laitière, le pourcentage de concentrés peut également augmenter la concentration ruminale en AGV totaux (Lu, 1993 ; Yanez Ruiz et al., 2004) mais cet effet n'est pas toujours observé (Santini et al., 1992 ; Cerrillo et al., 1999 ; Cantalapiedra-Hijar et al., 2009) (**Figure 36**).

Le pourcentage de concentrés influence largement le profil en AGV. Chez la vache laitière, la proportion molaire en acétate diminue tandis que la proportion molaire en propionate s'accroît curvilinéairement avec l'augmentation du pourcentage de concentrés dans la ration (**Figure 37** et **Figure 38**). Chez la chèvre laitière, la proportion en acétate diminue linéairement, mais avec une pente globale comparable et la proportion de propionate n'augmente pas autant que chez la vache laitière (**Figure 37** et **Figure 38**). La plus grosse différence entre les deux espèces semble concerner la proportion en butyrate qui augmente linéairement avec le pourcentage de concentrés chez la chèvre laitière (Archimède et al., 1996 ; Cantalapiedra-Hijar et al., 2009) (**Figure 39**). L'augmentation du pourcentage de butyrate ruminal pourrait être reliée à un accroissement de la densité en protozoaires. En effet, Brossard et al. (2004) ont suggéré que l'augmentation de la densité ruminale en protozoaires jouait un rôle dans l'acidose butyrique observée chez le mouton. D'autre part, dans une méta-analyse, Eugène et al. (2004) ont montré que la proportion de butyrate diminuait de 1,63 % quand le rumen était défauné. Les modifications du profil en AGV sont associées à des variations du pH ainsi que des populations microbiennes dominantes.

L'augmentation du pourcentage de concentrés entraîne une réponse curvilinéaire de la production de CH₄ (Giger-Reverdin et al., 2000). A partir de la base de données « Rumener », qui rassemble des résultats de mesures effectuées sur des ruminants (bovins, ovins et caprins) placés en cage calorimétrique pour étudier l'utilisation énergétique des rations (167 publications et 1 131 traitements), Sauvante et al. (2011) ont établi une relation entre la production de CH₄ / kg de MOD et le pourcentage de concentrés (%Conc) dans le cas d'études focalisées sur ce facteur (**Figure 40**) :

$$\text{g CH}_4 / \text{g de MOD} = 35,3 + 15,84 \% \text{Conc} - 34,59 \% \text{Conc}^2 \quad (\text{nexp} = 97, \text{ntrait} = 290, \text{ETR} = 3,5)$$

La production de méthane est maximale avec une ration contenant 23 % de concentrés. Dans un premier temps, la production de CH₄ augmente avec le pourcentage de concentrés en lien avec l'augmentation de teneur en MOF de la ration. Ensuite, à partir d'un certain niveau de pourcentage de concentrés, la chute du pH ruminal (< 6,0) peut inhiber la méthanogenèse

(Demeyer et Henderickx, 1967 ; Van Kessel et Russell, 1996). De plus, les modifications du profil fermentaire dues à l'augmentation du pourcentage de concentrés ont également une influence sur la production de méthane, en particulier lorsque le rapport acétate sur propionate est inférieur à 3 (**Figure 41**). En effet, la production de propionate entre en concurrence avec la méthanogenèse dans la captation d'hydrogène (**Figure 25**) et la réduction de la production acétate diminue la libération d'hydrogène (**Tableau 3**) (Moss et al., 2000).

Une sous-base de la base de données « Rumener », rassemblant des résultats obtenus uniquement chez la chèvre laitière (14 expériences et 37 traitements), a permis de prédire la production journalière de CH₄ d'une chèvre (Sauvant et Giger-Reverdin, 2008b) :

$$\text{CH}_4 \text{ (g / j)} = 0,41 \text{ PV} + 6,70 \text{ PL35} \text{ (n}_{\text{exp}} = 14, \text{n}_{\text{trait}} = 37 \text{ ETR} = 6,9)$$

Pour 22 traitements de cette base, correspondant à des essais sur le pourcentage de concentrés, le pourcentage de concentrés a eu un effet curvilinéaire sur la variabilité résiduelle :

$$\text{ResCH}_4 \text{ (g / j)} = -2,7 + 20,9 \% \text{Conc} - 29,2 \% \text{Conc}^2 \text{ (n}_{\text{exp}} = 9, \text{n}_{\text{trait}} = 22, \text{ETR} = 1,7 \text{ g / j}).$$

La production de CH₄ était maximale (50 g / j) pour un pourcentage de concentrés de 36 %.

L'effet du pourcentage de concentrés sur la concentration en NH₃ n'est pas toujours significatif (**Figure 42**). Cette concentration est essentiellement déterminée par la teneur en matière azotée totale (MAT) du régime et de la nature de l'azote. En conséquence, l'augmentation de la concentration en NH₃ observée avec des régimes riches en concentrés est très souvent liée à un apport alimentaire en azote plus important. A partir de la base de données Bovidig, la relation entre le pourcentage de concentrés et la concentration en ammoniac (NH₃-N) du rumen chez les bovins a été déterminée :

$$\text{NH}_3\text{-N (mg / L)} = -70,0 - 1,41 \% \text{Conc} + 14,12 \text{ MAT} + 0,06 \% \text{Conc} * \text{MAT} \text{ (n}_{\text{exp}} = 106, \text{n}_{\text{trait}} = 251, \text{ETR} = 24.393).$$

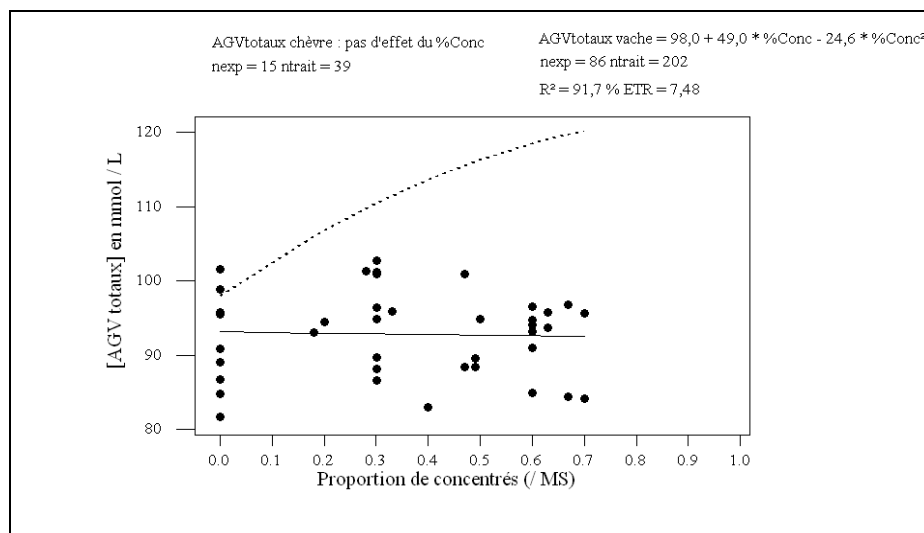


Figure 36 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur la concentration ruminale d'AGV totaux chez la chèvre (≈ 4 h après la distribution du repas).

Le trait plein indique la relation intra-expérience chez les chèvres. Le trait en pointillés indique la relation intra-expérience chez les bovins. Graphique issu du traitement de la base de données chèvre-rumen et de Bovidig.

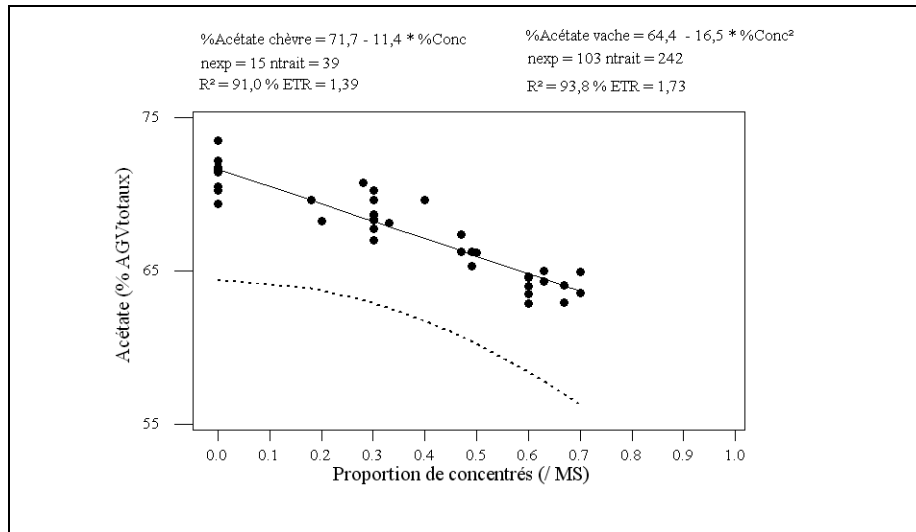


Figure 37 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur la proportion molaire en acétate du jus de rumen chez la chèvre laitière (≈ 4 h après la distribution du repas). Le trait plein indique la relation intra-expérience chez les chèvres. Le trait en pointillés indique la relation intra-expérience chez les bovins. Graphique issu du traitement de la base de données chèvre-rumen et de Bovidig.

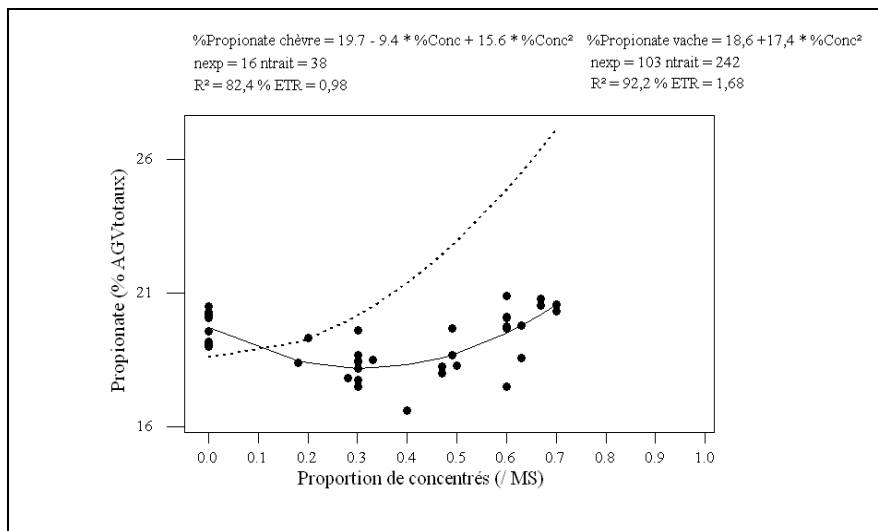


Figure 38 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur la proportion molaire en propionate du jus de rumen chez la chèvre laitière (≈ 4 h après la distribution du repas). Le trait plein indique la relation intra-expérience chez les chèvres. Le trait en pointillés indique la relation intra-expérience chez les bovins. Graphique issu du traitement de la base de données chèvre-rumen et de Bovidig.

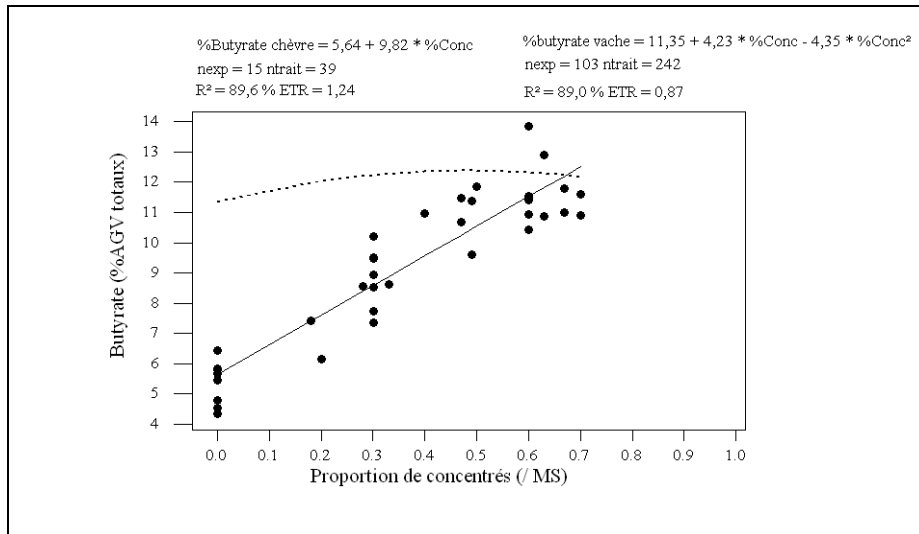


Figure 39 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur la proportion molaire en butyrate du jus de rumen chez la chèvre laitière (≈ 4 h après la distribution du repas). Le trait plein indique la relation intra-expérience chez les chèvres. Le trait en pointillés indique la relation intra-expérience chez les bovins. Graphique issu du traitement de la base de données chèvre-rumen et de Bovidig.

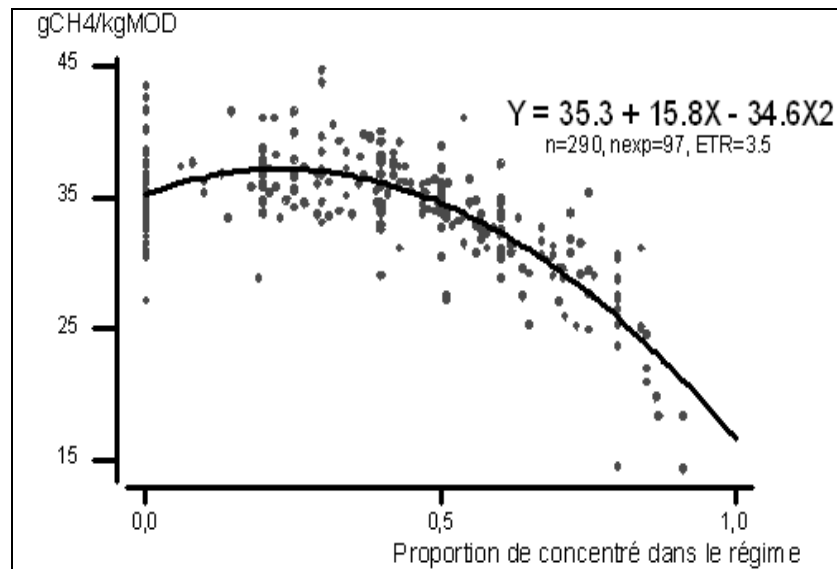


Figure 40 : Influence du pourcentage de concentrés sur la production de CH_4/kg de MOD. (Sauvant et al., 2011).

Données issues de la base de données Rumener (UMR INRA-AgroParisTech MoSAR).

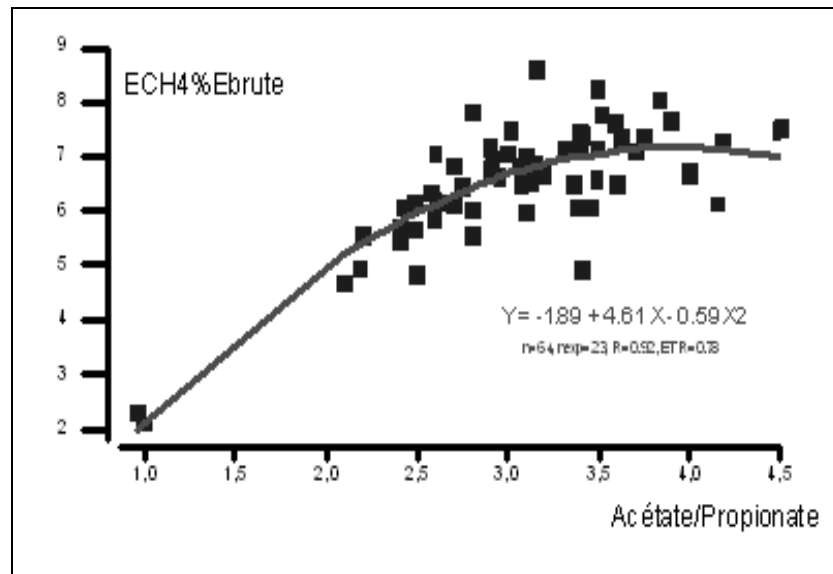


Figure 41 : Relation intra-expérience entre le rapport acétate/propionate du jus de rumen et le rapport ECH4%Ebrute. (Sauvant et al., 2011).

Données issues de la base de données Rumener (UMR INRA-AgroParisTech MoSAR).

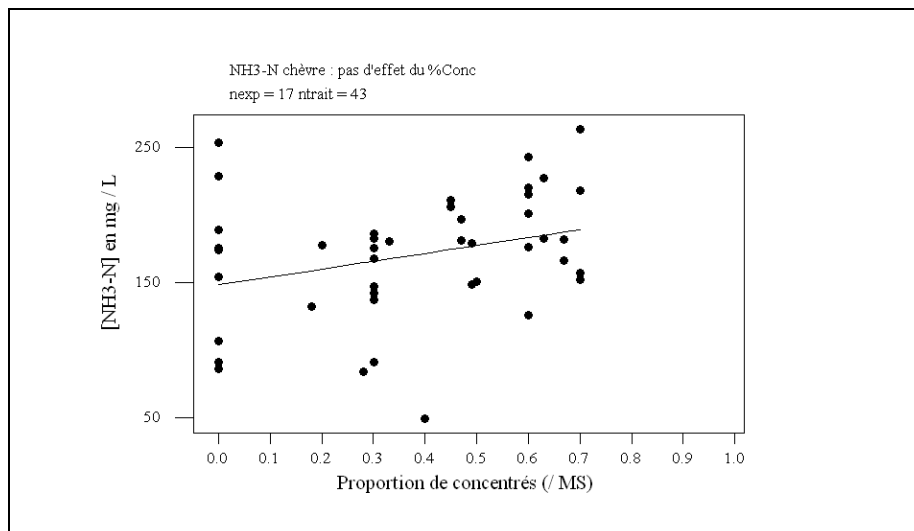


Figure 42 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur la concentration ruminale en ammoniac chez la chèvre laitière (≈ 4 h après la distribution du repas). Le trait plein indique la relation intra-expérience chez les chèvres. Graphique issu du traitement de la base de données chèvre-rumen.

e) Transit

L'augmentation du pourcentage de concentrés entraîne généralement une baisse de la vitesse de transit des phases liquides et solides du réticulo-rumen et donc une augmentation du temps de rétention dans le rumen. Cela peut s'expliquer par une diminution de la motricité des parois digestives et par une baisse de l'activité de rumination intervenant dans la comminution des particules alimentaires et le transit des digesta (Sauvant et al., 1995b). Ces effets sont à moduler selon le niveau d'ingestion car la vitesse de transit dépend beaucoup de la MSI. En effet, chez des animaux recevant des rations complètes avec des proportions très différentes de foin de luzerne et de concentrés (Colucci et al., 1990), les vitesses de passage des liquides et des particules alimentaires ont été linéairement et négativement liées au pourcentage de concentrés à bas niveau d'ingestion, mais pour l'ingestion à volonté, les différences étaient minimes.

IV.3. Effets du pourcentage de concentrés sur la biotransformation des constituants de la ration dans le rumen

IV.3.1 Effet du pourcentage de concentrés sur la dégradation ruminale des glucides

Chez les ruminants, la digestion ruminale de l'amidon n'est pas modifiée par le pourcentage de concentrés (**Figure 43**), alors que celle de la matière organique augmente linéairement (Archimède et al., 1997). La digestion ruminale des parois diminue de manière quadratique et est maximale avec environ 30 % de concentrés dans la ration (Archimède et al., 1997) (**Figure 44**). Cela peut s'expliquer par plusieurs raisons :

- la sélection des populations bactériennes en faveur des bactéries amylolytiques et au détriment des bactéries cellulolytiques liée à la diminution du pH ruminal. La cellulolyse est partiellement inhibée quand le pH est inférieur à 6,2 et totalement inhibée à un pH inférieur à 6,0 (Mould et Ørskov, 1983) ;
- la réduction de l'attachement bactérien aux parois végétales liée à la diminution du pH ruminal. Shriver et al. (1986) ont montré *in vitro* que le passage du pH de valeurs comprises entre 6,2 et 7,0 à une valeur égale à 5,8 entraînait une réduction de la digestibilité de la cellulose 32,5 % à 8,1 %.

Cette diminution de la digestion ruminale des parois est prise en compte dans le concept d'interactions digestives utilisé dans le calcul des rations chez les ruminants (Mould, 1988; Sauvant et Giger-Reverdin, 2009). Notons que la digestion des parois dans le rumen peut être compensée par une digestion intestinale, de l'ordre de 10 % au maximum (Archimède et al., 1997).

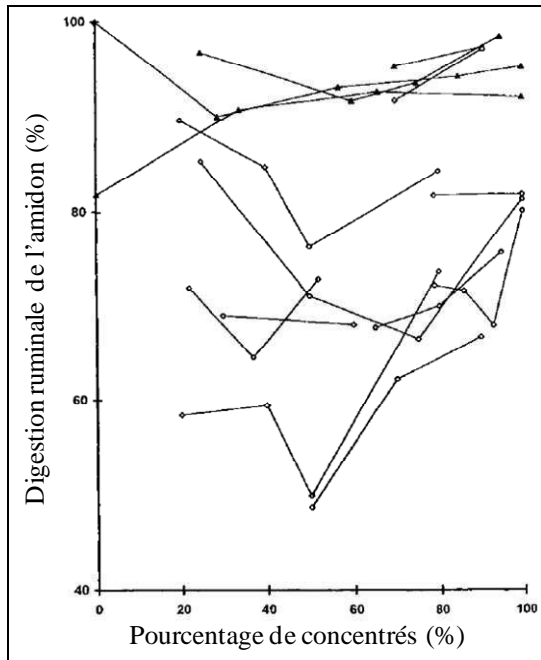


Figure 43 : Influence du pourcentage de concentrés dans la ration sur la digestion ruminale de l'amidon. (Archimède et al., 1997).

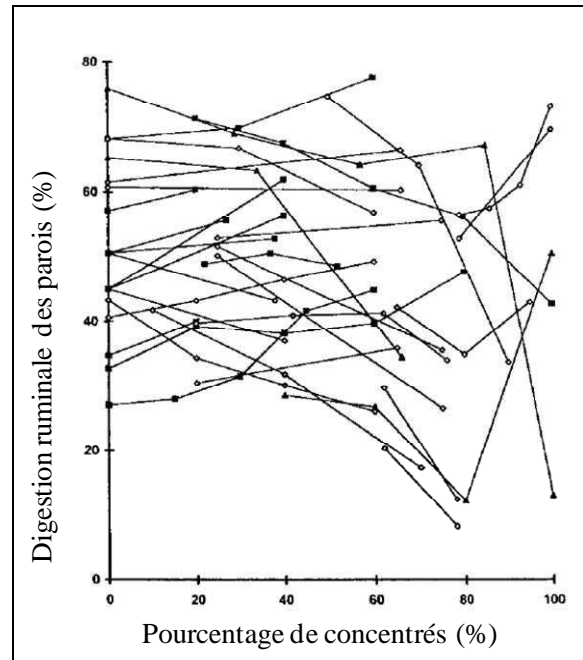


Figure 44 : Influence du pourcentage de concentrés dans la ration sur la digestion ruminale des parois. (Archimède et al., 1997).

IV.3.1 Effet du pourcentage de concentrés sur la dégradation des protéines et la synthèse microbienne

La plupart des bactéries protéolytiques sont aussi amylolytiques, ce qui explique la plus forte dégradation des protéines lorsque la ration est riche en céréales (Siddons et Paradine, 1981). D'après une synthèse de la littérature, Archimède et al. (1997) ont montré une évolution quadratique de l'efficacité de la synthèse microbienne en fonction du pourcentage de concentrés incorporés dans la ration, avec un maximum de synthèse vers 40 % de concentrés (**Figure 45**).

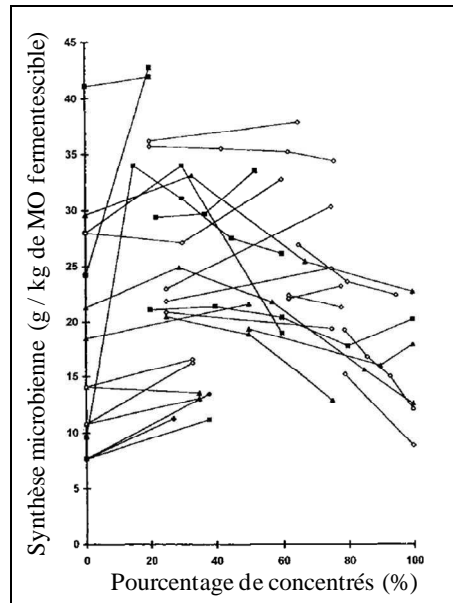


Figure 45 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur la synthèse microbienne ruminale. D'après Archimède et al. (1997).

IV.3.2 Effet du pourcentage de concentrés sur la lipolyse et la biohydrogénation des acides gras dans le rumen

Glasser et al. (2008b) ont réalisé une méta-analyse pour prédire les flux duodénaux d'AG insaturés en fonction de leur ingestion chez les ruminants (vaches laitières, bovins en croissance, moutons). A notre connaissance, il n'existe pas de données publiées sur les flux duodénaux d'AG chez la chèvre laitière. L'augmentation du pourcentage de concentrés augmente les flux duodénaux des AG insaturés (**Tableau 7**). Ceci peut s'expliquer par des modifications de la lipolyse et de la biohydrogénation des AG dans le rumen liées à plusieurs phénomènes :

- la diminution du pH ruminal (voir partie IV.2.2.a) de ce chapitre). Pour des pH inférieurs à 6, le pH est connu pour réduire la lipolyse (Van Nevel et Demeyer, 1996) et la biohydrogénation des AG peut être ralentie ou réduite (Van Nevel et Demeyer, 1996; Troegeler-Meynadier et al., 2003), même si elle est moins sensible au pH que la lipolyse (Van Nevel et Demeyer, 1996) ;
- la teneur en amidon des régimes souvent plus importante. Des régimes pauvres en fourrages ont eu pour conséquence une diminution de la lipolyse et de la biohydrogénation (Latham et al., 1972). *In vitro*, il a été observé que le remplacement de fibres par de l'amidon a pour conséquence une réduction des vitesses de lipolyse et de biohydrogénation (Gerson et al., 1985) ;
- les changements de populations bactériennes (voir partie IV.2.1 de ce chapitre), et ce indépendamment du pH. Les principales bactéries responsables de la biohydrogénation sont les bactéries cellulolytiques (Harfoot et Hazlewood, 1988).

Tableau 7 : Equations de prédiction des flux duodénaux d'AGPI en fonction de l'ingestion d'AGI et effet du pourcentage de concentrés de la ration sur les coefficients des équations de prédiction. D'après Glasser et al. (2008b).

	Equations de prédiction des flux duodénaux d'AGI (g/kg MSI)	Modification des coefficients pour chaque % d'augmentation de concentré	
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 C18:3	0,04 * C18:3 ingéré	n = 26 ; nexp = 7	+ 0,00128 ± 0,00031
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 C18:2	0,05 * C18:2 ingéré	n = 29 ; nexp = 8	+ 0,00149 ± 0,00038
<i>cis</i> -9 C18:1	0,24 * <i>cis</i> -C18:1 ingéré	n = 18 ; nexp = 5	+ 0,0034 ± 0,00089

IV.4. Effets du pourcentage de concentrés sur les performances zootechniques

IV.4.1 Ingestion et comportement d'ingestion

Le niveau d'ingestion de MS est généralement augmenté par l'accroissement du pourcentage de concentrés chez la vache laitière (Allen, 2000). A partir de la base de données Bovidig, on obtient une relation intra-expérience quadratique entre la matière sèche ingérée (MSI) et le pourcentage de concentrés (%Conc) chez les bovins :

$$\text{MSI (kg)} = 15,7 + 13,5 * \% \text{Conc} - 9,4 * \% \text{Conc}^2 \quad (\text{nexp} = 194 ; \text{ntrait} = 461 ; R^2 = 94,6 \% ; \text{ETR} = 1,25)$$

Chez la chèvre laitière, l'ingestion augmente également de manière quadratique avec l'augmentation du pourcentage de concentrés dans la ration (**Figure 46** et **Tableau 8**). L'accroissement de l'ingestion peut s'expliquer par une valeur d'encombrement plus faible des concentrés par rapport aux fourrages. Néanmoins, quand la concentration énergétique des régimes devient trop importante, l'ingestion peut être limitée par un contrôle métabolique (Montgomery et Baumgardt, 1965a, 1965b). La MSI diminue alors pour conserver un apport d'énergie constant. Cela peut expliquer que dans certaines études, l'augmentation de la MSI n'est pas toujours significative chez la vache laitière (Aguerre et al., 2011) ou chez la chèvre laitière (Mele et al., 2005 ; Andrade et Schmidely, 2006).

Tableau 8 : Réponses moyennes des chèvres aux variations du pourcentage de concentrés de la ration. D'après Sauvant et al. (2007).

	% de concentrés (en % de la MS de la ration)					
	10	20	30	40	50	60
MS ingérée (kg / j)	0,10	0,21	0,31	0,42	0,52	0,62
Production laitière (kg / j)	0,28	0,52	0,73	0,90	1,04	1,14
TB (g / kg)	-0,07	-0,27	-0,60	-1,08	-1,68	-2,42

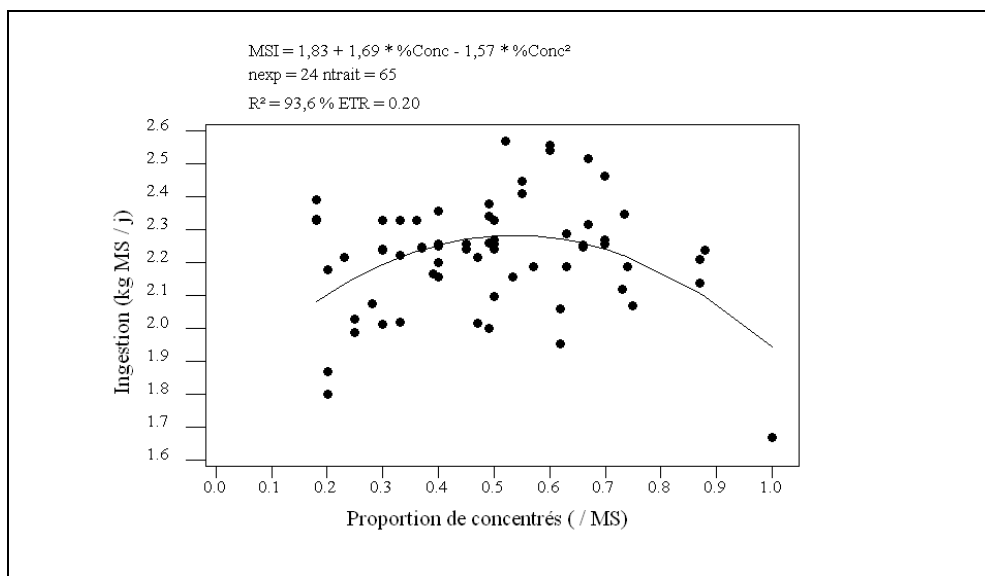


Figure 46 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur l'ingestion chez la chèvre laitière en lactation.

Le trait plein indique la relation intra-expérimentation. Graphique issu de la base de données chèvre-zootecnique.

La durée de mastication quotidienne diminue généralement avec l'augmentation du pourcentage de concentrés dans la ration chez la chèvre laitière (Sauvant et Giger-Reverdin, 2008a) (**Figure 47**).

Cette durée de mastication peut être décomposée en durées de mastication d'ingestion et de rumination. La durée quotidienne de mastication liée à d'ingestion est généralement diminuée par le pourcentage de concentrés chez la vache laitière (Johnson et Combs, 1992 ; DeVries et al., 2007) et chez la chèvre laitière (Santini et al., 1992 ; Abijaoudé et al., 2000b). La durée quotidienne de rumination est également diminuée chez la vache (DeVries et al., 2009) et chez la chèvre (Focant, 1984 ; Santini et al., 1992 ; Abijaoudé et al., 2000b ; Desnoyers et al., 2008a). La diminution de la durée de mastication observée avec les rations riches en concentrés limite la production de salive et de tampons par l'animal, ce qui explique en partie la diminution du pH ruminal observée avec ce type de régime (Gonçalves et al., 2001). L'effet

du pourcentage de concentrés sur le comportement d'ingestion peut également se manifester lors de rations offertes *ad libitum* par une augmentation du nombre de repas secondaires et une augmentation de la matière sèche ingérée au cours de ces repas (Abijaoudé et al., 2000b) avec des rations riches en concentrés comparées à des rations plus pauvres. Certains individus peuvent adapter leur comportement d'ingestion en privilégiant une vitesse d'ingestion lente pour limiter ainsi l'acidose lors de l'ingestion de rations riches en concentrés (Desnoyers et al., 2008b).

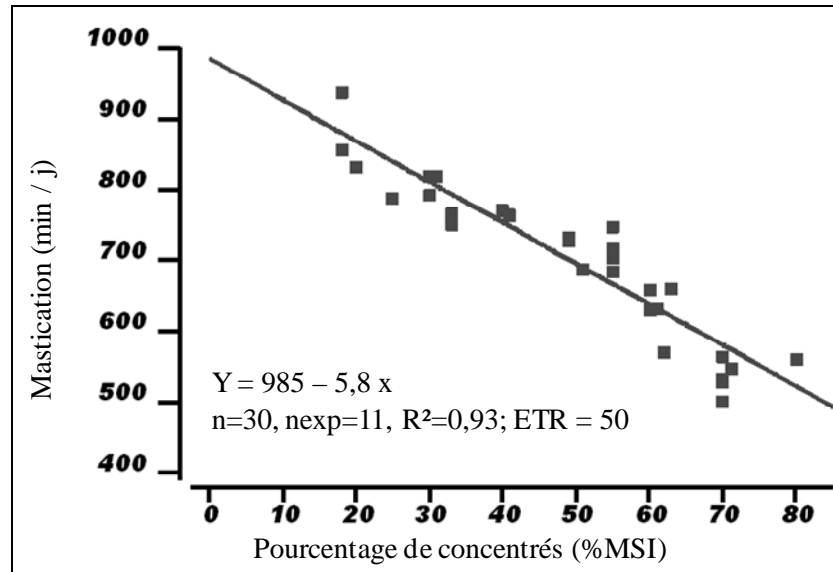


Figure 47 : Influence du pourcentage de concentrés sur la durée de mastication chez la chèvre laitière. D'après Sauvans et Giger-Reverdin (2008a).

IV.4.2 Production laitière

La production laitière est généralement augmentée par le pourcentage de concentrés chez la vache laitière (Jerred et al., 1990; Tessmann et al., 1991). A partir de la base de données Bovidig, on obtient une relation intra-expérience quadratique entre la production laitière (PL) et le pourcentage de concentrés chez les bovins :

$$PL \text{ (kg)} = 21,5 + 18,1 * \%Conc - 9,2 * \%Conc^2 \quad (n_{exp} = 186 ; n_{trait} = 438 ; R^2 = 97,4 \% ; ETR = 1,75)$$

Chez la chèvre laitière, l'analyse de la base de données chèvres indique une relation linéaire entre la PL et le pourcentage de concentrés (**Figure 48** et **Tableau 8**) (Rapetti et al., 1997 ; Desnoyers et al., 2008a ; Ollier et al., 2009). Néanmoins dans certaines études, la PL n'a pas été augmentée par le pourcentage de concentrés chez les chèvres laitières (Kawas et al., 1991 ; Santini et al., 1992 ; Abijaoudé et al., 2000a).

Les modifications de la PL sont dépendantes de l'ingestion (voir partie IV.4.1 de ce chapitre), du bilan énergétique et du stade physiologique des animaux. La différence entre vache et chèvre observée est peut-être liée à une différence du stade de lactation des animaux.

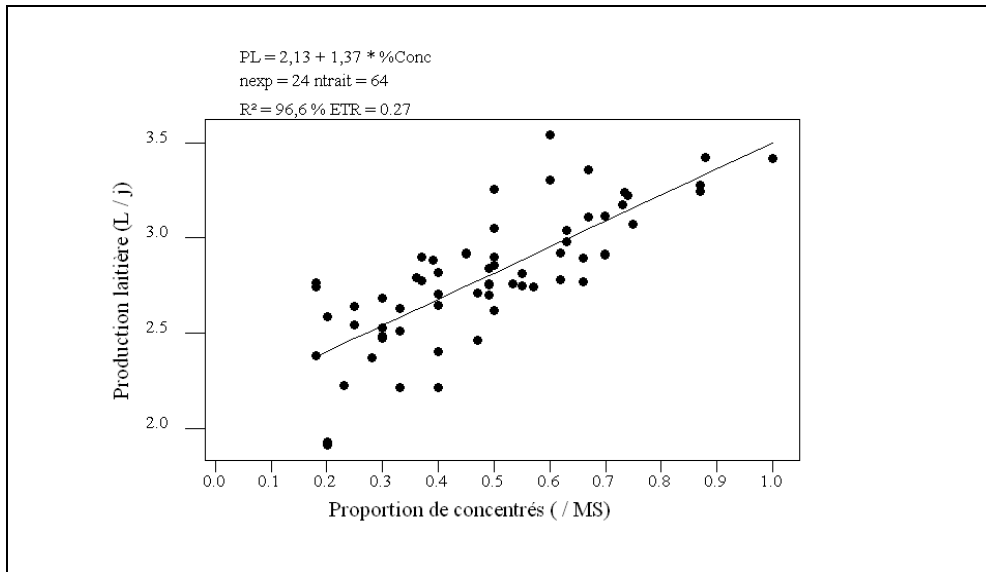


Figure 48 : Effet de la proportion de concentrés dans la ration sur la production laitière chez la chèvre laitière.

Le trait plein indique la relation intra-expérimentation. Graphique issu de la base de données chèvre-zootecnique.

IV.5. Effets du pourcentage de concentrés sur la composition des produits

IV.5.1 Matières grasses et protéines du lait

Des régimes riches en concentrés induisent généralement des plus faibles valeurs de taux butyreux (TB) chez la vache laitière (Bauman et Griinari, 2001 ; Bauman et al., 2011) et chez la chèvre laitière (Sauvant et Morand-Fehr, 2000 ; Schmidely et Sauvant, 2001 ; Chilliard et Ferlay, 2004) (**Figure 49** et **Tableau 8**). La chèvre semble moins sensible que la vache laitière à la diminution du TB (Sanz Sampelayo et al., 2007) (**Figure 49**). La chute du TB peut s'expliquer par les modifications des fermentations au niveau ruminal dues au pourcentage de concentrés, notamment par la diminution de la formation d'acétate, principal précurseur des AG synthétisés par la mamelle (voir partie II.2.1.d) de ce chapitre). Une autre théorie consiste à penser qu'un niveau élevé d'insuline pourrait orienter préférentiellement la partition des AG vers le tissu adipeux plutôt que vers la glande mammaire. Cependant, cette hypothèse a été peu validée par les résultats expérimentaux (Bauman et Griinari, 2001), et ne concernerait de toutes façons que les AG longs, alors que lors de chutes de taux butyreux, une réduction de la synthèse *de novo* est observée (Bauman et al., 2011). La diminution du TB peut également être expliquée par l'activité anti-lipogénique sur la glande mammaire de certains intermédiaires de la biohydrogénation ruminale des AG insaturés (*trans*-10, *cis*-12 18:2, *cis*-10, *trans*-12 C18:2, *trans*-9, *cis*-11 C18:2 et probablement *trans*-10 C18:1) (Shingfield et al., 2010). Cette hypothèse validée chez les vaches l'est qualitativement chez les chèvres, mais la glande mammaire des chèvres serait moins sensible que celle des vaches laitières (Shingfield et al., 2010). Enfin, la chute du TB chez la chèvre laitière peut être associée à une augmentation de la production laitière (**Figure 48**) et à une absence ou une

faible variation de la quantité de MG sécrétée dans le lait (**Figure 50**), suggérant que la chute de TB serait majoritairement à relier à un effet de dilution de la MG dans le lait. L'absence ou la faible variation de la quantité de MG sécrétée dans le lait est à relier à la chute de la synthèse *de novo* d'AG (voir paragraphe suivant).

Le taux protéique est généralement augmenté par le pourcentage de concentrés chez la vache laitière, alors que l'analyse de la base de données chèvres n'a pas montré d'effet du pourcentage de concentrés sur cette variable (**Figure 51**). Cet effet est certainement dépendant de l'intensité de la synthèse de protéines microbiennes dans le rumen. La sécrétion de matières protéiques dans le lait de chèvre est par contre augmentée par le pourcentage de concentrés (**Figure 52**).

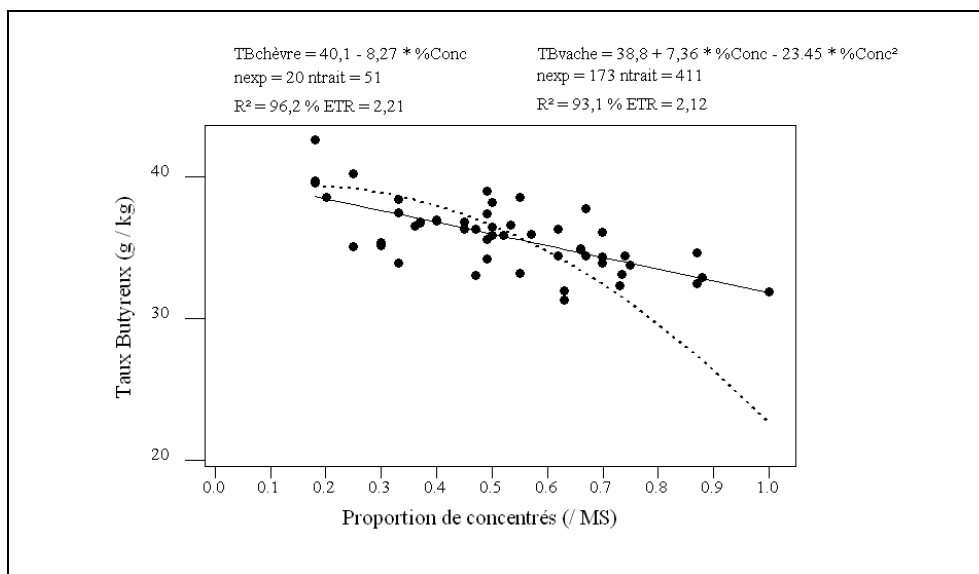


Figure 49 : Effet de la proportion de concentrés dans la ration sur le taux butyreux du lait chez la chèvre laitière et la vache laitière.

Le trait plein indique la relation intra-expérimentation chez la chèvre laitière. Le trait en pointillés indique la relation intra-expérimentation chez la vache laitière. Graphique issu des bases de données chèvre-zooteknique et Bovidig.

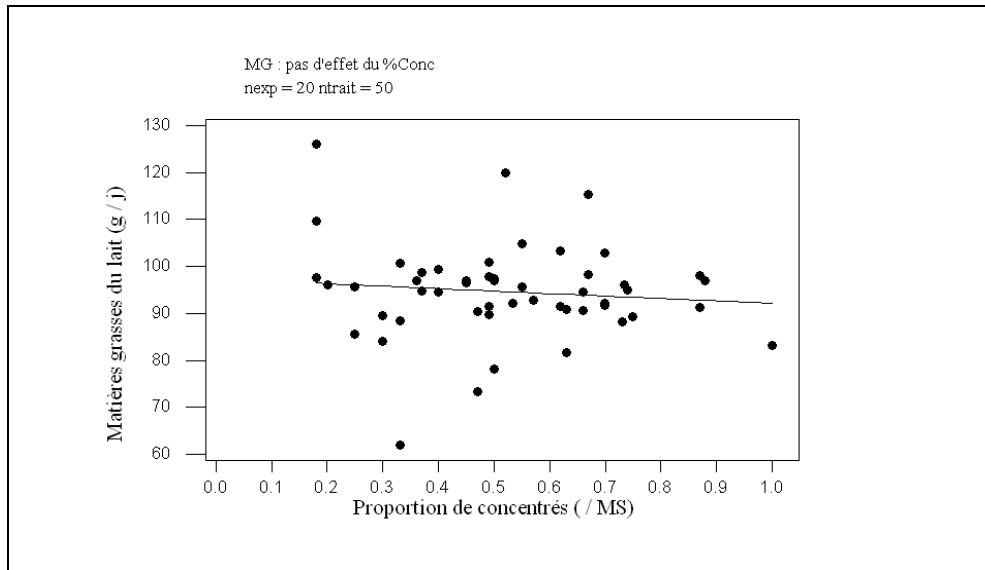


Figure 50 : Effet de la proportion de concentrés dans la ration sur les matières grasses du lait secrétées chez la chèvre laitière.
Le trait plein indique la relation intra-expérimentation. Graphique issu de la base de données chèvre-zootecnique.

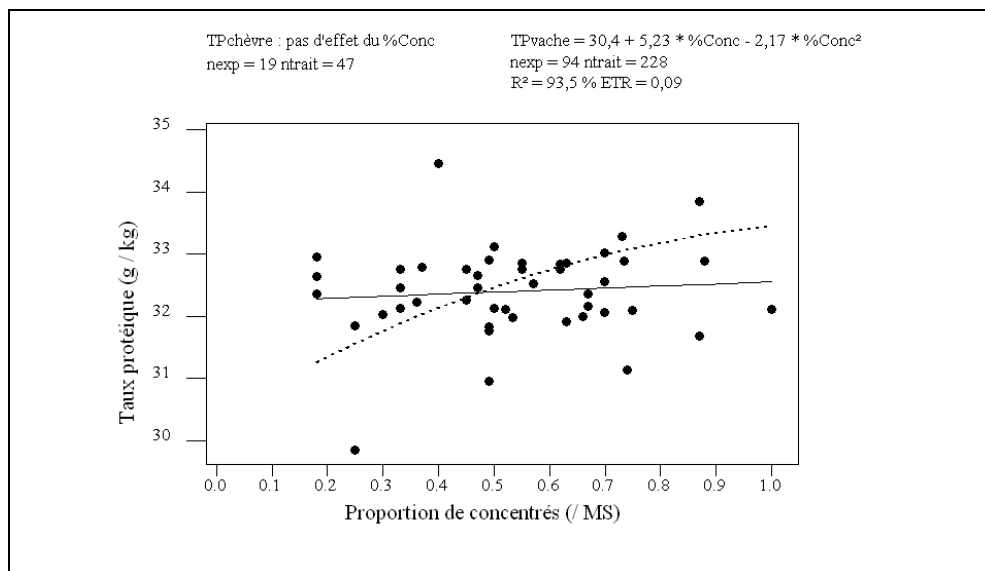


Figure 51 : Effet de la proportion de concentrés dans la ration sur le taux protéique du lait chez la chèvre laitière et la vache laitière.
Le trait plein indique la relation intra-expérimentation chez la chèvre laitière. Le trait en pointillés indique la relation intra-expérimentation chez la vache laitière. Graphique issu des bases de données chèvre-zootecnique et Bovidig.

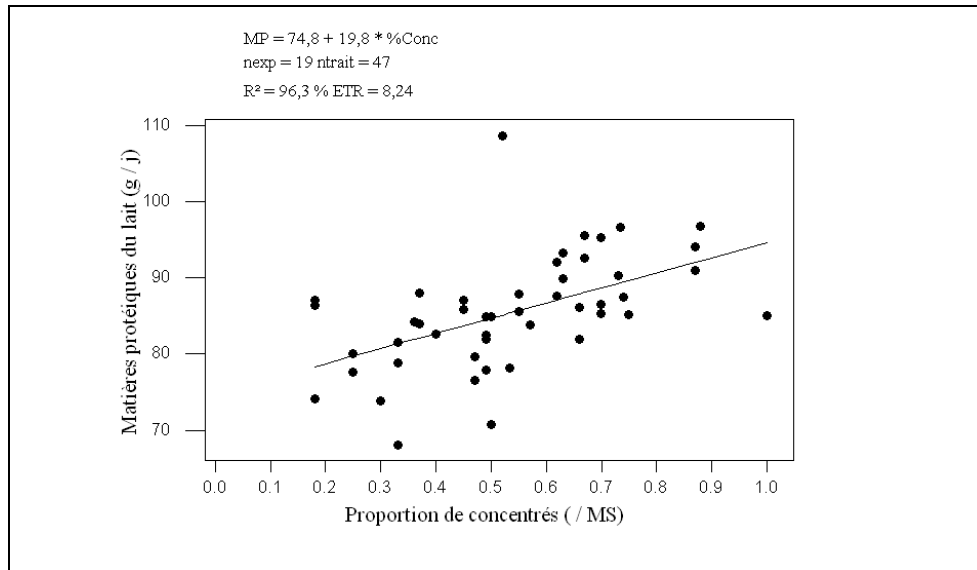


Figure 52 : Effet de la proportion de concentrés dans la ration sur les matières protéiques du lait sécrétées chez la chèvre laitière.

Le trait plein indique la relation intra-expérimentation. Graphique issu des bases de données chèvre-zootecnique.

IV.5.2 Composition en acides gras du lait

Chez la vache laitière, les proportions en AG courts et moyens sont peu impactées par le pourcentage de concentrés (Peterson et al., 2003 ; Loor et al., 2005). Néanmoins, il a été montré que chez la vache laitière, une augmentation du pourcentage de concentrés pouvait réduire les teneurs en AG moyens du fait d'une inhibition de l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase et de l'AG synthétase (Piperova et al., 2000). Chez la chèvre laitière, les proportions en AG courts et moyens sont assez peu affectées par le pourcentage de concentrés (Schmidely et Sauvant, 2001). Les résultats expérimentaux sont assez disparates :

- les proportions en C4:0, C6:0 et C8:0 ne sont pas modifiées (Calderon et al., 1984 ; LeDoux et al., 2002 ; Schmidely et Andrade, 2011) ou sont légèrement augmentées (Andrade et Schmidely, 2006) par l'augmentation du pourcentage de concentrés dans la ration ;
- les proportions en C10:0 et C12:0 sont augmentées (Calderon et al., 1984 ; LeDoux et al., 2002 ; Schmidely et Andrade, 2011) ou non modifiées (Andrade et Schmidely, 2006) ;
- les proportions en C14:0 et C16:0 sont diminuées (Calderon et al., 1984 ; Andrade et Schmidely, 2006) ou non modifiées (LeDoux et al., 2002).

La réduction de la biohydrogénation ruminale des AG insaturés par l'augmentation du pourcentage de concentrés (voir partie IV.3.2 de ce chapitre) a un impact sur la composition en AG du lait. Que ce soit chez la vache ou la chèvre laitière, la proportion en C18:0 diminue avec l'augmentation du pourcentage de concentrés dans la ration (Schmidely et Sauvant, 2001 ; Peterson et al., 2003 ; Loor et al., 2005). Chez la vache laitière, une augmentation du

pourcentage de concentrés, surtout associée à une augmentation de la teneur en amidon des rations associée ou non à l'apport de MG insaturées, augmente la proportion en C18:1 *trans* totaux, et le profil des isomères *trans* du C18:1 est modifié notamment par une proportion plus importante du *trans*-10 C18:1 par rapport au *trans*-11 C18:1 (Piperova et al., 2000 ; Peterson et al., 2003 ; Loor et al., 2005). Chez la chèvre laitière, on observe également une augmentation de la proportion en C18:1 *trans* totaux (Calderon et al., 1984 ; LeDoux et al., 2002 ; Andrade et Schmidely, 2006 ; Schmidely et Andrade, 2011), néanmoins le *trans*-11 C18:1 reste majoritaire (LeDoux et al., 2002 ; Andrade et Schmidely, 2006 ; Schmidely et Andrade, 2011), possiblement à cause des faibles teneurs en amidon de ces rations. Les quantités de *cis*-9, *cis*-12 C18:2 et *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3 secrétées dans le lait sont très dépendantes de la quantité ingérée en ces AG et de l'intensité des biohydrogénations ruminales (Glasser et al., 2008a) .

Les proportions en *cis*-9 C16:1 et *cis*-9 C18:1 diminuent généralement quand le pourcentage de concentrés augmente alors que celle du *cis*-9, *trans*-11 C18:2 augmente. Cela est en lien avec les variations des AG dont ils sont issus (action de la Δ^9 -désaturase sur les C16:0, C18:0 et *trans*-11 C18:1, respectivement).

Chez la vache et la chèvre laitières, l'augmentation du pourcentage de concentrés diminue la proportion en AG impairs et ramifiés (Andrade et Schmidely, 2006 ; Vlaeminck et al., 2006). Il diminue également le ratio des AG iso sur les AG ante-iso (Vlaeminck et al., 2006).

Les résultats observés chez la chèvre laitière, dus au pourcentage de concentrés incorporés dans les rations, sont généralement assez cohérents avec ceux observés chez la vache laitière, même s'il peut exister quelques spécificités chez la chèvre laitière (MG du lait notamment). De plus, les deux bases de données exploitées dans cette étude bibliographique (« chèvre-rumen » et « chèvre-zooteknique ») ont montré qu'il existait peu d'études chez la chèvre en lactation, sur l'influence de ce facteur sur, à la fois, les paramètres ruminiaux et zootechniques, et que, pour certains critères, comme les AG duodénaux, il n'existait pas de données publiées.

V. Stratégie de la thèse

L'objectif principal de cette thèse est d'étudier **comment un changement de régime peut avoir un impact sur le fonctionnement du rumen et la biotransformation ruminale des macromolécules d'origine alimentaire en termes de dynamique et / ou d'intensité**. Pour répondre à ce questionnement, nous avons développé une stratégie expérimentale qui s'appuie sur les différentes méthodes expérimentales détaillées dans l'étude bibliographique : *in vivo* et *in vitro* (**Figure 53**). En effet, aucune de ces méthodes ne s'avère idéale, et les résultats obtenus avec chacune sont complémentaires, notamment parce que les critères mesurés ne sont pas toujours les mêmes. Nous avons choisi deux facteurs expérimentaux. Le facteur principal était le **pourcentage de concentrés incorporés dans la ration**, facteur que nous avons appliqué lors d'un essai *in vivo* (Chapitre 1) et deux essais *in vitro* (Chapitre 2). Pour ces essais *in vitro*, le pourcentage de concentrés a été appliqué au régime des animaux-donneurs de jus de rumen et au substrat incubé. Du fait de sa facilité de mise en œuvre, la méthode *in vitro* a permis de considérer un facteur expérimental supplémentaire, une **supplémentation d'un mélange d'huiles riches en AG polyinsaturés**, que nous avons étudié en interaction avec le pourcentage de concentrés. En effet, les AG polyinsaturés peuvent modifier la biohydrogénation des AG (Beam et al., 2000) et réduire la production de CH₄ (Zhang et al., 2008 ; Beauchemin et al., 2009 ; Martin et al., 2010) et les interactions entre ce facteur et le pourcentage de concentrés ne sont pas complètement connues (Wang et al., 2002).

Nous avons donc étudié l'impact de ces facteurs expérimentaux sur le fonctionnement du rumen et la biotransformation ruminale. Nous avons étudié, au cours des essais *in vivo* et *in vitro*, les **dynamiques postprandiales des paramètres physiques du rumen** (pH, potentiel redox, pression osmotique) et celles des **produits issus des dégradations** des constituants de la ration (AGV, NH₃-N, glucides solubles) (Articles 1, 4 et 5). La **dynamique postprandiale de la production de gaz et de sa composition** a pu être étudiée *in vitro* (Articles 4 et 5). Du fait du matériel expérimental disponible à l'UMR MoSAR, ces mesures n'ont pas pu être réalisées *in vivo*. Des mesures de bilans des biotransformations ont été réalisées par **l'étude de la dégradabilité *in sacco* de substrats alimentaires** (foin et maïs) (Article 1) et des **bilans duodénaux de différents constituants de la ration** (glucides, AG) (Article 2). Nous avons complété cette approche, en étudiant la **dégradabilité ruminale de molécules marqueurs (terpènes)** (Article 2). Les essais *in vitro* ont permis la réalisation de **bilans quantitatifs fermentaires précis (bilans de carbone et d'hydrogène)** (Article 4 et Complément).

Une hypothèse de notre travail était de considérer que l'impact du régime sur la dynamique et l'intensité de biotransformation pouvait **évoluer au cours du temps**. C'est la raison pour laquelle nous avons réalisé l'essai *in vivo* **sur plusieurs semaines**.

L'originalité de notre approche par rapport aux données publiées chez la chèvre laitière (bases de données chèvre-rumen et chèvre-zootéchnique), a été d'étudier conjointement les phénomènes ruminiaux et les phénomènes à l'échelle de l'animal-hôte. Ainsi, les conséquences des biotransformations ruminales sur la **dynamique postprandiales de plusieurs paramètres plasmatiques**, les **performances de production** des animaux et les **qualités nutritionnelles** du lait ont été évaluées (Article 1). Nous avons également étudié les **comportements d'ingestion** des animaux, particulièrement leur **variabilité** et leur conséquence sur le pH ruminal (Article 3).

Enfin, les modèles mécanistes de rumen sont des outils intéressants pour représenter les phénomènes de biotransformation. Néanmoins, ces modèles présentent encore des insuffisances sur certaines parties, et notamment sur la détermination du pH et la production des gaz. Compte tenu du rôle du pH dans la biotransformation ruminale de certaines molécules, nous avons proposé un **modèle mécaniste de fonctionnement du rumen** (Chapitre 4, Article 6) décrivant de la façon la plus mécaniste possible les **relations entre pH, bicarbonates, AGV et gaz**. Pour cela, nous nous sommes appuyés, en partie, sur les approches d'Imamidoost et Cant (2005) et d'Offner et Sauvant (2006). Par souci de simplification, nous avons choisi un système fermé de rumen, un système *in vitro* de type seringue, le même système que celui utilisé lors des études expérimentales.

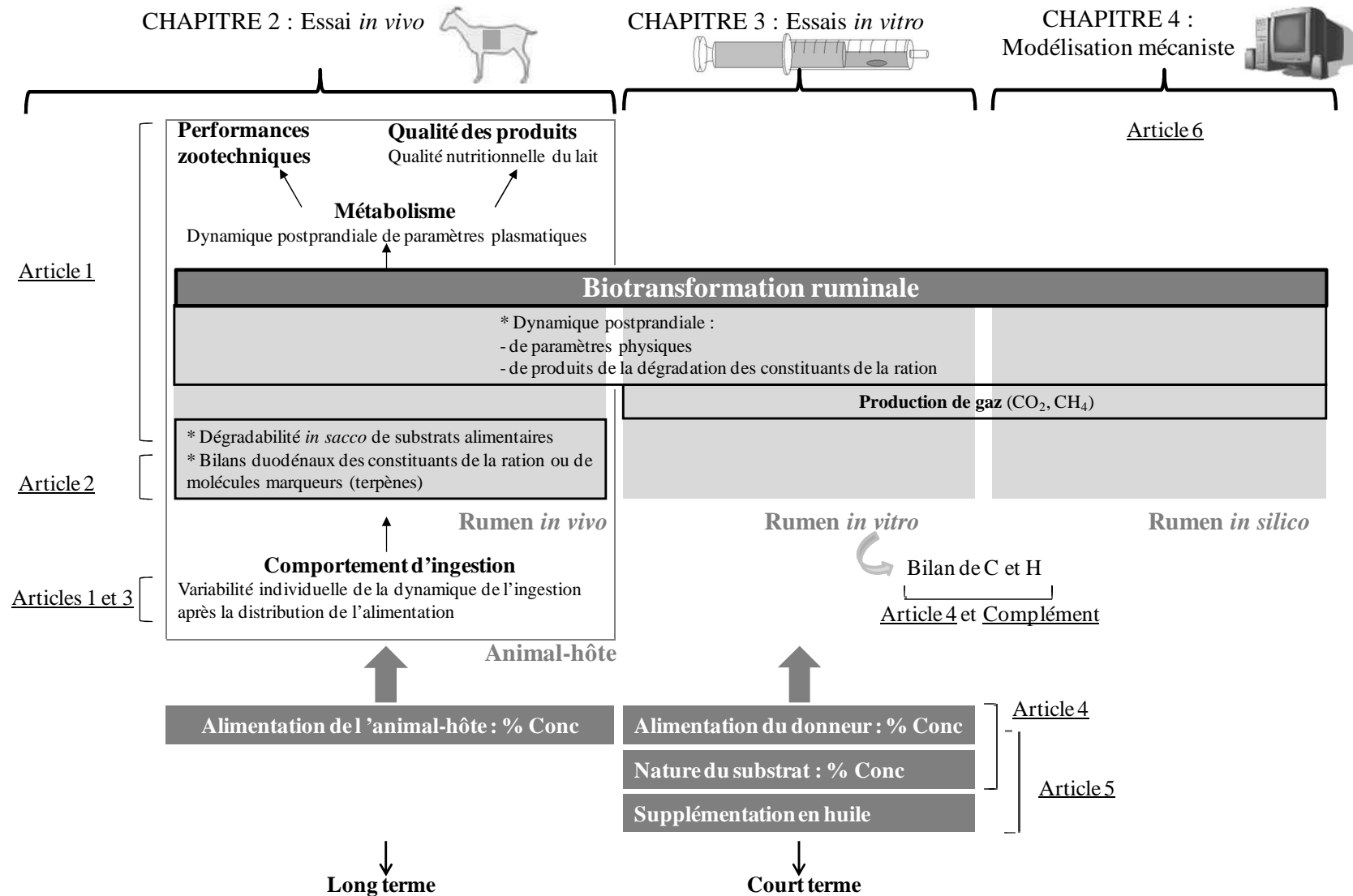


Figure 53 : Stratégie de la thèse.

CHAPITRE 2 : Essai *in vivo*

Introduction

Ce chapitre décrit l'essai *in vivo* qui visait à étudier l'impact du pourcentage de concentrés incorporés dans la ration sur le fonctionnement du rumen et la biotransformation ruminale des constituants de la ration en termes de dynamique et / ou d'intensité, et sur le comportement d'ingestion, des paramètres plasmatiques, les performances zootechniques et la qualité nutritionnelle du lait (**Figure 54**). Nous avons suivi 13 chèvres fistulées du rumen et du duodénum en milieu de lactation (95 ± 4 j post-partum) pendant 10 semaines. En début d'essai, elles ont reçu *ad libitum* une ration commune, appelée « basal » (sur base MS : 52,5 % de concentrés ; 0,89 UFL/kg MS ; 113 g PDIN/kg MS et 109 g PDIE/kg MS et 363 g/kg MS NDF, n = 13). Après une période de transition d'environ deux semaines, elles ont reçu, dans la suite de l'essai, soit une ration riche en concentrés, appelée « H » (sur base MS : 70 % de concentrés ; 0,95 UFL ; 114 g PDIN ; 114 g PDIE et 360 g NDF, n = 6), soit pauvre en concentrés, appelée « L » (35 % de concentrés ; 0,83 UFL ; 113 g PDIN ; 104 g PDIE et 410 g NDF ; n = 7). Le **Tableau 9** résume la chronologie des principaux évènements de l'essai *in vivo* : logement et alimentation des animaux, mesures et prélèvements réalisés.

Les résultats de cette étude ont été séparés en 3 articles distincts (**Figure 54**). Le **Tableau 10** résume les principaux calculs et ajustements appliqués aux données, et, le **Tableau 11**, les modèles statistiques qui ont été utilisés pour l'analyse.

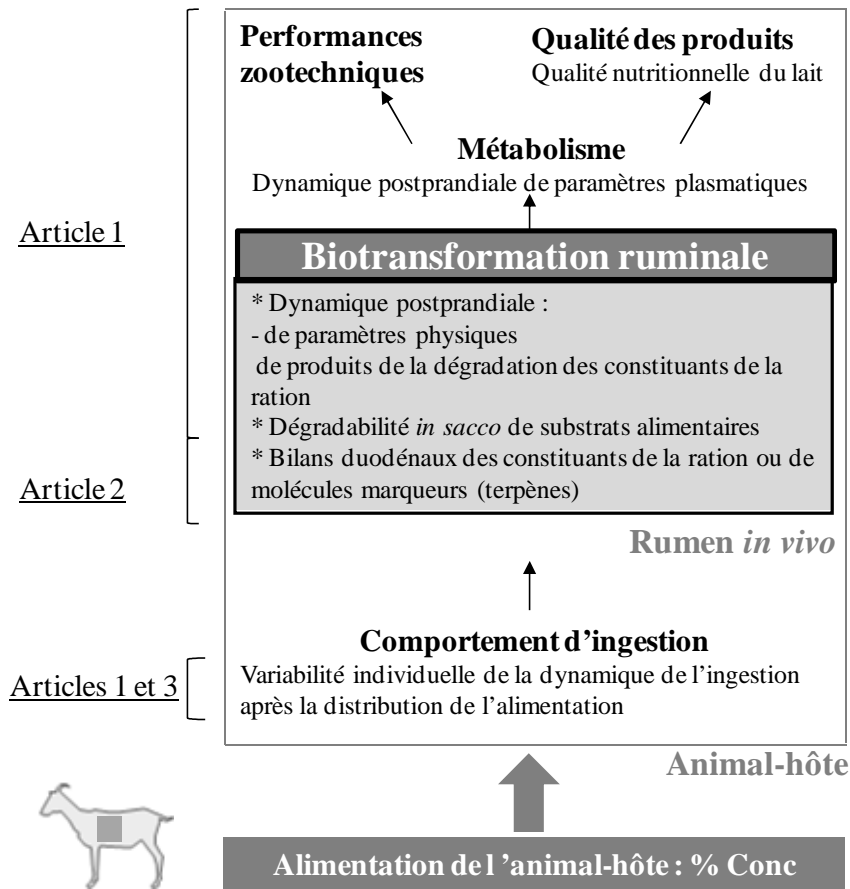


Figure 54 : Descriptif de l'essai *in vivo*.

Tableau 9 : Chronologie de l'étude in vivo.

SEMAINE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
LOGEMENT	Cases individuelles au sol			Cages de digestibilité			Cases individuelles au sol			
RATION	Basal	Transition		L (70 % concentrés, n = 7 chèvres) ou H (35 % concentrés, n = 6 chèvres)						
	Ration ³	-	Ration ³	-	Ration ³	-	Ration ³	-	Ration ³	
INGESTION	Distribué, Refus (à chaque repas)									
	Cinétique d'ingestion ⁴				-			Cinétique d'ingestion ⁴		
POIDS VIF	Hebdomadaire									
SANG / PLASMA ¹	Prélèvement hebdomadaire (matin avant la distribution du repas)									
	Cinétique ⁵	-	Cinétique ⁵	-					Cinétique ⁵	
JUS DE RUMEN ²	Cinétique ⁵		Cinétique ⁵						Cinétique ⁵	
LAIT	Production laitière (5 x / semaine), TP, TB, TL (1 x / semaine)									
	AG ⁶	-			AG ⁶	-			AG ⁶	
DIGESTIBILITE APPARENTE TOTALE ET RUMINALE	-			Distribution de Cr ₂ O ₃			-			
	-			Distribution des terpènes			-			
	-			Fèces ⁷	Fèces ⁸	-				
	-			Refus ⁹		-				
	-				Contenus duodénaux ⁷	-	Contenus duodénaux ¹⁰	-		
IN SACCO	-								Sachets ¹¹	

¹ Critères analysés sur le sang / plasma : glucose, insuline, BHB, urée, AGNE, L-lactate, pression osmotique (plasma), bicarbonate, pH (sang)² Critères analysés sur le jus de rumen : pH, potentiel Redox, pression osmotique, glucides solubles, ammoniac-N, AGV totaux, profil en AGV³ Analyses des rations : MS, MO, NDF, ADF, Amidon, AG totaux, profil en AG⁴ Enregistrement de la masse du contenu des auges toutes les 2 minutes⁵ Cinétique postprandiale après la distribution du repas du matin. Prélèvements à 0, 1, 2, 4, et 6 h pour le jus de rumen et 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, et 6 h pour le sang / plasma.⁶ Analyse du profil en AG du lait⁷ Prélèvements de fèces et de contenus duodénaux, avant toute distribution de Cr₂O₆. Echantillons qui serviront de blancs pour l'analyse du Cr₂O₆⁸ Critères analysés sur les fèces : Cr₂O₆, MS, MO, NDF, ADF, Amidon⁹ Critères analysés sur les refus : MS, MO, NDF, ADF, Amidon¹⁰ Critères analysés sur les contenus duodénaux : Cr₂O₆, MO, NDF, ADF, Amidon, AG totaux, profils en AG, terpènes¹¹ Incubations dans le rumen de sachets nylon contenant du foin (durée d'incubation : 4 h, 8 h, 16 h, 24 h et 48 h ; analyse des résidus : MS, NDF et ADF) ou du maïs (durée d'incubation : 2 h, 4 h, 8 h, 16 h et 24 h ; analyse des résidus : MS et amidon), 3 répétitions

Tableau 10 : Résumé du traitement des données de l'essai in vivo.

Référence	Type de données	Calcul / Ajustement
Article 1	Cinétique : jus de rumen et plasma	-
Article 1	Cinétique de pH ruminal	Ajustement des cinétiques selon le modèle suivant (Dragomir et al., 2008) : $pH(t) = at^3 + bt^2 + ct + d$ → Détermination du pH minimal, durée quand $pH < 6,0$, amplitude de la chute du pH
Article 1 Article 3	Cinétique d'ingestion	Cumul des données enregistrées toutes les 2 min Expression en g / kg de PV Trois traitements possibles des données : (1) Calcul du P90 : MS ingérée dans les 90 min suivant la distribution du repas / MSI totale (2) $MSI = a(1 - e^{-bt})$ Avec a l'asymptote, b la pente de la courbe et t le temps (Baumont, 1988) (3) Segmentation-Classification (Giger-Reverdin et al., 2012)
Article 1	Digestibilité <i>in sacco</i>	<ul style="list-style-type: none"> Calcul de la DMS pour chaque sachet Moyenne par chèvre et par temps d'incubation <ul style="list-style-type: none"> Calcul de la disparition du NDF, ADF (foin), et de l'amidon (maïs) Ajustement des données (MS, NDF, ADF, amidon) avec le modèle d'Ørskov et McDonald (1979) : $Disparition = a + b(1 - e^{-ct})$ avec a la fraction soluble et b la fraction dégradabile (en % MS, NDF, ADF ou amidon), t le temps d'incubation (h), c le taux de dégradation relatif (h^{-1}). <ul style="list-style-type: none"> Calcul de la dégradabilité de la MS (EDDM), du NDF (EDNDF), ADF (EDADF) et amidon (EDamidon) : $= a + [(b * c) / (c + k)]$ avec k le taux de sortie du rumen ($0,06 h^{-1}$)
Article 1	Données zootechniques hebdomadaires	MSI et PL journalières → Moyenne par semaine pour chaque chèvre Besoin énergétique : $70 * PV^{0.75} + PL * (9.5 * TB + 4.1 * TL + 5.7 * TP)$ Besoin PDI : $2.3 * PV^{0.75} + 100/68 * PL * TP$
Article 1	AG du lait	Moyenne des valeurs (Différence non significative entre les semaines)
Article 1	Digestibilité totale	Digestibilité totale de la MS, de la MO, du NDF, de l'ADF, de l'amidon : (Ingestion – Flux fécal) * 100 / Ingestion
Article 2	Flux duodénaux et digestibilité ruminale	Flux duodéal de MS = Flux fécal de Cr / Concentration de Cr dans le contenu duodéal Flux duodéal de MO, NDF, ADF, amidon, AG, terpènes = Flux duodéal de MS * Concentration de l'élément dans le contenu duodéal Digestibilité ruminale = (Ingestion – Flux duodéal) * 100 / Ingestion ; Biohydrogénation des AG C18 insaturés (%) = $100 - 100 * (C18 \text{ insaturé} / C18 \text{ totaux dans les digesta}) / (C18 \text{ insaturé} / C18 \text{ totaux dans l'aliment})$

Tableau 11 : Résumé du traitement statistique des données de l'essai in vivo.

Référence	Types de données	Modèles statistiques ¹	Variables testées	Description du modèle ²
Article 1	Cinétique de jus de rumen et de plasma	Modèle mixte pour des données répétées (temps après distribution du repas) : $Y_{ijkl} = \mu + a_i + b_j + ab_{ij} + c_{ik} + d_{jl} + ad_{ijl} + e_{ijkl}$	Rumen : pH, potentiel Redox, pression osmotique, [glucides solubles], [NH ₃ -N], [AGV tot], %C2, %C3, %C4, %iC4, %C5, %iC5, A:P ratio Plasma : [Glucose], [insuline], [AGNE], [BHB], [Urée], [lactate], pression osmotique	b_j : effet fixe de la semaine (1 ddl) ab_{ij} : interaction %Concentrés*Semaine c_{ik} : effet aléatoire de l'animal (12 ddl) d_{jl} : effet fixe du temps après la distribution du repas (inclus dans la semaine) ad_{ijl} : interaction %Concentrés * Temps(Semaine)
Article 1	Cinétique de pH ruminal	Modèle mixte pour des données répétées (Semaine) : $Y_{ijk} = \mu + a_i + b_j + ab_{ij} + c_{ik} + \delta * d_{ik} + e_{ijk}$	pH minimal, durée quand pH < 6,0, amplitude de la chute du pH	b_j : effet fixe de la semaine (1 ddl) ab_{ij} : interaction %Concentrés*Semaine c_{ik} : effet aléatoire de l'animal (12 ddl) $\delta * d_{ik}$:covariable (valeur en semaine 1)
Article 1 Article 3	Cinétique d'ingestion	Modèle mixte pour des données répétées (Semaine) : $Y_{ijkl} = \mu + a_i + b_j + ab_{ij} + c_{ik} + (\delta * d_{ik}) + f_{jl} + e_{ijkl}$ (1) $Y_{ijkl} = \mu + a_i + b_j + ab_{ij} + c_{ik} + f_{jl} + e_{ijkl}$ (2)	(1)Paramètres d'ajustement : a, b (2)P90, Paramètres d'ajustement (a et b) et données issues de la segmentation – classification (8 segments : durée et quantité ingérée dans chaque segment)	b_j : effet fixe de la semaine (1 ddl) ab_{ij} : interaction %Concentrés*Semaine c_{ik} : effet aléatoire de l'animal (12 ddl) $(\delta * d_{ik}$: covariable (valeur en semaine 1)), f_{jl} : effet fixe du jour d'enregistrement (inclus dans la semaine) (3 ddl)
Article 1	Digestibilité <i>in sacco</i>	Modèle linéaire généralisé : $Y_{ijk} = \mu + a_i + c_{ij} + d_k + e_{ijk}$ (1) $Y_{ij} = \mu + a_i + e_{ij}$ (2)	(1) MS : a, b, c, EDDM pour le foin puis pour le maïs (2) Fibre et amidon: a, b, c, EDNDF, EDADF, EDAmidon	c_{ij} : effet fixe de l'animal (11 ddl), d_k : effet fixe du jour (2 ddl)
Article 1	Données zootech. hebdo -madaires	Modèle mixte pour des données répétées (Semaine) : $Y_{ijk} = \mu + a_i + b_j + ab_{ij} + c_{ik} + \delta * d_{ik} + e_{ijk}$	MSI, PV, PL, PL35%, TB, TP, TL, TB:TP, Matières grasses _{lait} , Protéine _{lait} , Lactose _{lait} , ingestion et bilan énergétique, ingestion et bilan Plasma / sang : glucose, insuline, AGNE, BHB, urée, pression osmotique, pH, bicarbonate	b_j : effet fixe de la semaine (6 ddl) ab_{ij} : interaction %Concentrés*Semaine c_{ik} :effet aléatoire de l'animal (12 ddl) $\delta * d_{ik}$:covariable (valeur en semaine 1)
Article 1	AG du lait	Modèle linéaire généralisé : $Y_{ij} = \mu + a_i + \delta * d_{ij} + e_{ij}$	Profil en AG	$\delta * d_{ij}$: covariable (valeur en semaine 1)
Article 1 Article 2	Digestibilité totale et ruminale	Modèle linéaire généralisé : $Y_{ij} = \mu + a_i + e_{ij}$	Digestibilités totales MS, MO, NDF, ADF, Amidon Ingestion + Flux duodénaux + Digestibilités ruminales : MS, MO, NDF, ADF, Amidon, AG totaux, profil AG, terpènes	

¹ Pour les modèles mixtes, les structures de covariances testées sont : compound symmetry, heterogenous compound symmetry, first-order autoregressive, heterogeneous autoregressive (1). La structure de covariance qui donne le plus petit AIC a été sélectionnée.

² μ : moyenne, a_i effet fixe du pourcentage de concentré (1 ddl, régime H vs. régime L), e erreur résiduelle aléatoire

I. ARTICLE 1 : Effets du pourcentage de concentrés sur les fermentations ruminales, la digestibilité des nutriments, les métabolites plasmatiques et la composition du lait chez la chèvre laitière en milieu de lactation

RESUME DE L'ARTICLE 1

Objectifs :

Les objectifs de ce travail étaient d'étudier les effets du pourcentage de concentrés incorporés dans la ration sur (1) le comportement d'ingestion, l'évolution postprandiale des paramètres fermentaires ruminiaux et des paramètres plasmatiques, (2) la dégradabilité *in sacco* et la digestibilité apparente des constituants de la ration, et (3) la production et la qualité du lait pendant 10 semaines.

Résultats :

L'augmentation du pourcentage de concentrés a diminué le pH ruminal, le rapport acétate / propionate, la concentration en azote ammoniacal dans le rumen, et la concentration en urée du plasma. Le pourcentage de concentrés n'a pas eu d'effet sur les concentrations en acides gras volatils. Le régime haut en concentrés a augmenté la vitesse d'ingestion pendant le repas du matin en début d'expérimentation, alors qu'il a diminué la quantité de MS ingérée et la vitesse d'ingestion pendant le repas du matin en fin d'expérimentation. Le régime haut en concentrés a permis une meilleure digestibilité apparente de la matière organique. La production de lait et la sécrétion de protéines dans le lait ont été augmentées pour les chèvres recevant le régime haut en concentrés par rapport au régime bas en concentrés, alors que la quantité de matières grasses sécrétées dans le lait est similaire entre les deux régimes. Le TB du lait a été diminué chez les chèvres recevant le régime riche en concentrés. Les proportions en acides gras C18:1 *trans* (en pourcentage des acides gras totaux) dans le lait ont été augmentées par le pourcentage de concentrés. Par contre, aucune modification de proportions parmi les acides gras C18:1 *trans* n'a été détectée, en particulier, aucune diminution de la proportion en *trans*-11 C18:1 au profit de la proportion en *trans*-10 C18:1 (en % des acides gras C18:1 *trans* totaux) n'a été observée. De plus, l'isomère *trans*-10, *cis*-12 C18:2 n'a pas été détecté dans le lait.

Discussion et Conclusion :

Les résultats de cette étude sont en accord avec les études antérieures traitant de l'effet du pourcentage de concentrés chez la chèvre et la vache laitières. Le principal intérêt de ce travail est le nombre important de mesures réalisées simultanément sur les mêmes animaux, sur une période relativement longue. Les mesures ont été réalisées à différents niveaux de

l'animal (comportement d'ingestion, fermentations dans le rumen, métabolisme, paramètres zootechniques, qualité du lait) et sur différentes échelles de temps (après la distribution d'un repas ou sur plusieurs semaines). Ce type d'étude est essentiel pour générer des données qui pourront servir au développement et à l'amélioration de modèles empiriques et mécanistes de prédiction de la réponse des animaux aux régimes aux niveaux digestif, métabolique et mammaire.

Effects of the percentage of concentrate on rumen fermentation, nutrient digestibility, plasma metabolites and milk composition in mid-lactation goats

A. Serment, ^{a,b,*} P. Schmidely, ^{a,b} S. Giger-Reverdin, ^{a,b} P. Chapoutot, ^{a,b} and D. Sauvant ^{a,b}

^a AgroParisTech, UMR791 Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, 16 rue Claude Bernard, F-75005 Paris, France

^b INRA, UMR791 Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, 16 rue Claude Bernard, F-75005 Paris, France

* Corresponding author: Amélie Serment
tel.: 33 1 44 08 17 66 fax: 33 1 44 08 18 53
E-mail address: amelie.serment@agroparistech.fr

Journal of Dairy Science 94 (8): 3960-3972



J. Dairy Sci. 94:3960–3972
doi:10.3168/jds.2010-4041
© American Dairy Science Association®, 2011.

Effects of the percentage of concentrate on rumen fermentation, nutrient digestibility, plasma metabolites, and milk composition in mid-lactation goats

A. Serment,^{*†1} P. Schmidely,^{*†} S. Giger-Reverdin,^{*†} P. Chapoutot,^{*†} and D. Sauvant^{*†}
^{*}AgroParisTech, UMR791 Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, and
[†]INRA, UMR791 Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, 16 rue Claude Bernard, F-75005 Paris, France

Running Head

RUMEN FERMENTATION AND MILK QUALITY IN GOATS

Interpretive Summary

Rumen fermentation and milk quality in goats. Serment. The concentrate proportion of dairy goat rations has increased in recent years and may have adverse effects on rumen fermentation and milk quality. The aim of this work was to study the effect of high-concentrate diets on intake pattern, rumen fermentation, digestion, and milk quality for 10 wk. Compared with a low-concentrate diet, milk and protein yields increased with the high-concentrate diet, whereas milk fat content, rumen pH, and ammonia concentration decreased. Such a study is essential to provide data to develop empirical or mechanistic models aimed at predicting responses to dietary change at the digestive, metabolic, and mammary levels.

ABSTRACT

The aim of this work was to study the effects of the dietary percentage of concentrate on patterns of intake, the evolution of rumen fermentation characteristics and plasma metabolites after a meal, nutrient digestibility, and milk production and composition in a medium-term trial in dairy goats. These effects have been well studied in dairy cattle but seldom in goats. Thirteen ruminally and duodenally cannulated dairy goats (95 ± 4 d in milk) fed *ad libitum* were used in this study. Goats were assigned to 1 of 2 dietary treatments: high-concentrate (70% concentrate on dry matter basis) or a low-concentrate (35%) total mixed rations. The experiment was conducted over a period of 10 wk, including 3 wk of adaption to the diets. Patterns of intake, rumen fermentation characteristics and plasma metabolites after a meal and fatty acids profile of milk fat were compared at the onset and at the end of the experiment.

The increase in the dietary percentage of concentrate decreased rumen pH, acetate to propionate ratio, ammonia-N concentration, and plasma urea concentration. The percentage of concentrate did not affect total volatile fatty acid concentrations. The high-concentrate diet increased the rate of intake during the morning meal at the onset of the experiment, whereas it decreased total dry matter intake and the rate of intake during the morning meal at the end of the experiment. The high-concentrate diet resulted in greater organic matter digestibility. Raw milk yield and protein yield were greater in goats fed the high-concentrate diet, whereas fat yield was not affected by the dietary treatments. The milk fat content was lower in goats fed the high-concentrate diet. Proportions of the *trans*-C18:1 isomer relative to total fatty acids in milk were higher with the high-concentrate diet, but no modification of the proportion of total *trans*-C18:1 was detected, in particular no shift from *trans*-11 C18:1 to *trans*-10 C18:1 was observed. Further, the isomer *trans*-10, *cis*-12 C18:2 was not detected. Data from this study could be used for a new modeling approach or to improve existing models.

Key words: dairy goat, percentage of concentrate, rumen, milk composition

INTRODUCTION

European consumption of goat milk products has increased for more than 20 yr, and farmers have responded by increasing goat milk production (FAO, 2010). An increase in milk production is generally achieved by the use of high-concentrate diets (Morand-Fehr et al., 2007), at the expense of milk fat content (**MFC**) and sometimes with higher milk protein content (**MPC**) (Schmidely and Sauvant, 2001; Chilliard and Ferlay, 2004). With high-concentrate diets, the proportions of fatty acids (**FA**) proportions in MFC are generally altered towards a decrease in short- and medium-chain FA (C12 to C16) and an increase in proportions of total *trans* C18:1 isomers (Calderon et al., 1984; Ledoux et al., 2002; Andrade and Schmidely, 2006).

Feeding behavior can be modified by high-concentrate diets (Abijaoudé et al., 2000b; Desnoyers et al., 2008a). Goats fed a diet with 60 versus 30% of concentrates spent less time eating and ruminating and more time resting during the hours following the meal distribution (Desnoyers et al., 2008a). Moreover, goats fed high-concentrate diets had lower digestibility of dietary fiber (Kawas et al., 1991), as was also observed in bovine species (reviews of Huhtanen et al., 2009; Nousiainen et al., 2009). This is associated with changes in the ruminal microbial ecosystem because of a decrease in rumen pH when the percentage of concentrate increases (Archimède et al., 1996).

Unlike the situation in dairy cows (Khorasani and Kennelly, 2001; Lechartier and Peyraud, 2010), few studies have been conducted in which the effects of a high-concentrate diet on intake behavior, fermentation characteristics in the rumen, and milk yield and composition were measured simultaneously, at different time scales (either after feeding or over several weeks; Kawas et al., 1991; Santini et al., 1992). The objectives of this study were to determine the effects of the dietary percentage of concentrate on (1) intake behavior, ruminal measurements, and plasma metabolites after feeding; (2) *in sacco* and *in vivo* digestibility of the dietary constituents; and (3) the milk production and milk composition during a 10-week trial.

MATERIALS AND METHODS

Animals, Design, Diets, and Feeding

Goats were cared for and handled in accordance with the French legislation on animal experimentation in line with the *European Convention for the Protection of Vertebrates used for Experimental and other Scientific Purposes* (European Directive 86/609). Thirteen ruminally and duodenally cannulated Saanen or Alpine goats (BW = 62 ± 4 kg; parity = 3 ± 1 lactation) were used in a 10-week trial, starting 10 wk after their surgical cannulation. At the onset of the trial, they were 95 ± 4 DIM, with 3.3 ± 0.38 kg/d of raw milk yield (**RMY**), a MFC of 38.0 ± 5.11 g/kg, and a MPC of 32.7 ± 2.46 g/kg. Goats were housed in individual pens throughout the trial, except for 3 wk where they were housed in individual metabolism crates for determination of the diet digestibility.

Table 1. Ingredient composition, chemical composition, and nutritive values of low- (L) and high- (H) concentrate diets.

	Diet		SEM	P-value
	L	H		Concentrate ¹
Ingredients (g/100 g DM)				
Forage:	65	30		
Grass hay	29.9	13.8		
Dehydrated alfalfa	35.1	16.2		
Concentrate:	35	70		
Commercial concentrate ²	20	50		
Sugar beet pulp silage	7	20		
Calcium palm oil salt	1.4	-		
Soybean meal	6.6	-		
Chemical composition³ (g/100 g DM)				
CP	16.7	17.7	0.37	0.18
NDF	40.9	36.0	1.47	0.04
ADF	24.4	20.1	0.97	0.01
ADL	3.89	2.97	0.303	0.06
Starch	4.38	9.70	-	-
Ash	8.47	8.37	0.202	0.72
Fatty acid	2.33	2.81	0.750	0.04
Total fatty acid (g/100 g FA)				
C _{12:0} -C _{15:0}	1.89	0.78	0.078	0.01
C _{16:0}	37.3	16.41	0.070	<0.001
C _{18:0}	4.5	3.41	0.029	0.001
<i>cis</i> -9 C _{18:1}	23.5	29.2	0.17	0.002
<i>cis</i> -(9,12) C _{18:2}	17.3	33.1	0.05	<0.001
<i>cis</i> -(9,12,15) C _{18:3}	9.2	10.4	0.05	0.003
C _{20:0} -C _{24:0}	1.47	1.45	0.031	0.70
Nutritive value				
Electrolytic balance ⁴ (mEq/kg DM)	500	419		
Net Energy ⁴ (MJ/kg DM)	5.88	6.75		
PDIN ^{4,5} (g/kg DM)	113	114		
PDIE ^{4,5} (g/kg DM)	104	114		

¹ Effect of the percentage of concentrate

² 18% Maize, 14% sugar beet pulp, 12% sunflower meal, 10% wheat, 10% soybean, 9% rapeseed meal, 6% soybean meal, 4% wheat distiller, 3.5% linseed, 3% pea seed, 1% rapeseed oil, 3% molasses, 6.5% mineral and vitamin premix

³ n = 7 for analysis of NDF, ADF, ADL, ash contents; n = 2 for CP and FA contents; n = 1 for starch content

⁴ Calculated according to the additive method from INRA tables (Baumont et al., 2007)

⁵ PDIN (or E) = protein digestible at the level of intestine when nitrogen (or energy) is limiting for microbial protein synthesis.

At the onset of the trial (wk 1), goats were fed a basal TMR containing 52.5% of concentrate for 1 wk. At the end of this first week, goats were randomly assigned to 1 of 2 experimental groups, according to their parity, their RMY during this week, and their MFC and MPC. Goats were then progressively switched from the basal TMR to their experimental TMR over wk 2 by increasing or decreasing by 5% the proportion of the concentrate in the TMR every 2 d until the concentrate proportions of the experimental diets were achieved. The experimental TMR (Table 1) contained either a high-concentrate percentage (**H**, 70% of concentrate/DM, 6 goats) or a low-concentrate percentage (**L**, 35% of concentrate/DM, 7 goats). Goats were fed *ad libitum* (approximately 10% of refusals) for 8 wk. Feed was offered individually twice a day at 0800 and 1600 h, after milking, with two-thirds allocated in the afternoon and one-third in the morning, according to the time interval between milkings. Energy (NE_L) and nitrogen (digestible protein in the intestine - **PDI**) values of the feed and TMR were calculated according to the additive method from INRA tables (Baumont et al., 2007).

The forage was a mixture of grass hay (46% of forage DM) and dehydrated alfalfa (Rumiluz, Désialis, Paris, France; 54% of forage DM). The concentrate was composed of a commercial concentrate (Agralys Aliment, Châteaudun, France) and sugar beet pulp silage. Soybean meal and calcium palm oil salt were added to the concentrate part of L diet and basal diet so that the 3 TMR had similar calculated CP and total FA contents, respectively.

Feed offered and refusals were individually weighed daily. Distributed feed and refusals samples were taken at wk 1 for the basal diet and at wk 4, 6, and 10 for the experimental TMR. Samples of feed were oven-dried at 87°C for 24 h and ground through a 1-mm sieve before being analyzed.

Animal Performance

Goats were weighed weekly, at the middle of the day (1400 h). They were milked twice a day, at 0700 h and 1530 h. Milk samples were taken weekly from 2 consecutive milkings. and stored at 4°C with bronopol (Trillard, Surgères, France) until analysis of fat, protein, and lactose contents. Milk samples were also taken at wk 1, 6, and 10 and were frozen without preservative at -20°C for analysis of milk FA profile.

From the onset of the trial, blood samples were taken weekly, before the morning feeding in heparinized tubes from jugular vein. They were immediately centrifuged, and plasma was stored at -20°C until analysis of glucose, NEFA, urea, BHBA, insulin and osmotic pressure. A supplementary blood sample was collected for immediate analysis of blood pH and blood bicarbonate concentration (SAS ABL77, Radiometer Analytical, Neuilly-Plaisance, France).

Patterns of DMI, Ruminal Fermentation and Plasma Concentrations After Feeding

At wk 1, 4, and 10, the dynamic patterns of intake were recorded by weighing devices placed under the feed trough, which recorded the weight of feed in the trough every 2 min (Desnoyers et al., 2008a). The recordings were made for each goat during 4 successive morning meals of each week.

At wk 4 and 10, 50 mL of rumen contents was individually collected, at 0, 1, 2, 4, and 6 h after the morning feeding of the fourth day of intake recording. Rumen pH and redox

potential (equilibrium value after 30 min) were measured and 4 aliquots were taken at each time. Filtered rumen fluid (6 mL) was acidified with H₃PO₄ 25% (vol/vol) and stored at –20°C until analysis of VFA. A second aliquot of rumen fluid (3 mL) was mixed with 12.5% TCA (vol/vol) and kept at –20°C until analysis of ammonia-N (NH₃-N). A third aliquot of rumen fluid (3 mL) was mixed with 0.15% HCl (vol/vol) and stored at –20°C for analysis of soluble carbohydrate. The fourth aliquot was stored without preservative at –20°C for analysis of osmotic pressure.

Ten milliliters of blood was individually collected from the jugular vein in heparinized tubes on the same days as samplings of rumen contents, at 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, and 6 h after the morning meal. Samples were immediately centrifuged for 10 min at 3,000 x g at a temperature of 5°C, and plasma was stored at –20°C until analysis of glucose, NEFA, urea, BHBA, insulin, L-lactate, and osmotic pressure.

In Situ Ruminal Degradability of Substrate

In wk 9, ruminal degradability of DM, NDF, ADF, and starch in 12 goats (6 for each group) was determined with the nylon bag procedure derived from Vérité et al. (1987). Two ingredients were incubated: grass hay of the diets (to measure the DM, NDF, and ADF degradability) and maize grain (to measure the DM and starch degradability). Samples of ingredients were ground through a 1-mm screen. Nylon bags (44-µm pore size, 6 cm*15 cm, SaatiTech, Appiano Gentile, Italy) containing 3 g of ingredient were incubated in triplicate (1 d for each replicate) for 4, 8, 16, 24, and 48 h for grass hay and 2, 4, 8, 16, and 24 h for maize. When removed from the rumen, bags were rinsed in cold water and washed for 10 min in cold water in order to remove rumen particles and rumen microbes attached to substrates. Bags were then frozen to stop fermentation. After freezing, they were dried in an air-oven at 60°C for 48 h, and then analyzed for DM. Residues from bags were pooled within each goat for the incubation duration and then analyzed for NDF and ADF (grass hay) and starch (maize).

Whole-Tract Digestibility

To measure the apparent fecal digestibility of diets (6 goats per diet), feed offered, refusals, and total feces were weighed daily during 5 consecutive days in wk 6. Aliquots of refusals and feces were collected daily at the same time, pooled by animal at the end of the 5 d, dried in an air-oven at 87°C for 24 h, and ground through a 1-mm sieve before analyses of DM, NDF, ADF, and starch.

Analytical Procedures

The DM contents of TMR, refusals, feces, and nylon bag residues were determined by oven-drying at 103°C for 24 h. The NDF content was estimated by the method of Van Soest and Wine (1967) modified by Giger et al. (1987) with the use of a heat stable α -amylase but without sodium sulfite and decalin. The contents of ADF and acid detergent lignin were obtained using a sequential approach on the NDF residue (Giger et al., 1987). Ash and starch contents were analyzed according to ISO (1978) and AFNOR (1997) methods, respectively. Total N was determined by the Dumas technique (Sweeney and Rexroad, 1987).

Concentrations of $\text{NH}_3\text{-N}$ and soluble carbohydrate of rumen fluid were analyzed with an autoanalyser (Technicon, Oise, France), according to the methods of Weatherburn (1967) and Brown and Boston (1961), respectively. Concentrations of VFA were determined by gas chromatography (Kristensen, 2000). Osmotic pressures of rumen fluid and plasma were determined using an osmometer (Mark3, Fiske, Radiometer Analytical). Plasma samples were analyzed using a Cobas Mira-analyzer (Roche, Mannheim, Germany) with commercial kits for glucose (Gluco-quant, Glucose/HK, Roche), NEFA [NEFA-HR(2), Wako Chemical GmbH, Neuss, Germany], urea (Urea/BUN, Roche) and L-lactate (Lactate, Roche). The BHBA concentrations were analyzed by the procedure of Barnouin et al. (1986). Insulin was analyzed using ELISA kits (Mercodia Ovine Insulin ELISA, Uppsala, Sweden).

Fat and protein contents of milk were analyzed by infrared spectrophotometry (Syndicat Interdépartemental de l'Élevage, Le Mée, France). Analysis of milk and diet FA contents and profiles was described by Andrade and Schmidely (2006).

Calculations and Statistical Analysis

The rate of feed intake and the cumulated DMI after each feeding, expressed in grams per kilogram of BW were calculated from the recordings of the weight of feed in the trough every 2 min (Desnoyers et al., 2008a). The following nonlinear model (Baumont, 1988) was then applied to each profile (for each goat and each recording day) using the NLIN procedure of SAS (SAS Institute, 2000):

$$\text{Cumulative DMI } (t) = A (1 - e^{-Bt})$$

where A is the asymptote, $A \times B$ the slope of the curve and t the time after feeding.

For each period and goat, pH data were described by a third-degree polynomial model as described by Dragomir et al. (2008). The minimal pH, initial pH, the amplitude of the pH decrease (initial pH – minimal pH) and the time when the rumen pH was below 6.0 were calculated. Daily DMI and RMY were averaged by goat and by week.

The fitted parameters of the DMI patterns, the parameters on pH profiles after feeding, ruminal and plasma data, and weekly performance data were analyzed using the mixed procedure of SAS (SAS Institute, 2000) for repeated measurements. The model included fixed effects of the percentage of the concentrate, the week, the interaction between the percentage of concentrate and the week, and an appropriate covariate (value in wk 1). Animal was considered as a random effect. For ruminal and plasma data, the fixed effects of the time after feeding and its interaction with the percentage of concentrate were included in the model. The repeated measurements were applied to the time after feeding and not to the week, and no covariate was used. For the fitted parameters of the DMI patterns, we added a fixed effect of recording day. The models were tested with 4 covariance structures: compound symmetry, heterogeneous compound symmetry, first-order autoregressive and heterogeneous autoregressive (1). The covariance structure that provided the smallest Akaike's information criteria was selected.

In sacco disappearance of DM, calculated from its proportion remaining in the bag after incubation in the rumen, was determined for each nylon bag. The DM disappearance was averaged by goat and by incubation time (triplicate). *In sacco* degradability of NDF and ADF

(for grass hay) and starch (for maize) were then calculated. Calculated DM, NDF, ADF, and starch disappearances were described with the non-linear model of Ørskov and McDonald (1979):

$$\text{Disappearance} = a + b(1 - e^{-ct})$$

where a is the soluble fraction (% of total DM, NDF, ADF, or starch), b the degradable fraction (% of total DM, NDF, or starch), t the time of rumen incubation (h) and c the relative rate of degradation of fraction b (h^{-1}). Non-linear parameters a , b and c were estimated using the NLIN procedure of SAS (SAS Institute, 2000). The effective degradability of DM (**EDDM**), NDF (**EDNDF**), ADF (**EDADF**), and starch (**EDS**) was calculated as:

$$\text{EDDM, EDNDF, EDADF or EDS} = a + [(b \times c) / (c + k)]$$

where k is the estimated rate of outflow from the rumen, fixed at 0.06 h^{-1} (Vérité et al., 1987). *In sacco* DM data (parameters a , b , c and **EDDM**) were analyzed using the GLM procedure of SAS (SAS Institute, 2000) with a model including the percentage of concentrate, the fixed effect of the animal, and day. As residues from bags were pooled within each goat for analysis of NDF, ADF, or starch, NDF, ADF, and starch disappearance data were analyzed using the GLM procedure of SAS with only a test of the effect of the diet. The same model was applied to data of apparent fecal digestibility.

Milk FA proportions measured at wk 6 and 10 were averaged by goat, and preliminary statistical analysis indicated no significant effect of week on any FA proportions. Individual data of milk FA were analyzed using the GLM procedure of SAS (SAS Institute, 2000) with a model including the percentage of concentrate and the appropriate covariate obtained in wk 1. All data presented in this paper are least squares means \pm SEM.

RESULTS

Chemical Composition and Nutritive Values of the Diets

The H diet had lower NDF and ADF contents and higher contents of starch and FA than the L diet (Table 1). The H diet had lower proportions of C16:0 and C18:0 and higher proportions of *cis*-9 C18:1, *cis*-9, *cis*-12 C18:2 and *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3 in dietary FA than the L diet.

DMI

The effects of recording day and percentage of concentrate on the parameters calculated to assess the DMI pattern after a meal were never significant. However, an interaction was found between the percentage of concentrate and the time of the asymptote of the cumulative intake profile (parameter A: $P < 0.001$) and the rate of intake (parameter B: $P = 0.01$). Parameters A and B of goats fed the H diet decreased, respectively, from 15.3 to $10.5 \pm 0.72 \text{ g / kg BW}$ ($P < 0.001$) and from 0.055 to $0.035 \pm 0.0041 / \text{min}$ ($P < 0.001$) between wk 4 and 10, whereas these measurements did not change with time for goats fed the L diet ($14.5 \pm 0.72 \text{ g / kg BW}$ and $0.037 \pm 0.0041 / \text{min}$, respectively).

Daily DMI was not influenced by the percentage of concentrate (Table 2). However, an interaction was observed between the percentage of concentrate and time on daily DMI relative to BW (Table 2) with a higher decrease of the daily DMI relative to BW for goats fed the H diet than for goats fed the L diet between wk 4 and 10 (Figure 1a).

Table 2. Effect of the percentage of concentrate on BW, intake, milk yield, milk composition, and energy and protein balance.

Item	Diet ¹		SEM	P-value ²		
	L	H		C	W	C x W
Intake and BW						
DMI (kg/d)	2.68	2.98	0.105	0.27	0.02	0.09
DMI (g/kg BW/d)	42.1	45.7	1.33	0.11	0.01	0.02
BW (kg)	63.0	66.1	1.59	0.01	<0.001	0.72
Milk production and composition						
Raw milk yield (kg/d)	2.95	3.71	0.176	<0.001	<0.001	0.36
3.5% FCM (kg/d)	3.27	3.68	0.157	0.06	<0.001	0.96
Milk yield (g/d)						
Fat	123	128	6.6	0.55	<0.001	0.93
Protein	96	116	4.7	0.004	0.02	0.50
Lactose	137	173	8.9	0.001	<0.001	0.83
Milk content (g/kg):						
Fat	41.9	34.9	2.07	<0.001	<0.001	0.01
Protein	32.5	32.0	0.67	0.43	0.004	0.76
Lactose	46.0	46.7	0.52	0.14	<0.001	0.08
Milk fat:protein ratio	1.28	1.09	0.048	<0.001	<0.001	0.08
Energy and protein calculated balance³						
NEL intake (MJ/d)	15.5	20.4	0.87	<0.001	0.13	0.005
NEL balance (MJ/d)	-0.43	2.62	0.561	<0.001	0.02	0.16
PDIE intake (g PDI/d)	272	350	13.7	0.001	0.03	0.08
PDIE balance (g PDI/d)	85	119	8.2	0.03	0.01	0.28

¹ L = low percentage of concentrate (n = 7 goats), H = high percentage of concentrate (n = 6 goats).

² C: percentage of concentrate; W: week; C x W: interaction between percentage of concentrate and time.

³ PDIE = protein digestible at the level of intestine when energy is limiting.

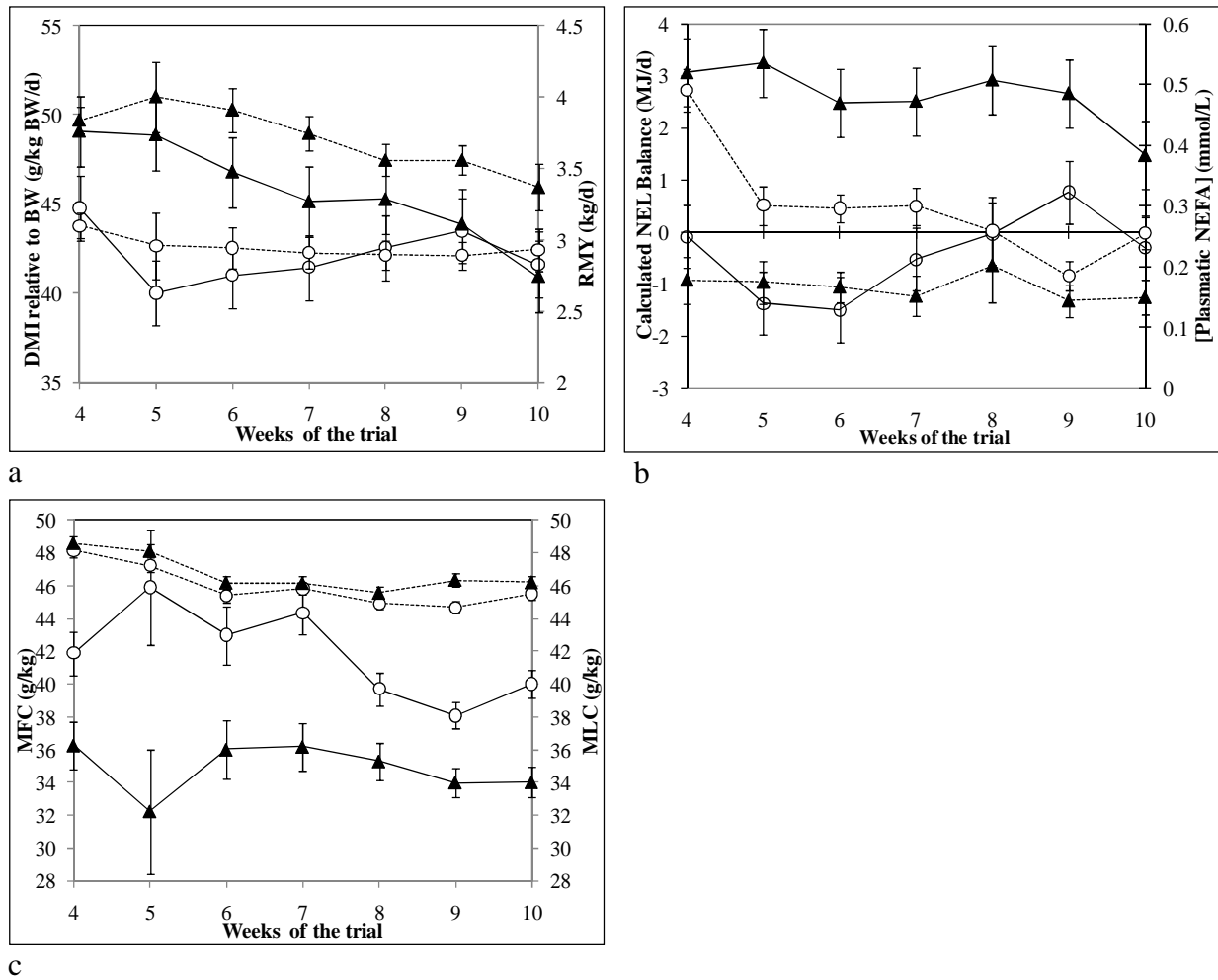


Figure 1. a) DMI relative to BW (—) and raw milk yield (RMY, ---), b) calculated NE_L balance (—) and plasma concentration of NEFA (---), c) milk fat content (MFC, —) and milk lactose content (MLC, ---) of goats fed experimental TMR with a low (○) or high (▲) percentage of concentrate from wk 4 to 10.

Rumen Fermentation Characteristics After Feeding

Rumen pH and NH_3-N concentration were lower and, the rumen redox potential and soluble carbohydrate concentration were higher for goats fed the H diet than for those fed the L diet (Table 3, Figure 2a and 2b). The percentage of concentrate did not affect total VFA concentration, but goats fed the H diet had lower acetate:propionate ratios and lower proportions of branched-chain VFA (BCVFA, isobutyrate and isovalerate) than goats fed the L diet (Table 3, Figure 2c and 2d).

The interaction between the percentage of concentrate and the time after feeding had an effect on most of the measurements. The decrease after feeding of the ruminal concentration of BCVFA was more marked for goats fed the L diet compared with those fed the H diet (Figure 2d).

The minimal value of pH after feeding was lower and duration of pH below 6.0 was higher in goats fed the H diet compared with those fed the L diet (Table 3, Figure 2a). Initial value of

pH was much lower at wk 10 than at wk 4 for H goats ($P < 0.001$). Furthermore, the pH decrease after feeding was higher in wk 4 than in wk 10 for goats fed the H diet ($P < 0.001$) but not for goats fed the L diet (Table 3, Figure 2a).

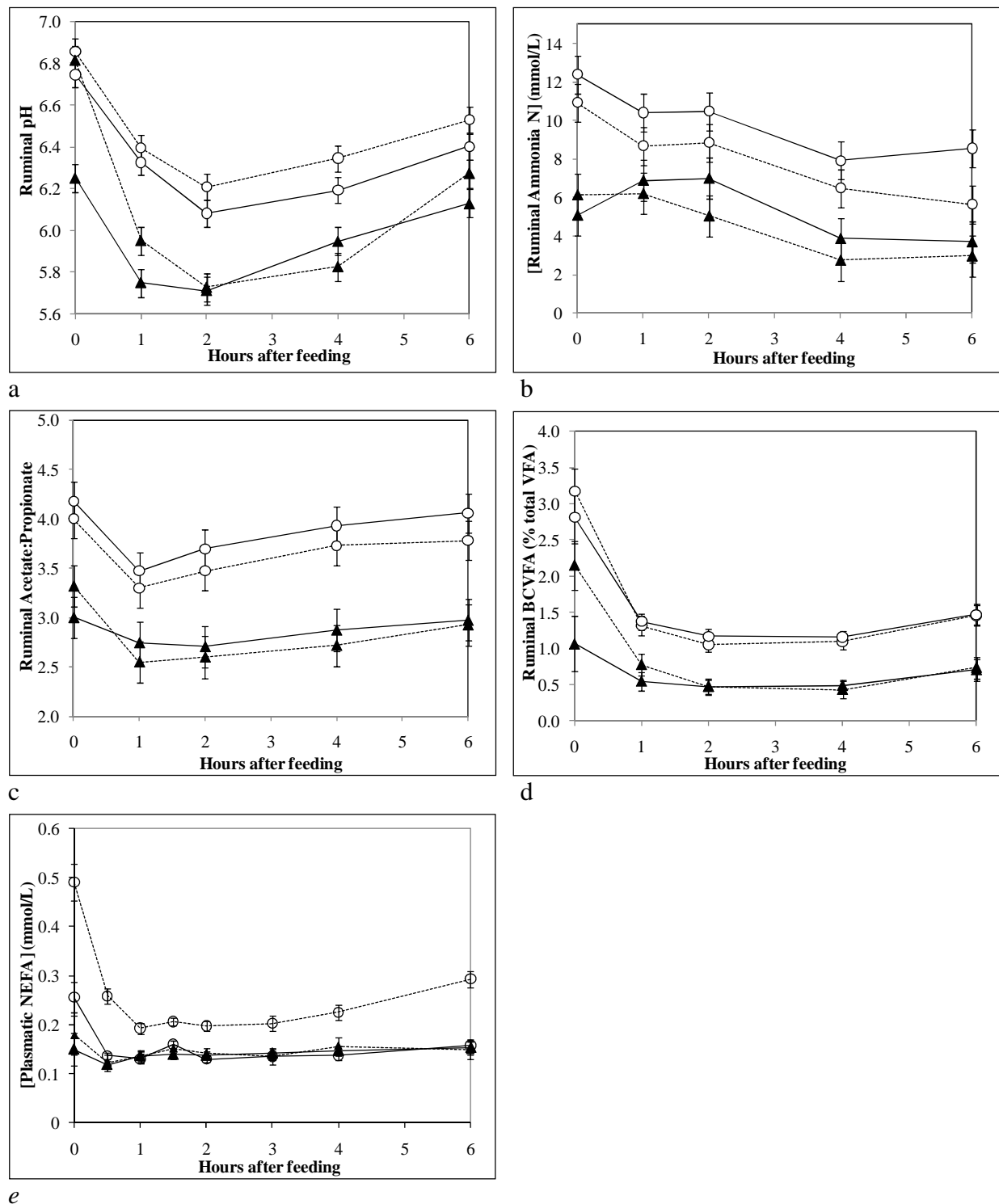


Figure 2. Short-term dynamics of ruminal measurements: a) pH, b) ammonia-N, c) acetate:propionate ratio, d) the proportion of branched-chain VFA, and e) plasma concentrations of NEFA after the morning meal in goats fed experimental TMR with a low (○) or high (▲) percentage of concentrate in wk 4 (dotted line) and 10 (solid line).

Table 3. Effect of the percentage of concentrate on rumen measurements at 0, 1, 2, 4, and 6 h after the morning feeding in wk 4 and 10.

Item ¹	Diet ²				SEM	P-value ³				
	L, Wk4	L, Wk10	H, Wk4	H, Wk10		C	W	C*W	T	C*T
pH	6.47 ^a	6.35 ^b	6.12 ^c	5.96 ^d	0.062	<0.001	<0.001	0.37	<0.001	<0.001
Initial pH	6.85 ^a	6.74 ^a	6.82 ^{ab}	6.34 ^c	0.010	0.002	<0.001	<0.001	-	-
Minimal pH	6.18 ^a	6.08 ^a	5.62 ^b	5.65 ^b	0.012	<0.001	0.59	0.29	-	-
Amplitude of pH decrease	0.65 ^b	0.65 ^b	1.22 ^a	0.62 ^b	0.013	0.01	0.002	0.002	-	-
Period when pH < 6.0 (min)	18 ^b	35 ^b	182 ^a	178 ^a	4.3	0.004	0.76	0.61	-	-
Redox potential (mV)	-372 ^b	-372 ^b	-352 ^a	-356 ^a	3.6	0.002	0.54	0.53	<0.001	0.003
Osmotic pressure (mOsm/L)	322 ^b	331 ^{ab}	345 ^{ab}	348 ^a	6.8	0.09	0.39	0.73	<0.001	0.002
Soluble carbohydrates (g/L)	1.65 ^{ab}	1.55 ^b	2.50 ^a	2.37 ^a	0.165	0.02	0.52	0.93	<0.001	0.02
Ammonia-N (mmol/L)	8.12 ^b	9.95 ^a	4.62 ^c	5.31 ^c	0.795	0.003	0.02	0.30	<0.001	0.01
Total VFA (mmol/L)	100	102	109	105	2.3	0.19	0.75	0.26	<0.001	0.42
VFA, mol/100 mol										
Acetate (A)	67.7 ^a	68.5 ^a	63.6 ^b	63.3 ^b	0.94	0.005	0.71	0.42	<0.001	0.01
Propionate (P)	18.8 ^b	18.0 ^b	22.8 ^a	24.1 ^a	1.13	0.04	0.77	0.25	<0.001	0.01
Butyrate	10.6	10.6	11.5	10.9	0.35	0.49	0.46	0.45	0.002	0.11
Isobutyrate	1.00 ^a	0.95 ^a	0.57 ^b	0.43 ^b	0.084	0.002	0.09	0.37	<0.001	0.05
Valerate	1.02 ^{ab}	1.03 ^{ab}	1.07 ^a	0.91 ^b	0.038	0.63	0.02	0.01	<0.001	0.05
Isovalerate	0.62 ^a	0.65 ^a	0.34 ^b	0.22 ^b	0.063	<0.001	0.25	0.09	<0.001	0.005
BCVFA ⁴	1.62 ^a	1.60 ^a	0.91 ^b	0.66 ^b	0.146	<0.001	0.12	0.19	<0.001	0.03
A:P ratio	3.66 ^a	3.87 ^a	2.82 ^b	2.86 ^b	0.179	0.002	0.23	0.41	<0.001	0.37

^{a,d} Within a row, means without a common superscript letter differ ($P < 0.05$).

¹Data on pH were calculated after having described pH data by a third-degree polynomial model as described by Dragomir et al. (2008).

²L = low percentage of concentrate (n = 7 goats), H = high percentage of concentrate (n = 6 goats).

³C: percentage of concentrate; W: week, T: time after feeding.

⁴BCVFA: branched-chain volatile fatty acids (isobutyrate + isovalerate).

In Sacco Ruminal Degradability and In Vivo Total-Tract Digestibility

In sacco DM and starch degradability of maize was not affected by the percentage of concentrate (EDDM = $75.9 \pm 0.41\%$; EDS = $82.6 \pm 0.34\%$). The EDDM and EDNDF of grass hay were lower for goats fed the H diet than for goats fed the L diet (Table 4). Results for *in sacco* ADF degradability of grass hay were the same as the results of *in sacco* NDF degradability (EDADF = $19.4 \pm 0.88\%$ for the H diet vs. $24.0 \pm 0.88\%$ for the L diet, $P = 0.001$).

The OM total-tract digestibility was higher in goats fed the H diet ($71.0 \pm 1.31\%$) than in those fed the L diet ($65.7 \pm 1.31\%$; $P = 0.003$). Starch digestibility tended to be higher ($98.9 \pm 0.49\%$ for the H diet vs. $97.89 \pm 0.49\%$ for the L diet, $P = 0.07$), whereas NDF and ADF total-tract digestibility were not affected by experimental diets, with means of $56.8 \pm 1.21\%$ and $50.7 \pm 1.83\%$, respectively.

Table 4. Effect of the percentage of concentrate on *in sacco* degradability of DM and NDF when grass hay was the tested ingredient.

Item ¹	Diet ²		SEM	P-value
	L	H		Concentrate
DM				
Soluble: a	19.0	23.7	0.86	<0.001
Degradable: b	51.2	46.0	1.03	0.002
Rate of degradation (%/h)	0.065	0.045	0.0043	<0.001
Effective degradability	45.2	42.8	0.50	0.001
NDF				
Soluble: a	1.03	4.69	1.045	0.06
Degradable: b	59.5	64.0	3.65	0.55
Rate of degradation (%/h)	0.059	0.041	0.0056	0.08
Effective degradability	30.5	27.0	0.70	0.003

¹ Data of DM and NDF disappearance were fitted with the non-linear model proposed by Ørskov and McDonald (1979): Disappearance = $a + b(1 - e^{-ct})$ where a is the soluble fraction (% of total DM or NDF), b the degradable fraction (% of total DM or NDF), t the time of rumen incubation (h) and c the relative rate of degradation of fraction b (h^{-1}). Effective degradabilities of DM or NDF were calculated with a particle outflow from the rumen of $0.06 h^{-1}$.

² L = low percentage of concentrate (n = 6 goats), H = high percentage of concentrate (n = 6 goats).

Blood Composition Before and After Feeding

Plasma concentrations of glucose, insulin, BHBA, urea and osmotic pressure measured after feeding (Table 5) were not affected by the percentage of concentrate. Plasma concentration of NEFA was lower, whereas L-lactate concentration was higher for goats fed the H diet than for those fed the L diet after feeding (Table 5).

Plasma concentrations of insulin, NEFA, BHBA, L-lactate, and osmotic pressure measured before feeding were affected by the percentage of concentrate in the same way as after feeding. Goats fed the H diet had higher plasma concentrations of glucose than those fed the L diet before feeding (3.28 vs. 3.07 ± 0.056 mmol/L, respectively; $P = 0.007$) and lower plasma concentration of urea-N (18.8 vs. 23.1 ± 1.08 mmol/L, respectively; $P = 0.003$). Blood

pH and bicarbonate concentration before feeding were not affected by the percentage of concentrate (7.41 ± 0.006 and 27.5 ± 0.54 , respectively).

Values of NEFA before feeding were higher for goats fed the L diet compared with goats fed the H diet (Figure 2e), and the decrease in concentration of NEFA after feeding was higher for goats fed the L diet than for those fed the H diet (Figure 2e). During the trial, NEFA in plasma before feeding decreased over time for goats fed the L diet, whereas it was quite stable across weeks for goats fed the H diet (Figure 1b).

Animal Performances and Milk Composition

Throughout the trial, RMY was higher in goats fed the H diet than those fed the L diet (Table 2, Figure 1a). Compared with goats fed the L diet, those fed the H diet had lower MFC and fat:protein ratio, and higher protein and lactose yields (Table 2, Figure 1c). An interaction was observed between the percentage of concentrate and time only on the MFC (Table 2), with a higher decrease of MFC for goats fed the L diet compared with the H diet (Figure 1c). Calculated net energy balance (NEB) and PDI balance were higher for goats fed the H diet than those fed the L diet (Table 2). The energy balance of goats fed the L diet was negative (Figure 1b).

Compared with goats fed the L diet, those fed the H diet had higher proportions of C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, *cis*-12 C18:1, *cis*-13 C18:1, total *trans* C18:1 isomers, *cis*-9, *cis*-12 C18:2, *cis*-9, *trans*-12 and *trans*-11, *cis*-15 C18:2 in milk, and lower proportions of C16:0, C18:0, C20:0, *cis*-9 C16:1, and *cis*-9-C18:1 (Table 6). Odd-chain FA and branched-chain FA were not affected by the percentage of concentrate, except for C13:0, iso-C15:0, and iso-C16:0. Ratios *cis*-9 C14:1/C14:0 to *cis*-9, *trans*-11 C18:2/*trans*-11 C18:1 were not modified by the percentage of concentrate.

Table 5. Effect of the percentage of concentrate on plasma composition measured at 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, and 6 h after the morning feeding in wk 4 and 10.

Item	Diet ¹				SEM	P-value ²				
	L, Wk 4	L, Wk 10	H, Wk 4	H, Wk 10		C	W	C*W	T	C*T
Glucose (mmol / L)	3.23 ^b	3.25 ^{ab}	3.42 ^a	3.32 ^b	0.045	0.14	0.13	0.01	<0.001	0.55
Insulin (nmol / L)	0.085 ^b	0.098 ^{ab}	0.214 ^a	0.196 ^{ab}	0.0349	0.09	0.77	0.07	<0.001	0.06
NEFA (mmol / L)	0.259 ^a	0.156 ^b	0.146 ^b	0.141 ^b	0.0125	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
BHBA (mmol / L)	0.427	0.460	0.415	0.420	0.0246	0.57	0.50	0.61	<0.001	<0.001
Urea (mmol of N / L)	24.1 ^a	24.2 ^a	18.1 ^b	18.8 ^{ab}	1.44	0.08	0.59	0.65	<0.001	0.55
L-Lactate (mmol / L)	0.344 ^c	0.440 ^{ab}	0.452 ^b	0.515 ^a	0.0223	0.03	<0.001	0.28	<0.001	0.09
Osmotic Pressure (mOsm / L)	300	301	300	302	0.7	0.69	0.06	0.32	<0.001	0.27

^{a,d} Within a row, means without a common superscript letter differ ($P < 0.05$).

¹ L = low percentage of concentrate (n =7 goats), H = high percentage of concentrate (n=6 goats).

² C: percentage of concentrate; W: week, T: time after feeding.

Table 6. Effect of the percentage of concentrate on the fatty acid profile (% total fatty acid) of milk fat.

Item	Diet ¹		SEM	P-value
	L	H		Concentrate
C _{4:0}	1.82	1.74	0.043	0.34
C _{6:0}	2.38	2.50	0.060	0.29
C _{8:0}	2.88	3.22	0.094	0.01
C _{10:0}	9.68	11.30	0.350	0.003
C _{11:0}	0.29	0.34	0.017	0.10
C _{12:0}	3.70	4.88	0.205	<0.001
C _{13:0}	0.14	0.19	0.011	0.02
C _{14:0}	8.97	10.59	0.257	<0.001
iso-C _{14:0}	0.10	0.10	0.007	0.99
<i>cis</i> -9 C _{14:1}	0.13	0.14	0.006	0.24
C _{15:0}	1.01	1.04	0.030	0.57
iso-C _{15:0}	0.22	0.17	0.010	<0.001
anteiso-C _{15:0}	0.33	0.30	0.012	0.17
C _{16:0}	27.95	23.79	0.754	<0.001
iso-C _{16:0}	0.24	0.27	0.007	0.03
<i>cis</i> -9 C _{16:1}	0.48	0.37	0.027	0.05
C _{17:0}	0.70	0.71	0.009	0.78
iso-C _{17:0}	0.47	0.42	0.047	0.65
anteiso-C _{17:0}	0.33	0.34	0.007	0.58
C _{18:0}	9.23	8.07	0.343	0.04
<i>trans</i> -6, <i>trans</i> -7 and <i>trans</i> -8 C _{18:1}	0.30	0.43	0.023	<0.001
<i>trans</i> -9 C _{18:1}	0.29	0.42	0.021	<0.001
<i>trans</i> -10 C _{18:1}	0.38	0.67	0.047	<0.001
<i>trans</i> -11 C _{18:1}	1.38	2.78	0.231	<0.001
<i>trans</i> -12 C _{18:1}	0.34	0.51	0.030	<0.001
<i>cis</i> -6 and <i>trans</i> -13 and <i>trans</i> -14 C _{18:1}	0.23	0.59	0.055	0.01
<i>trans</i> -15 C _{18:1}	0.29	0.33	0.011	0.01
<i>trans</i> -16 C _{18:1}	0.25	0.32	0.013	0.01
<i>cis</i> -9 C _{18:1}	18.51	15.32	0.677	0.01
<i>cis</i> -11 C _{18:1}	0.41	0.46	0.015	0.10
<i>cis</i> -12 C _{18:1}	0.26	0.47	0.041	0.003
<i>cis</i> -13 C _{18:1}	0.08	0.09	0.004	0.02
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 C _{18:2}	2.81	3.35	0.116	0.004
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -12 C _{18:2}	0.05	0.06	0.001	0.01
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 C _{18:2}	0.65	1.28	0.112	<0.001
<i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15 C _{18:2}	0.06	0.09	0.006	0.01
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 C _{18:3}	0.85	0.78	0.021	0.10
C _{20:0}	0.16	0.13	0.008	0.003
C _{20:4}	0.12	0.11	0.004	0.16
Unidentified FA	1.18	1.28	0.085	0.16
Saturated (S)	70.61	69.76	0.673	0.46
∑ <i>trans</i> C _{18:1} + <i>cis</i> -6 C _{18:1}	3.43	5.96	0.420	<0.001
Monounsaturated (M)	23.33	22.78	0.513	0.56
Polyunsaturated (P)	4.82	6.03	0.194	0.001
<i>cis</i> -9 C _{14:1} /C _{14:0}	0.01	0.01	0.001	0.54
<i>cis</i> -9 C _{16:1} /C _{16:0}	0.02	0.02	0.001	0.58
<i>cis</i> -9 C _{18:1} /C _{18:0}	2.05	1.92	0.091	0.37
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 C _{18:2} /trans-11 C _{18:1}	0.47	0.46	0.013	0.72

¹ L = low percentage of concentrate (n = 7 goats), H = high percentage of concentrate (n = 6 goats).

DISCUSSION

Intake, Ruminant Measurements, Nutrient Digestibility and Plasma Metabolites

DMI and Physical Measurements of Rumen. In our study, daily DMI was not influenced by the percentage of concentrate because of high between-goat variability. From a meta-analysis of trials on dairy goats, Sauvant et al. (2007) predicted a mean increase of 100 g/d of DMI per 10% of concentrate when percentage of concentrate of the diet was around 50%. In our trial, the corresponding value was 86 g/d per 10% concentrate.

Considering the cumulative intake profile, 2 periods can be distinguished in our trial. In wk 4, the high percentage of concentrate caused an increase in the rate of intake, due to a lower fill effect of the H diet compared with the L diet in accordance with lower NDF and higher starch contents. At wk 10, animals fed the H diet limited their rate of intake to the same level as goats fed the L diet and reduced their DMI. Such an adaptation of intake behavior was observed by Desnoyers et al. (2008b) in goats seeking to avoid subacute ruminal acidosis. Abijaoudé et al. (2000b) reported an increase in the number of secondary meals and DMI during these meals when feeding a high percentage of concentrate. These changes of intake behavior would allow a higher salivation and thus a higher production of buffer, which could explain the smaller pH decrease between the onset and the end of the trial for goats fed the H diet. It is also possible that H goats had some type of aversion to the high-concentrate diet after suffering subacute ruminal acidosis (Desnoyers et al., 2009). The H goats reduced their DMI throughout the experiment, resulting in a progressively smaller depression of MFC; however no significant interaction between the percentage of concentrate and week for RMY and milk lactose contents was observed. However, according to blood pH and bicarbonate concentration, goats in our study were not in metabolic acidosis.

Rumen pH in this study was low in comparison with other published data on dairy goats fed high percentages of concentrate (Cerrillo et al., 1999), but similar to that observed for lactating goats with high levels of DMI/BW (Santini et al., 1992; Lu, 1993).

Rumen VFA and Consequences on Metabolism. The A:P was comparable to that of lactating goats having a similar level of DMI/BW (Santini et al., 1992). The increase in plasma glucose concentration before feeding the diet with the high percentage of concentrate probably reflects higher hepatic gluconeogenesis (Bobe et al., 2004), coherent with the higher propionate proportion observed in our trial. Propionate that escapes from neoglucogenesis can be a precursor for the synthesis of the linear odd-chain FA in the mammary gland from propionyl-CoA and malonyl-CoA (Massart-Leën et al., 1983). This could explain the increase in the proportion in C13:0 in the milk of goats fed the H diet compared with those fed the L diet. However, a large part of the C13:0 also comes from synthesis by rumen bacteria (Vlaeminck et al., 2006).

Ruminal Nitrogen and Metabolism. An increase of nitrogenous concentrate supply generally increases the NH₃-N content of rumen juice. However, the opposite was found in the current work, as in Abijaoudé et al. (2000a). As the energy availability in the rumen was probably much higher in the H diet than in the L diet, rumen microbes of H diet fed animals would require more NH₃-N to sustain their growth, which would decrease rumen NH₃-N

concentration, plasma urea and milk urea. The higher percentage of concentrate decreased the concentrations and the proportions of BCVFA, possibly because of a result of reduction in catabolism of dietary branched-chain amino acids. The BCVFA (isobutyrate and isovalerate) in the rumen are largely derived from the catabolism of dietary branched-chain amino acids (valine and leucine, respectively; Allison, 1969). As iso-C15:0 and iso-C16:0 are formed from valine and leucine (Vlaeminck et al., 2006), these iso-FA were also decreased in the rumen and then in the milk.

In Sacco Degradability and In Vivo Digestibility. *In sacco* degradability of NDF and ADF was lower on the H diet compared with the L diet. The depression of fiber digestion can be related to the reduction in activity of the cellulolytic microbes associated with the decrease in ruminal pH (Santini et al., 1992; Archimède et al., 1997). However, total-tract digestibility of NDF and ADF was not modified by the percentage of concentrate, probably because of the partial substitution of ruminal digestion by intestinal digestion (Archimède et al., 1997).

Plasma NEFA and Energy Balance. Despite higher milk energy output for goats fed the H diet and because of the higher energy content of the H diet, NEB was improved by 209 kcal per 10% of concentrate. In the literature, only Rapetti et al. (1997) have observed such an NEB increase per 10% of concentrate. The meta-analysis of Sauvant et al. (2007) suggested a mean NEB increase of only 119 kcal per 10% of concentrate with similar contents of concentrate. Lower NEB was associated with higher plasma NEFA concentrations of goats fed the L diet. This was expected because plasma NEFA concentration reflects the mobilization of adipose tissue to meet energy requirement (Dunshea et al., 1988).

Milk Production and Milk Composition

In our study, RMY increased by 229 g per 10% of concentrate, whereas Sauvant et al. (2007) predicted a mean RMY increase of 120 g per 10% of concentrate for similar contents of concentrate. That meta-analysis compiled articles with a RMY increase between 36 g (Kawas et al., 1991) and 240 g (Desnoyers et al., 2008a) per 10% of concentrate. These differences may be due to the stage of lactation of goats, their energy status, the nature of the diet and the distribution mode of the diet (TMR vs. forage and concentrate separated).

Milk protein yield increased with the higher proportion of concentrate in the diet but MPC was not modified, in agreement with the observations of Rapetti et al. (1997). The greater milk synthesis could be related to the higher microbial protein synthesis in the H diet compared with the L diet.

Feeding high-concentrate diets generally induces low MFC in goats (Sauvant et al., 2007). A decrease of 4.48 g fat / kg milk between goats fed the H diet and those fed the L diet was predicted from the relationship determined by Schmidely and Sauvant (2001) for goats, whereas in the current study the actual decrease was 6.50 g fat / kg milk. Because milk fat yield was not modified by the percentage of concentrate, the decrease of MFC can be mainly related to a dilution effect.

Feeding high-concentrate diets does not generally modify or increase the proportion of FA with 4 to 8 carbon atoms in milk (Calderon et al., 1984; Ledoux et al., 2002; Andrade and Schmidely, 2006). In goats fed the H diet, the proportions of medium-chain FA (FA with 10

to 16 carbon atoms) in milk increased, except for the proportion of C16:0. Conflicting reports have been reported concerning medium-chain FA in dairy goats: C10:0 and C12:0 increased (Andrade and Schmidely, 2006) or were not modified by a higher proportion of concentrate in the diet (Calderon et al., 1984; Ledoux et al., 2002), whereas decreases in C14:0 and C16:0 were also observed by Andrade and Schmidely (2006). Discrepancies between these data and our results may be due to the use of a calcium palm oil salt in the L diet that is rich in C16:0 and *cis*-9 C18:1 and to a lesser extent in *cis*-9, *cis*-12 C18:2. Indeed, mammary synthesis of medium-chain FA is inhibited by dietary C18:0 and C18:1 (Chilliard et al., 1993; Teh et al., 1994), which may explain the low proportion of FA from C10:0 to C14:0 and the high proportion of C16:0 in milk of goats fed the L diet in our study. The increase in the percentage of concentrate in our study decreased the proportion of C18:0, possibly because of higher dietary amounts of this FA in the L diet than in the H diet, and to ruminal hydrogenation conditions probably more saturating for the FA of the L diet than those of the H diet (see below). The proportions of *cis*-9 C16:1 and *cis*-9 C18:1 in milk decreased with increasing percentage of concentrate. These FA partly originate from their plasma uptake and partly from desaturation of C16:0 and C18:0 by the mammary Δ^9 -desaturase (Chilliard and Ferlay, 2004). The decrease in the proportions of *cis*-9 C16:1 and *cis*-9 C18:1 was directly linked to the decrease of the proportions of C16:0 and C18:0, because the calculated proxy of Δ^9 -desaturase activity (*cis*-9 C18:1/C18:0) was not modified by the concentrate proportion. The proportions of total *trans*-C18:1 were increased by the percentage of concentrate as already observed in the literature (Calderon et al., 1984; Ledoux et al., 2002; Andrade and Schmidely, 2006). These isomers are intermediary products of ruminal biohydrogenation of the dietary poly-unsaturated FA (Glasser et al., 2008). Consequently, ruminal biohydrogenation conditions in goats fed the H diet appear to stay high but would be slightly less efficient than for goats fed the L diet. These differences probably arise from changes in rumen microbial populations (Kaufmann et al., 1980) associated with the lower ruminal pH on the H diet. In this context, cellulolytic bacteria seem to be the most active in the ruminal biohydrogenation process (Harfoot and Hazlewood, 1997). Despite the increase of *trans*-C18:1 isomers with the H diet, no modification of the proportion in total *trans*-C18:1 was noticed in our study, and notably no shift from *trans*-11 C18:1 to *trans*-10 C18:1 was observed. Further, the isomer *trans*-10, *cis*-12 C18:2 was not detected. Relative to cows, goats are less likely to produce *trans*-10 C18:1 and *trans*-10, *cis*-12 C18:2. They are also less sensible to the anti-lipogenic activity of *trans*-10, *cis*-12 C18:2 (Shingfield et al., 2010). The *trans*-11 C18:1 is the major *trans* C18:1 isomer, which explains why *cis*-9, *trans*-11 C18:2 was the major conjugated linoleic acid, due to the action of the Δ^9 -desaturase of mammary gland.

CONCLUSIONS

This study evaluated the impact of high-concentrate diets on dairy goats. The results were consistent with previous reports in goats and dairy cows. This work extended the current information by collecting a large number of simultaneous measurements for a relatively long

time. Such a study is essential to generate data for building or improving empirical and mechanistic models aimed at predicting the response to dietary change at the digestive, metabolic and mammary levels.

ACKNOWLEDGMENTS

J. Teissier, A. Eymard, G Durandet, J.-P. Bonte, J. Chevallier, A. Severin and J.-L. Le Pierres (INRA, UMR791 Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, Paris and Thiverval-Grignon, France) are gratefully acknowledged for obtaining research data on goats. We thank O. Dhumez, F. Ternois, H. Albarello and L. Péricard (INRA, UMR791 Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, Paris, France) for the analysis of the samples.

REFERENCES

- Abijaoudé, J. A., P. Morand-Fehr, J. Tessier, P. Schmidely, and D. Sauvant. 2000a. Influence of forage:concentrate ratio and type of starch in the diet on feeding behaviour, dietary preferences, digestion, metabolism and performance of dairy goats in mid lactation. *Anim. Sci.* 71:359-368.
- Abijaoudé, J. A., P. Morand-Fehr, J. Tessier, P. Schmidely, and D. Sauvant. 2000b. Diet effect on the daily feeding behaviour, frequency and characteristics of meals in dairy goats. *Livest. Prod. Sci.* 64:29-37.
- AFNOR. 1997. V18-121. Aliments des animaux. Détermination enzymatique de la teneur totale en amidon. Association française de normalisation, La Plaine Saint-Denis, France.
- Allison, M. J. 1969. Biosynthesis of amino acids by ruminal microorganisms. *J. Anim. Sci.* 29:797-807.
- Andrade, P. V. D., and P. Schmidely. 2006. Influence of percentage of concentrate in combination with rolled canola seeds on performance, rumen fermentation and milk fatty acid composition in dairy goats. *Livest. Sci.* 104:77-90.
- Archimède, H., D. Sauvant, J. Hervieu, F. Ternois, and C. Poncet. 1996. Effects of the nature of roughage and concentrate and their proportion on ruminal characteristics of non lactating goats, consequences on digestive interactions. *Anim. Feed Sci. Technol.* 58:267-282.
- Archimède, H., D. Sauvant, and P. Schmidely. 1997. Quantitative review of ruminal and total tract digestion of mixed diet organic matter and carbohydrates. *Reprod. Nutr. Develop.* 37:173-189.
- Barnouin, J., N. El Idilbi, Y. Chilliard, J. P. Chacornac, and R. Lefaiivre. 1986. Micro-dosage automatisé sans déprotéinisation du β -hydroxybutyrate plasmatique chez les bovins. *Ann. Rech. Vet.* 17:129-139.
- Baumont, R. 1988. Cinétique d'ingestion lors du grand repas chez le mouton : influence du temps d'accès au foin et de son ingestibilité. *Reprod. Nutr. Develop.* 28:183-184.
- Baumont, R., J. P. Dulphy, D. Sauvant, G. Tran, F. Meschy, J. L. Peyraud, and P. Champciaux. 2007. Les tables de la valeur des aliments. Pages 181-286 in

- Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux–Valeurs des Aliments. Tables INRA 2007. Ed. Quae, Versailles, France.
- Bobe, G., J. W. Young, and D. C. Beitz. 2004. Pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87:3105-3124.
- Brown, M. E., and M. S. Boston. 1961. Ultra-microsinger determination using 2.9 dimethyl. 1. 10 phenanthroline hydrochloride (neocuproine). *Diabetes* 10:60-62.
- Calderon, I., E. J. d. Peters, N. E. Smith, and A. A. Franke. 1984. Composition of goat's milk: changes within milking and effects of a high concentrate diet. *J. Dairy Sci.* 67:1905-1911.
- Cerrillo, M. A., J. R. Russell, and M. H. Crump. 1999. The effects of hay maturity and forage to concentrate ratio on digestion kinetics in goats. *Small Rumin. Res.* 32:51-60.
- Chilliard, Y., M. Doreau, G. Gagliostro, and Y. Elmeddah. 1993. Addition de lipides protégés (encapsulés ou savons de calcium) à la ration de vaches laitières. Effets sur les performances et la composition du lait. *INRA Prod. anim.* 6:139-150.
- Chilliard, Y., and A. Ferlay. 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reprod. Nutr. Develop.* 44:467-492.
- Desnoyers, M., C. Duvaux-Ponter, K. Rigalma, S. Roussel, O. Martin, and S. Giger-Reverdin. 2008a. Effect of concentrate percentage on ruminal pH and time-budget in dairy goats. *Animal* 2:1802-1808.
- Desnoyers, M., S. Giger-Reverdin, C. Duvaux-Ponter, E. Lebarbier, and D. Sauvant. 2008b. Modélisation des épisodes d'acidose sub-clinique et du comportement alimentaire associé : application à la chèvre laitière. *Renc. Rech. Ruminants* 15:339-343.
- Desnoyers, M., S. Giger-Reverdin, C. Duvaux-Ponter, and D. Sauvant S. 2009. Modeling of off-feed periods caused by subacute acidosis in intensive lactating ruminants: Application to goats. *J. Dairy Sci.* 92:3894-3906.
- Dragomir, C., D. Sauvant, J. L. Peyraud, S. Giger-Reverdin, and B. Michalet-Doreau. 2008. Meta-analysis of 0 to 8 h post-prandial evolution of ruminal pH. *Animal* 2:1437-1448.
- Dunshea, F. R., A. W. Bell, and T. E. Trigg. 1988. Relations between plasma non-esterified fatty acid metabolism and body tissue mobilization during chronic undernutrition in goats. *Br. J. Nutr.* 60:633-644.
- FAO. 2010. FAOSTAT. <http://faostat.fao.org/site/569/DesktopDefault.aspx> Accessed April 14, 2010
- Giger, S., P. Thivend, D. Sauvant, M. Dorléans, and P. Journaix. 1987. Etude de l'influence préalable de différents traitements amylolytiques sur la teneur en résidu NDF d'aliments du bétail. *Ann. Zootech.* 36:39-48.
- Glasser, F., P. Schmidely, D. Sauvant, and M. Doreau. 2008. Digestion of fatty acids in ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors: 2. C18 fatty acids. *Animal* 2: 691-704.
- Harfoot, C. G., and G. P. Hazlewood. 1997. Lipid metabolism in the rumen. Pages 382-426 in *The rumen microbial ecosystem*. P. N. Hobson, and C. S. Stewart (Ed.), Blackie Academic & Professional, London.

- Huhtanen, P., M. Rinne, and J. Nousiainen. 2009. A meta-analysis of feed digestion in dairy cows. 2. The effects of feeding level and diet composition on digestibility. *J. Dairy Sci.* 92:5031-5042.
- ISO. 1978. ISO 5984. Animal Feedingstuffs. Determination of Crude Ash. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.
- Kaufmann, W., H. Hagemeister, and G. Dirksen. 1980. Adaptation to changes in dietary composition, level and frequency of feeding. Pages 587-602 in *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants*. Y. Ruckebusch, and P. Thivend (Ed.), MTP Press Ltd, Lancaster, England.
- Kawas, J. R., J. Lopes, D. L. Danelon, and C. D. Lu. 1991. Influence of forage-to-concentrate ratios on intake, digestibility, chewing and milk production of dairy goats. *Small Rumin. Res.* 4:11-18.
- Khorasani, G. R., and J. J. Kennelly. 2001. Influence of carbohydrate source and buffer on rumen fermentation characteristics, milk yield, and milk composition in late-lactation Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 84:1707-1716.
- Kristensen, N. B. 2000. Quantification of whole blood short-chain fatty acids by gas chromatographic determination of plasma 2-chloroethyl derivatives and correction for dilution space in erythrocytes. *Acta Agric. Scand. Sect. A. Anim. Sci.* 50:231-236.
- Lechartier, C., and J. L. Peyraud. 2010. The effects of forage proportion and rapidly degradable dry matter from concentrate on ruminal digestion in dairy cows fed corn silage-based diets with fixed neutral detergent fiber and starch contents. *J. Dairy Sci.* 93:666-81.
- Ledoux, M., A. Rouzeau, P. Bas, and D. Sauvant. 2002. Occurrence of trans-C18:1 fatty acid isomers in goat milk: Effect of two dietary regimens. *J. Dairy Sci.* 85:190-197.
- Lu, C. D. 1993. Implication of feeding isoenergetic diets containing animal fat on milk composition of alpine does during early lactation. *J. Dairy Sci.* 76:1137-1147.
- Massart-Leën, A. M., E. Roets, G. Peeters, and R. Verbeke. 1983. Propionate for fatty acid synthesis by the mammary gland of the lactating goat. *J. Dairy Sci.* 66:1445-1454.
- Morand-Fehr, P., V. Fedele, M. Decandia, and Y. I. Frileux. 2007. Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.* 68:20-34.
- Nousiainen, J., M. Rinne, and P. Huhtanen. 2009. A meta-analysis of feed digestion in dairy cows. 1. The effects of forage and concentrate factors on total diet digestibility. *J. Dairy Sci.* 92:5019-5030.
- Ørskov, E. R., and I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci. (Camb.)* 92:499-503.
- Rapetti, L., A. Tamburini, G. M. Crovetto, G. Galassi, and G. Succi. 1997. Energy utilization of diets with different hay proportions in lactating goats. *Zootec. Nutr. Anim.* 23:317-328.

- Santini, F. J., C. D. Lu, M. J. Potchoiba, J. M. Fernandez, and S. W. Coleman. 1992. Dietary fiber and milk yield, mastication, digestion, and rate of passage in goats fed alfalfa hay. *J. Dairy Sci.* 75:209-219.
- SAS Institute. 2000. User's Guide. Release 11.04. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Sauvant, D., S. Giger-Reverdin, and F. Meschy. 2007. Alimentation des caprins. Pages 137-148 in *Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux–Valeurs des Aliments. Tables INRA 2007.* Ed. Quae, Versailles, France.
- Schmidely, P., and D. Sauvant. 2001. Taux Butyreux et composition de la matière grasse du lait chez les petits ruminants: effets de l'apport de matières grasses ou d'aliments concentrés. *INRA Prod. anim.* 14:333-352.
- Shingfield, K. J., L. Bernard, C. Leroux, and Y. Chilliard. 2010. Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal* 4:1140-1166.
- Sweeney, R. A., and P. R. Rexroad. 1987. Comparison of leco FP-228 'nitrogen determinant' with AOAC copper catalyst kjeldahl method for crude protein. *J. AOAC Int.* 70:1028-1030.
- Teh, T. H., L. T. Trung, Z. H. Jia, T. A. Gipson, K. B. Ogden, and T. F. Sweeney. 1994. Varying amount of rumen-inert fat for high producing goats in early lactation. *J. Dairy Sci.* 77:253-258.
- Van Soest, P. J., and R. H. Wine. 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *J. AOAC* 50:50-55.
- Vérité, R., B. Michalet-Doreau, P. Chapoutot, J. L. Peyraud, and C. Poncet. 1987. Révision du système des Protéines Digestibles dans l'Intestin (PDI). *Bull. Tech., C.R.Z.V. Theix* 70:19-34.
- Vlaeminck, B., V. Fievez, A. R. J. Cabrita, A. J. M. Fonseca, and R. J. Dewhurst. 2006. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131:389-417.
- Wheatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 38:971-977.

II. **ARTICLE 2 : Effets du pourcentage de concentrés sur les flux duodénaux de fibres, d'amidon et d'acides gras, et sur la biotransformation ruminale de monoterpènes chez la chèvre en milieu de lactation**

RESUME DE L'ARTICLE 2

Objectifs :

Le but de cette étude était d'étudier les effets du pourcentage de concentrés sur les flux duodénaux de MS, de MO, de fibre, d'amidon et d'acides gras chez la chèvre laitière. Un second objectif était d'examiner les conséquences de ce facteur expérimental sur la dégradation ruminale de quatre monoterpènes (β -pinène, p-cymène, α -terpinéol et un mélange de β - et γ -terpinéols), qui diffèrent de par leur structure et leur dégradabilité apparente *in vitro*. Ce genre de données est rare chez la vache laitière et n'existe pas chez la chèvre laitière.

Résultats :

L'augmentation du pourcentage de concentrés a augmenté la digestibilité ruminale de la MS et de la MO. Elle a augmenté numériquement la digestibilité ruminale du NDF, mais n'a pas modifié celles de l'ADF et de l'amidon. Le flux duodéal d'AG totaux a représenté 118 et 167 % des AG totaux ingérés, pour les chèvres recevant les régimes H et L, respectivement. La biohydrogénation ruminale des *cis*-9 C18:1 et *cis*-9, *cis*-12 C18:2 a été augmentée par l'accroissement du pourcentage de concentrés. L'augmentation du pourcentage de concentrés a accru la proportion de C18:1 *trans* totaux dans les contenus duodénaux. Aucune diminution de la production de *trans*-11 C18:1 au profit de la production de *trans*-10 C18:1 n'a été observée avec le régime H, comparativement au régime L. De plus, l'isomère *trans*-10, *cis*-12 C18:2 n'a pas été détecté dans les digesta. En moyenne, 24,3, 21,8, 7,8 et 5,3 mol / 100 mol des quantités ingérées de β -pinène, p-cymène, α -terpinéol et du mélange de β - and γ -terpinéols ont été récupérés au niveau du duodénum. L'accroissement du pourcentage de concentrés a diminué uniquement le taux de récupération de l' α -terpinéol.

Discussion et Conclusion :

La dégradation ruminale du NDF est généralement diminuée par l'augmentation du pourcentage de concentrés. La différence entre notre essai et la littérature s'explique certainement par la forte teneur des régimes en pulpe de betterave (riche en fibres rapidement fermentescibles). Le fait qu'aucun changement de production du *trans*-11 C18:1 vers le *trans*-10 C18:1 n'ait été observé, suggère une possible différence entre la chèvre et la vache laitières, en termes de populations microbiennes et / ou de sensibilité aux changements des conditions ruminales liées aux régimes. Les terpènes utilisés ont subi une forte dégradation dans le rumen, mais le pourcentage de concentrés a eu très peu d'effet sur cette dégradation.

Effects of the dietary percentage of concentrate on fiber, starch and fatty acid flows in the duodenum and on ruminal biotransformation of monoterpenes in mid-lactation goats

A. Serment,^{a,b,*} L. P. Broudiscou,^{a,b} D. Sauvant,^{a,b} and, P. Schmidely,^{a,b}

^a AgroParisTech, UMR791 Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, 16 rue Claude Bernard, F-75005 Paris, France

^b INRA, UMR791 Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, 16 rue Claude Bernard, F-75005 Paris, France

* Corresponding author: Amélie Serment
tel.: 33 1 44 08 17 66 fax: 33 1 44 08 18 53
E-mail address: amelie.serment@agroparistech.fr

En préparation pour Journal of Dairy Science

Running Head**NUTRIENT FLOWS IN THE DUODENUM IN GOATS****Interpretive Summary**

Nutrient flows in the duodenum in goats. Serment. The proportion of concentrate in dairy goat rations has increased in recent years to achieve an increase in milk production, necessary to respond to the increase in European consumption of goat milk products. However this dietary factor may have adverse effects on digestion. The aim of this work was to study the effect of high-concentrate diets on duodenal flows of dry and organic matter, fiber, starch and fatty acids and on the ruminal degradation of four monoterpenes. Such a study is essential because of the relationship between duodenal contents and milk quality.

ABSTRACT

The aim of this work was to study the effects of the dietary percentage of concentrate on duodenal flows of dry and organic matter, fiber, starch and fatty acids (FA) in dairy goats. A second objective was to study the consequences of this experimental factor on the ruminal degradation of four monoterpenes. This kind of data is scarce in dairy cows, and doesn't exist in dairy goats. Twelve ruminally and duodenally cannulated dairy goats (121 ± 4 d in milk), fed *ad libitum*, were used in a 3-week experiment. Goats were assigned to one of two dietary treatments: high-concentrate (70% concentrate on dry matter basis) or a low-concentrate (35%) total mixed ration. All goats received through rumen cannula a terpene blend, consisting of 33.3, 33.3, 25.1 and 8.2 mol / 100 mol terpene for β -pinene, p-cymene, α -terpineol and a blend of β - and γ -terpineols, respectively. The terpenes of the blend were selected because they differ in structure and in *in vitro* apparent degradability. The increase in dietary percentage of concentrate increased rumen digestibility of dry matter and organic matter by 129% and 120%, respectively. It tended to increase rumen digestibility of neutral detergent fiber but didn't modify the digestibility of acid detergent fiber (0.45) and starch (0.87). Duodenal flow of total FA represented 118 and 167% of total FA intake for goats fed the H diet and the L diet, respectively. Ruminal biohydrogenation of *cis*-9 C18:1 and *cis*-9, *cis*-12 C18:2 was increased by the percentage of concentrate, which is in contradiction with the literature in dairy cows and ewes. The increase in percentage of concentrate increased the proportion of total *trans*-C18:1 in duodenal contents. No shift in the production of *trans*-11 C18:1 to *trans*-10 C18:1 was observed and *trans*-10, *cis*-12 C18:2 was not detected. On average, 24.3, 21.8, 7.8 and 5.3 mol / 100 mol of the ingested amounts of β -pinene, p-cymene, α -terpineol and, β and γ -terpineols were recovered in the duodenum. The increase of the percentage of concentrate decreased only the recovery rate of the α -terpineol. The mean terpene composition of duodenal digesta was slightly different from the dietary blend.

Key words: dairy goat, duodenal flow, fatty acid, monoterpene

INTRODUCTION

High-concentrate diets are frequently used to intensify milk production in dairy cows (Yang and Beauchemin, 2007; Agle et al., 2010) and goats (Desnoyers et al., 2008; Serment et al., 2011), associated with a decrease in milk fat content and changes in milk fatty acid (FA) secretion (Chilliard et al., 2007). In fact, high-concentrate diets modify microbial ecosystems (Brown et al., 2006) and microbial enzymatic activities (Hristov et al., 2001; Martin et al., 2001). High-concentrate diets also change ruminal physico-chemical conditions, with a decrease in ruminal pH and in acetate to propionate ratio (Serment et al., 2011). As a consequence, it reduces ruminal degradation of fiber (Archimède et al., 1997), ruminal lipolysis of plant lipids and biohydrogenation of dietary polyunsaturated FA (Glasser et al., 2008b), which increased duodenal flows of *trans*-FA and conjugated linoleic acid (CLA) and altered duodenal profile of *trans*-FA (Glasser et al., 2008b; Lourenço et al., 2010). Consequently, milk FA composition may be affected (Glasser et al., 2008a). Ruminal degradation of some dietary components, such as terpenes, a major class of plant secondary metabolites, may be also affected by changes in ruminal conditions and in ruminal ecosystem function induced by high-concentrate diets as observed *in vitro* (Malecky and Broudiscou, 2009). To our knowledge, simultaneous determination of data of duodenal flows of NDF, ADF, starch, and FA in response to percentage of concentrate is scarce in dairy cows (Kalscheur et al., 1997; Khorasani et al., 2001; Ueda et al., 2003; Looor et al., 2004) and there is no published data in dairy goats.

The first objective of this trial was to characterize the effects of the dietary percentage of concentrate on duodenal flows of dry and organic matter, fiber, starch and FA in dairy goats. A second objective was to study the effect of dietary percentage of concentrate on the ruminal degradation of four monoterpenes, which were considered as markers of the activity of the ruminal system to degrade dietary components.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Experimental Design

Goats were cared and handled in accordance with the French legislation on animal experimentation in line with the *European Convention for the Protection of Vertebrates used for Experimental and other Scientific Purposes* (European Directive 86/609). Twelve Saanen or Alpine goats were used in a 10-wk trial. The goats were fitted with a ruminal cannula and a T-type duodenal cannula, and trial started 10 wk after their surgical cannulation. This article focused only a 3-wk digestibility period (wks 5-7), as other parts of the trial were described elsewhere (Serment et al., 2011; Serment and Giger-Reverdin, 2012). At wk 5, the animals were 121 ± 4 DIM, with a body weight equal to 64 ± 6 kg, with 3.6 ± 0.67 kg/d of raw milk yield (RMY), a MFC of 36.5 ± 8.69 g/kg and a MPC of 31.6 ± 2.36 g/kg. From wk 5 to 7, the goats were housed in individual metabolic crates with wooden floor.

All goats were fed *ad libitum* (approximately 10% of refusals) a total mixed ration (**TMR**). They were fed either a high-concentrate diet (**H**, 70% of concentrate/DM, n=6 goats), or a low-concentrate diet (**L**, 35% of concentrate/DM, n=6). The ingredients of the TMR were given in Serment et al. (2011) and their chemical composition is presented in Table 1. Feed was offered individually twice a day at 08:00 and 16:00 h, after milking, in the proportion of two thirds in the afternoon and one third in the morning, according to the time interval between milkings. Sample of feed were oven-dried at 87°C for 24 h and ground through a 1-mm sieve before being analyzed.

Table 1: Chemical composition of low- (L) and high- (H) concentrate diets during period of duodenal sampling.

	Diet	
	L	H
g/100 g of DM ¹		
MO	91.9	91.5
NDF	49.9	36.9
ADF	28.6	19.4
Acid detergent lignin	5.4	3.1
Starch	4.38	9.70
Total fatty acid	2.33	2.81
Fatty acid composition (mg/100 g of total FA)		
C _{14:0}	1.04	0.34
C _{15:0}	0.36	0.22
C _{16:0}	37.3	16.4
C _{18:0}	4.50	3.41
<i>cis</i> -9 C _{18:1}	23.5	29.2
<i>cis</i> -(9,12) C _{18:2}	17.3	33.1
<i>cis</i> -(9,12,15) C _{18:3}	9.15	10.43
Others FA	6.89	6.90

¹ n = 1 for analysis of NDF, ADF, acid detergent lignin, MO and starch, n = 2 for FA contents.

Terpene Distribution

From wk 5 to 7, goats received a terpene blend just before every meal at a dose of 0.1 mL / kg of DMI. To obtain a better precision on the distributed quantity of terpenes, the blend was directly injected through rumen cannula, rather distributed orally. Composition of the terpene blend is described in Table 2. The terpenes were selected because of their differences in structure and in *in vitro* apparent degradability (Broudiscou et al., 2007; Malecky et al., 2009b). All compounds were of chromatographic grade and were supplied by Roth-Sochiel SARL (Lauterbourg, France).

Table 2: Characteristics and distribution of the terpene blend.

	CAS #	Density	Molecular weight g / mol	Blend composition (mol / 100 mol terpene)	Distributed dose (μ mol / kg DMI)
β -pinene ¹	127-91-3	0.86	136.2	33.3	208.2
p-cymene ²	99-87-6	0.86	134.2	33.3	208.2
α -terpineol ³	98-55-5	0.93	154.2	25.1	156.8
β -terpineol ⁴ + γ -terpineol ⁵	138-87-4 + 586-81-2	0.93	154.2	8.2	51.4

¹ (1S,5S)-6,6-dimethyl-2-methylenbicyclo [3.1.1] heptane

² 1-methyl-4-(propan-2-yl) benzene

³ 2-(4-methyl-1-cyclohex-3-enyl) propan-2-ol

⁴ 1-methyl-4-prop-1-en-2-ylcyclohexan-1-ol

⁵ 1-methyl-4-propan-2-ylidenecyclohexan-1-ol

Duodenal Nutrient Flow

Chromium oxide (Cr₂O₃, Prolabo, Paris, France) packaged in gelatin capsule (Société LGA, Bandol, France) was used as a marker to measure duodenal flows. The marker was administrated through the rumen cannula at every meal at a dose of 2.4 g / d for 21 days (wk 5 to 7). Marker equilibrium in digestive tract was obtained during wk 5, feces were sampled to measure the daily fecal Cr₂O₃ flow during wk 6, and duodenum content were sampled during wk 7. Before distribution of the marker, feces and duodenal contents were sampled to have a standard for Cr₂O₃ analysis.

In wk 6, feed offered, refusals, and total feces were weighed during 5 consecutive days. Aliquots of refusals and feces were sampled daily. At the end of the week, they were pooled by goat, dried in air-oven at 87°C for 24 h, and ground through a 1-mm sieve before analyses. In wk 7, approximately 60 mL of duodenal contents were sampled twelve times per goat with 6 or 8-hour time interval during 3 days to provide an overall sample representative of duodenal content throughout the nycthemeron. Five mL of each sample (12 samples by goat) were immediately stored at -20°C in airtight vials until analysis of terpene concentration. Remaining duodenal samples were stored at -20°C and were then freeze-dried. These samples were pooled by goat before determination of Cr₂O₃, OM, NDF, ADF, starch and FA contents and FA profile.

Analytical Procedures

DM contents of TMR and refusals were determined by oven-drying at 103°C for 24 h. The TMR, refusals and duodenal contents were analyzed for NDF (Van Soest et al., 1991) using heat-stable α -amylase without sodium sulfite and decalin. The content of ADF was obtained using a sequential approach on the NDF residue (Giger et al., 1987). Ash and starch contents were analyzed according to ISO (1978) and AFNOR (1997) methods, respectively. Determination of Cr₂O₃ in feces and duodenal content was done by atomic absorption spectrophotometry according to Christian and Coup (1954) and Williams et al. (1962). FA contents and profiles of TMR and duodenal contents were determined according to a

modification of the procedure of Bas et al. (2003) described in Berthelot et al. (2012). The extraction and the analysis of the terpenes in duodenal samples were described by Malecky et al (2009a).

Calculations and Statistical Analysis

Daily duodenal DM flow was calculated by dividing the flow of Cr excreted in feces by duodenal Cr concentration (DM basis). Duodenal OM, NDF, ADF, starch and fatty acid flows was calculated by multiplying duodenal DM flow by OM, NDF, ADF, starch or FA content in duodenal samples. Ruminal digestibility of DM, OM, NDF, ADF and starch was determined by subtracting the intake of the constituent from its duodenal flow and expressed as a percentage of the intake. Terpene concentrations in duodenal samples were averaged by goat and duodenal terpene flows were calculated by multiplying mean terpene concentration in duodenal samples by duodenal DM flows. Because results of analysis of OM, NDF and ADF were aberrant for a goat fed the H diet, these data were deleted from the statistical analysis.

Extent of ruminal biohydrogenation was estimated for *cis*-9 C18:1, *cis*-9, *cis*-12 C18:2 and *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3 by the following calculation (Wu et al., 1991):

$$\text{BH}_2 (\%) = 100 - 100 * (\text{Individual C18 unsaturated FA} / \text{Total C18 in digesta}) / (\text{Individual C18 unsaturated FA} / \text{Total C18 in feed})$$

All data were analyzed by analysis of variance using the GLM procedure of SAS (SAS Institute, 2000):

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

where Y_{ij} is the response variable, μ the overall mean, α_i the fixed effect of the percentage of concentrate (1 df) and ε_{ij} the random residual error.

All data presented in this paper are least square means \pm SEM.

RESULTS

Intake, Duodenal Flows and Digestibility of DM, OM, fiber and starch

The DMI tended to be higher for goats fed the H diet than for goats fed the L diet (Table 3). The percentage of concentrate had no effect on OM and NDF intake (Table 3). Intake of starch (Table 3) was more than doubled in goats fed the H diet than in those fed the L diet, whereas intake of ADF (Table 3) was decreased by 21%.

The percentage of concentrate reduced the duodenal flows of NDF and ADF, by 24 and 25%, respectively, whereas it increased the duodenal flow of starch by 84% (Table 3).

Apparent ruminal digestibility of DM and OM was higher in goats fed the H diet than in those fed the L diet (Table 3). Ruminal digestibility of NDF tended to be higher in goats fed the H diet than in those fed the L diet, whereas ruminal digestibility of ADF and starch was not modified (Table 3) by dietary treatments.

Table 3: Daily intake, duodenal flows, apparent ruminal digestibility of DM, OM, NDF, ADF and starch, of dairy goats fed low- (L) and high- (H) concentrate diets.

	Diet		SEM	P-value
	L ¹	H ²		Concentrate ³
Daily intake (g / d):				
DM	2601	3038	136.8	0.10
OM	2385	2659	109.0	0.20
NDF	1224	1051	57.9	0.12
ADF	695	547	37.8	0.03
Starch	134	306	28.0	<0.001
Duodenal flows (g / d):				
DM	1586	1527	82.4	0.73
OM	1282	1193	73.5	0.55
NDF	615	467	37.3	0.03
ADF	394	295	24.6	0.03
Starch	20.2	37.2	3.56	0.005
Ruminal digestibility (% of intake):				
DM	38.7	49.8	2.55	0.01
OM	46.0	55.4	2.35	0.03
NDF	49.6	55.7	1.76	0.06
ADF	43.1	46.2	1.93	0.42
Starch	85.1	87.9	0.90	0.12

¹ n = 5 for OM, NDF and ADF data; n = 6 for other data.

² n = 6.

³ Effect of the percentage of concentrate.

Intake, Composition of Duodenal Contents and Duodenal Flows of FA

Compared to goats fed the L diet, those fed the H diet had higher intakes of total FA (+ 36%), *cis*-9 C18:1 (+ 75%), *cis*-9, *cis*-12 C18:2 (+ 169%) and *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3 (+ 61%), while they had lower intake of C16:0 (- 38%) (Table 4).

Duodenal flow of total FA was higher than total FA intake and was not modified by the percentage of concentrate (Table 4). The duodenal flows and the proportions of C18:0 and *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3 in duodenal FA were not modified by the dietary treatments (Table 4 and Table 5). The proportion of *cis*-9 C18:1 was higher in goats fed the H diet than in those fed the L diet (Table 5). The proportion of *cis*-9, *cis*-12 C18:2 in duodenal FA was higher and its duodenal flow tended to be higher in goats fed the H diet than in those fed the L diet, whereas and the duodenal flow and the proportion of C16:0 in duodenal FA were almost halved (Table 4 and Table 5). Ruminal biohydrogenation of *cis*-9 C18:1 and *cis*-9, *cis*-12 C18:2 was higher in goats fed the H diet than in those fed the L diet (Table 4).

Duodenal flows of *cis*-11 to *cis*-13 C18:1, of each *trans*-C18:1 isomer and of *trans*-11, *cis*-15 C18:2 and their proportion in duodenal FA were higher or tended to be higher in goats fed the H diet than in those fed the L diet (Table 4 and Table 5). The *trans*-11 C18:1 was the principal isomer: its duodenal flow was more than doubled in goats fed the H diet (Table 4). Duodenal flows of *cis*-9, *trans*-11 C18:2 and *trans*-9, *trans*-11 C18:2 and their proportion in duodenal FA were not modified by the percentage of concentrate (Table 4 and Table 5). The

trans-10, *cis*-12 C18:2 was not detected in this study in duodenal contents. Duodenal flows of odd and branched-chain FA were not affected by the percentage of concentrate (Table 4).

Table 4: Daily intake, duodenal flows of fatty acids and ruminal biohydrogenation¹ of fatty acids with 18 atoms of carbon of dairy goats fed low- (L) and high- (H) concentrate diets.

Item	Diet		SEM	P-value
	L	H		Concentrate ²
Daily intake (g / d)				
Total Fatty Acids	60.5	85.4	4.91	0.008
C _{14:0}	0.63	0.29	0.057	<0.001
C _{15:0}	0.22	0.19	0.010	0.17
C _{16:0}	22.6	14.0	1.59	<0.001
C _{18:0}	2.72	2.91	0.123	0.45
<i>cis</i> -9 C _{18:1}	14.2	24.9	1.87	<0.001
<i>cis</i> -(9,12) C _{18:2}	10.5	28.3	2.93	<0.001
<i>cis</i> -(9,12,15) C _{18:3}	5.54	8.91	0.609	<0.001
Duodenal flows (g / d)				
Total Fatty Acids	101	101	6.15	0.99
C _{14:0}	0.85	0.56	0.061	0.004
C _{15:0}	0.86	0.85	0.056	0.90
iso-C _{15:0}	0.52	0.41	0.035	0.11
anteiso-C _{15:0}	0.76	0.90	0.064	0.28
C _{16:0}	26.49	13.06	2.433	<0.001
iso-C _{16:0}	0.17	0.20	0.016	0.37
<i>cis</i> -9 C _{16:1}	0.18	0.17	0.014	0.93
C _{17:0}	0.48	0.47	0.028	0.87
iso-C _{17:0}	0.23	0.19	0.017	0.27
C _{18:0}	37.36	39.81	2.780	0.67
<i>trans</i> -4 C _{18:1}	0.15	0.20	0.012	0.02
<i>trans</i> -5 C _{18:1}	0.11	0.15	0.009	0.01
<i>trans</i> -6, <i>trans</i> -7 and <i>trans</i> -8 C _{18:1}	0.81	1.32	0.105	0.003
<i>trans</i> -9 C _{18:1}	0.49	0.78	0.062	0.005
<i>trans</i> -10 C _{18:1}	0.83	1.39	0.112	0.003
<i>trans</i> -11 C _{18:1}	4.61	10.49	1.151	0.002
<i>trans</i> -12 C _{18:1}	0.78	1.39	0.130	0.007
<i>cis</i> -6 and <i>trans</i> -13 and <i>trans</i> -14 C _{18:1}	1.63	2.83	0.269	0.01
<i>trans</i> -15 C _{18:1}	0.78	1.16	0.104	0.04
<i>trans</i> -16 C _{18:1}	0.67	0.99	0.091	0.06
<i>cis</i> -9 C _{18:1}	9.78	7.95	0.676	0.17
<i>cis</i> -11 C _{18:1}	0.58	0.85	0.062	0.02
<i>cis</i> -12 C _{18:1}	0.54	1.19	0.139	0.006
<i>cis</i> -13 C _{18:1}	0.06	0.09	0.008	0.07
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 C _{18:2}	6.51	8.56	0.576	0.06
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -12 C _{18:2}	0.12	0.17	0.015	0.09
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 C _{18:2}	0.15	0.17	0.017	0.63
<i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15 C _{18:2}	0.27	0.38	0.027	0.03
<i>trans</i> -9, <i>trans</i> -11 C _{18:2}	0.02	0.02	0.001	0.60
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 C _{18:3}	2.43	2.48	0.143	0.88

Table 4 (continued)

Item	Diet		SEM	P-value
	L	H		Concentrate ²
C _{20:0}	0.42	0.42	0.028	0.97
C _{22:0}	0.23	0.23	0.017	0.98
Unidentified FA	1.31	1.51	0.094	0.29
Saturated (S)	68.44	57.15	4.358	0.19
∑ <i>trans</i> C _{18:1} + <i>cis</i> -6 C _{18:1}	10.86	20.71	1.876	<0.001
Monounsaturated (M)	22.00	30.97	2.204	0.02
Polyunsaturated (P)	9.58	11.86	0.754	0.12
Ruminal biohydrogenation ¹ (%)				
<i>cis</i> -9 C _{18:1}	66.4	73.6	1.53	0.007
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 C _{18:2}	69.5	75.1	1.11	0.002
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 C _{18:3}	78.4	77.1	0.55	0.20

¹ BH₂ (%) = 100 - 100* (Individual C18 unsaturated FA / Total C18 in digesta) / (Individual C18 unsaturated FA / Total C18 in feed).

² Effect of the percentage of concentrate.

Table 5: FA profile of duodenal lipids of dairy goats fed low- (L) and high- (H) concentrate diets.

Item	Diet		SEM	P-value
	L	H		Concentrate ¹
	% total fatty acids			
C _{14:0}	0.84	0.56	0.052	<0.001
C _{15:0}	0.86	0.83	0.025	0.62
iso-C _{15:0}	0.51	0.40	0.024	0.005
anteiso-C _{15:0}	0.76	0.88	0.033	0.05
C _{16:0}	26.05	12.91	2.082	<0.001
iso-C _{16:0}	0.17	0.20	0.009	0.15
<i>cis</i> -9 C _{16:1}	0.17	0.17	0.008	0.82
C _{17:0}	0.47	0.46	0.007	0.30
iso-C _{17:0}	0.22	0.19	0.008	0.01
C _{18:0}	37.16	38.75	0.980	0.42
<i>trans</i> -4 C _{18:1}	0.15	0.20	0.011	0.007
<i>trans</i> -5 C _{18:1}	0.11	0.15	0.008	0.001
<i>trans</i> -6, <i>trans</i> -7 and <i>trans</i> -8 C _{18:1}	0.80	1.32	0.087	<0.001
<i>trans</i> -9 C _{18:1}	0.48	0.77	0.049	<0.001
<i>trans</i> -10 C _{18:1}	0.81	1.40	0.103	<0.001
<i>trans</i> -11 C _{18:1}	4.56	10.54	1.150	0.001
<i>trans</i> -12 C _{18:1}	0.77	1.36	0.101	<0.001
<i>cis</i> -6 and <i>trans</i> -13 and <i>trans</i> -14 C _{18:1}	1.62	2.78	0.209	<0.001
<i>trans</i> -15 C _{18:1}	0.76	1.14	0.070	<0.001
<i>trans</i> -16 C _{18:1}	0.67	0.96	0.055	<0.001
<i>cis</i> -9 C _{18:1}	9.51	7.95	0.375	0.02
<i>cis</i> -11 C _{18:1}	0.57	0.85	0.049	<0.001
<i>cis</i> -12 C _{18:1}	0.53	1.16	0.017	<0.001
<i>cis</i> -13 C _{18:1}	0.06	0.09	0.006	0.01
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 C _{18:2}	6.37	8.51	0.375	<0.001
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -12 C _{18:2}	0.12	0.16	0.009	0.002
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 C _{18:2}	0.15	0.17	0.013	0.40
<i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15 C _{18:2}	0.27	0.38	0.024	0.004
<i>trans</i> -9, <i>trans</i> -11 C _{18:2}	0.02	0.01	0.003	0.24
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 C _{18:3}	2.39	2.47	0.053	0.45
C _{20:0}	0.42	0.41	0.012	0.77
C _{22:0}	0.22	0.22	0.011	0.98
Unidentified FA	1.28	1.51	0.058	0.03
Saturated (S)	67.76	55.87	2.065	<0.001
∑ <i>trans</i> C _{18:1} + <i>cis</i> -6 C _{18:1}	10.73	20.61	1.655	<0.001
Monounsaturated (M)	21.58	30.84	1.634	<0.001
Polyunsaturated (P)	9.38	11.79	0.438	<0.001

¹ Effect of the percentage of concentrate.

Composition of Duodenal Contents and Duodenal Flows of Terpenes

Molar composition of terpenes in duodenal contents (Table 6) was slightly modified compared with initial terpene blend composition (Table 2): the proportions of β -pinene and p-cymene were increased whereas the proportions of α -terpineol and β + γ -terpineol were decreased (Table 6). In average, 24.3, 21.8, 7.8 and 5.3 mol / 100 mol of the ingested amounts of β -pinene, p-cymene, α -terpineol and β + γ -terpineol were recovered in the duodenum. The effect of the percentage of concentrate on duodenal terpene composition and flows was generally non significant (Table 6). However, recovery rate of α -terpineol was lower in goats fed the H diet than in those fed the L diet.

Table 6: Molar composition of duodenal terpenes, daily intake, duodenal flows and recovery rate of terpenes in dairy goats fed low- (L) and high (H) concentrate diets receiving through the rumen cannula 0.1 mL / kg DMI of a terpene blend.

	Diet		SEM	P-value
	L	H		Concentrate ¹
Terpene distributed through rumen cannula (mg / d)				
β -pinene	541	633	28.5	0.10
p-cymene	541	633	28.5	0.10
α -terpineol	408	476	21.5	0.10
β + γ -terpineols	134	156	7.0	0.10
Molar composition of duodenal contents (mol / 100 mol of total terpenes)				
β -pinene	44.6	45.4	1.68	0.80
p-cymene	39.3	41.5	0.48	0.01
α -terpineol	13.8	10.4	1.59	0.29
β + γ -terpineols	2.31	2.71	0.339	0.56
Duodenal flow of terpene (mg / d):				
β -pinene	140	142	16.2	0.94
p-cymene	121	133	11.4	0.63
α -terpineol	38.7	29.9	3.30	0.18
β + γ -terpineols	6.41	9.12	1.660	0.42
Recovery rate (% intake)				
β -pinene	26.1	22.4	2.72	0.50
p-cymene	22.5	21.0	1.74	0.67
α -terpineol	9.38	6.30	0.699	0.01
β + γ -terpineols	4.75	5.81	0.969	0.59

¹ Effect of the percentage of concentrate.

DISCUSSION

Representativeness of data

Data presented in this article correspond only to a 3-week period of a 10-week trial (Serment et al., 2011). Although the animals were housed in individual metabolism crates for determination of diet digestibility instead of individual pens for the other part of the trial (Serment et al., 2011), DMI (2.68 and 2.98 ± 0.105 kg/d for the goats fed the L diet and the H diet, respectively, in Serment et al., 2011) was in the same range than during the whole trial.

Chromium oxide was chosen as a marker of duodenal flows in our study because this method is cheap and easy to use compared to other methods (Titgemeyer, 1997). This method is currently used in studies dealt with nutrient duodenal flows (Kalscheur et al., 1997; Kucuk et al., 2001; Lehloenya et al., 2008; Amorocho et al., 2009). However, estimation of duodenal flows by Cr_2O_3 was considered as imperfect because it is not a marker of the liquid phase nor of the solid phase (Faichney, 1975) and it doesn't seem to mix completely with the ruminal content (Corbett et al., 1959). However, NDF, ADF and starch duodenal flows in this study are in reasonable ranges compared to other ruminants (see below).

DM, OM, fiber and starch digestion

The ruminal digestion of OM and starch were in accordance with values from a meta-analysis of the literature of Archimède et al. (1997): 45.2 ± 11.2 (n = 553), and 74.1 ± 16.2 (n = 140), respectively. The ruminal digestion of NDF and ADF are comparable with values of Ramos et al. (2009) in sheep.

Apparent ruminal digestibility of DM and OM is generally increased by high dietary percentage of concentrate, whereas ruminal digestibility of fiber is decreased (Archimède et al., 1997). In this study, apparent ruminal digestibility of DM and OM was increased but ruminal digestibility of NDF tended to be increased by the percentage of concentrate. Reduced ruminal NDF digestibility has been generally attributed to reduced ruminal pH which inhibits activity of cellulolytic bacteria (Martin et al., 2001; Brossard et al., 2006). In this study, ruminal pH was significantly reduced by high percentage of concentrate, with a minimal ruminal pH 5.63 ± 0.211 for goats fed the H diet and 6.15 ± 0.161 for those fed the L diet (Serment et al., 2011). Moreover, *in sacco* degradability of NDF of grass hay was lower with H than with L diet (Serment et al., 2011). This discrepancy between these results and the present data can be related to the higher proportion of sugar beet pulp silage in the H diet when compared to the L diet (20 vs. 7% of DM, respectively). Sugar beet pulp silage contains high amounts of pectins and NDF content of sugar beet pulp silage is equal to 48% of the DM (INRA-AFZ, 2004). The NDF in beet pulp can be digested more quickly than forage NDF (Bhatti and Firkins, 1995) and contrary to starch, pectin fermentation does not inhibit cellulose and hemicelluloses digestion (Voelker and Allen, 2003). As a consequence, sugar beet pulp may improve the ruminal NDF digestibility (Huhtanen, 1988; Voelker and Allen, 2003).

Fatty Acids Flows

FA balance between intake and duodenum flow. Duodenal flow of total FA represented 118 and 167% of total FA intake for goats fed the H diet and the L diet, respectively. From a meta-analysis of the literature, Schmidely et al. (2008) determined a recovery rate of total FA at the duodenum between 84 and 94% when total FA intake varied between 50 and 120 g / kg DMI which is out of the range of our diets with a low FA content (23 to 28 g FA / kg DMI). In this low range of FA content, no consistent relationship between duodenal flow of total FA and intake of FA were reported (Schmidely et al., 2008). In agreement with our results, positive FA balances between intake and duodenum (between 110 and 135% of total FA intake) were previously reported in dairy cows fed diets, providing approximately 20 g FA / kg DMI (Loor et al., 2004) or 40 g FA / kg DM (Kalscheur et al., 1997). Positive balance of goats fed the H diet was in this range, but the reason for the very high value of FA balance in goats fed the L diet is not obvious. Positive balance of FA between the duodenum and the intake may be explained by microbial *de novo* synthesis occurring in the rumen (Doreau and Chilliard, 1997), however no relationship between FA balance and bacterial flow of FA to the duodenum was established (Schmidely et al., 2008). Odd- and branched-chain FA form a part of the FA synthesized by rumen microbes (Bas et al., 2003; Vlaeminck et al., 2006). Odd-chain FA (C15:0 and C17:0) are synthesized from elongation of propionate or valerate, while branched-chain FA (iso-FA and anteiso-FA) are formed from branched-chain amino acids and their corresponding branched-chain volatile fatty acids (isobutyrate, isovalerate) (Vlaeminck et al., 2006). Vlaeminck et al. (2006) and Bas et al. (2003) showed that iso, ante-iso and linear odd-chain FA bacterial synthesis was decreased by high concentrate diets. The effect of the percentage of concentrate on branched- and linear odd-chain FA in duodenum contents was not uniform across studies. Loor et al. (2004) showed decreased duodenal flows of branched-chain FA (iso C14:0, iso C16:0) and of some odd-chain FA (C15:0, *cis*-10 C15:1) but no change in iso-C15:0, anteiso C15:0 and C17:0. Dewhurst et al. (2007) showed increased duodenal flows of branched-chain FA (iso C15:0, iso C17:0, anteiso C15:0) and of some odd-chain FA (C17:0) with high-concentrate diets. In our study, duodenal flows of odd- and branched-chain FA were not modified by the percentage of concentrate. Discrepancies between studies are certainly due to differences in ruminal production of VFA, precursors of these FA. These results were given in Serment et al. (2011). The contribution of odd- and branched-chain FA to positive balance of FA between the duodenum and the intake was small (on average 3.1 g / d), which may not account for the difference in FA balance between goats fed the H diet and those fed the L diet.

Biohydrogenation of PUFA. High-concentrate diets generally reduce ruminal biohydrogenation of *cis*-9 C18:1, *cis*-9, *cis*-12 C18:2 and *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3 in dairy cows (Kalscheur et al., 1997; Loor et al., 2004) and in ewes (Kucuk et al., 2001). High-concentrate diets are often associated to low ruminal pH, which are known to reduce dietary lipid hydrolysis is, the step before biohydrogenation (Van Nevel and Demeyer, 1996), and to slow down or reduce biohydrogenation (Van Nevel and Demeyer, 1996; Troegeler-Meynadier et al., 2003). However, in our study, biohydrogenation of *cis*-9 C18:1 and *cis*-9, *cis*-12 C18:2 was increased in goats fed the H diet compared to those fed the L diet. The difference

between our results and the literature may be explained by the nature of the concentrate (sugar beet pulp) and the low dietary content in starch.

Intermediates of FA biohydrogenation. Dietary percentage of concentrate alters profiles of C18:1, C18:2 and C18:3 intermediates flowing to the small intestine. Contrary to studies in dairy cows (Piperova et al., 2002; Loor et al., 2004) or ewes (Kucuk et al., 2001), only *cis*-9, *trans*-11 was detected as CLA and no *trans*-10, *cis*-12 C18:2 flow was detected in this study. Moreover, the high-concentrate diet supported the highest duodenal flow of *trans*-11 C18:1 but not *trans*-10 C18:1. This indicates that feeding high-concentrate diet in goats did not induce a shift of rumen biohydrogenation toward *trans*-10, *cis*-12 C18:2 and *trans*-10 C18:1 production contrarily to data in dairy cows (Shingfield and Griinari, 2007). Indeed, high duodenal flows of *trans*-10, *cis*-12 C18:2 and *trans*-10 C18:1 were observed in dairy cows fed diets with high dietary starch (Piperova et al., 2002) and / or with high polyunsaturated FA concentration (Loor et al., 2005). In dairy goats fed diets combining high-starch concentration (23% DM) and free oil (4.4% DM), *trans*-10, *cis*-12 remained not detectable in milk, and *trans*-10 C18:1 was below 0.7% of total FA (and 6% of total *trans*-C18:1) (Ollier et al., 2009), which contrasts with data observed in cows. This may suggest differences for ruminal polyunsaturated FA biohydrogenation pattern between goats and cows in response to dietary concentrate. It may be related to difference in microbial population (De La Fuente et al., 2006; Moon et al., 2010) and / or sensitivity to changes in ruminal conditions induced by high-concentrate diets. Differences observed in FA duodenal flows seem in accordance with milk composition in FA (Serment et al., 2011).

Terpene Flows

In this study, four monoterpenes were considered as markers of activity of the ruminal system in its ability to degrade dietary components. Addition of this blend was hypothesized to have no effect on ruminal function described in Serment et al (2011) and in this paper. This hypothesis refers to the study of Malecky et al (2009a) who found no effect of the addition of 0.05 or 0.5 mL / kg DMI of a terpene blend composed of linalool, p-cymene, α -pinene and β -pinene, on ruminal fermentation characteristics, dietary constituent degradability or milk production and milk quality in dairy goats. To our knowledge, no similar study exists for α , β and γ -terpineols in the literature. However *in vitro* anti-microbial activity of terpineols are comparable to linalool's one (Dorman and Deans, 2000). Consequently, terpineols should have no effect on ruminal function.

In the present study, β -pinene recovery rate was in accordance with data of Malecky et al. (2009a), who reported an *in vivo* recovery rate of 23.5% with a dietary NDF content equal to 44 g / 100 g of DM. Difference in β -pinene between the H and L diets was not significant, whereas a positive effect of the NDF content on the β -pinene degradability was observed *in vitro* by Malecky and Broudiscou (2009). *In vivo* recovery rate of p-cymene was around 22% and it was not affected by percentage of concentrate. Our values are much higher than those (3.5%) reported by Malecky et al. (2009a). This difference is probably due to variation in activity of ruminal microbes, because other escape routes than microbial degradation, eructation for example, were possible in both trials. Our results for p-cymene are however

close to *in vitro* recovery rate (35.3%) observed by Malecky et al. (2009b). To our knowledge, no recovery rate of β and γ -terpineols was reported in the literature. Malecky et al. (2009b) observed an *in vitro* α -terpineol recovery rate equal to 82.5% which is largely higher than our *in vivo* results. This difference can be due to possible *in vivo* escape routes. These molecules are slightly soluble which could allow their passage through the rumen wall into the blood system and an exposure to the anaerobe facultative microflora colonizing rumen papillae.

CONCLUSIONS

This study evaluated the effect of the dietary percentage of concentrate on dairy goats on duodenal flows of FA and terpenes. Feeding high-concentrate and low-concentrate diets resulted in positive FA balance between intake and duodenum. Feeding high-concentrate diet increased the proportion of total *trans*-C18:1 in duodenal contents. No shift in the production of *trans*-11 C18:1 to *trans*-10 C18:1 was observed, which suggests possible difference with usual response observed with dairy cows. All four terpenes appeared to undergo extensive degradation in the rumen, but the effect of the percentage of concentrate was very low.

ACKNOWLEDGMENTS

J. Teissier, A. Eymard, G Durandet, J.-P. Bonte, J. Chevallier and A. Severin (UMR 791 INRA-AgroParisTech, Grignon, France) are gratefully acknowledged for obtaining research data on goats. We thank O. Dhumez and L. Péricard (UMR 791 INRA-AgroParisTech, Paris, France) for the analysis of the samples. Pr. F. Enjalbert and M.-L. Chemit (UMR 1289 INRA-INP/ENSAT-ENVT, Toulouse, France) are gratefully acknowledged for the determination of chromic oxide in samples by atomic absorption spectrophotometry.

REFERENCES

- AFNOR. 1997. V18-121. Aliments des animaux. Détermination enzymatique de la teneur totale en amidon. Association française de normalisation (AFNOR), La Plaine Saint-Denis, France. 9 pp.
- Agle, M., A. N. Hristov, S. Zaman, C. Schneider, P. M. Ndegwa, and V. K. Vaddella. 2010. Effect of dietary concentrate on rumen fermentation, digestibility, and nitrogen losses in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:4211–4222.
- Amorocho, A. K., T. C. Jenkins, and C. R. Staples. 2009. Evaluation of catfish oil as a feedstuff for lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 92:5178-5188.
- Archimède, H., D. Sauvant, and P. Schmidely. 1997. Quantitative review of ruminal and total tract digestion of mixed diet organic matter and carbohydrates. *Reprod. Nutr. Develop.* 37:173-189.
- Bas, P., H. Archimède, A. Rouzeau, and D. Sauvant. 2003. Fatty acid composition of mixed-rumen bacteria: effect of concentration and type of forage. *J. Dairy Sci.* 86:2940-2948.
- Berthelot, V., P. Albarello, P. Bas, and L. P. Broudiscou. 2012. Effects of pH, cereal type and extruded linseed supplementation on fatty acid metabolism in continuous cultures of rumen microorganisms fed high starch diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* In preparation.

- Bhatti, S. A., and J. L. Firkins. 1995. Kinetics of hydration and functional specific gravity of fibrous feed by-products. *J. Anim. Sci.* 73:1449-1458.
- Brossard, L., F. Chauvecheyras-Durand, B. Michalet-Doreau, and C. Martin. 2006. Dose effect of live yeasts on rumen microbial communities and fermentations during butyric latent acidosis in sheep: new type of interaction. *Anim. Sci.* 82:829-836.
- Broudiscou, L. P., A. Cornu, and A. Rouzeau. 2007. In vitro degradation of 10 mono- and sesquiterpenes of plant origin by caprine rumen micro-organisms. *J. Sci. Food Agric.* 87:1653-1658.
- Brown, M. S., C. H. Ponce, and R. Pulikanti. 2006. Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: performance and ruminal metabolism. *J. Anim. Sci.* 2006:E25-E33.
- Chilliard, Y., F. Glasser, A. Ferlay, L. Bernard, J. Rouel, and M. Doreau. 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *Europ. J. Lipid Sci. Tech.* 109:828-855.
- Christian, K. R., and M. R. Coup. 1954. The determination of chromic oxide in faeces. *N.Z. J. Sci. Tech.* 36:328-330.
- Corbett, J. L., J. F. D. Greenhalgh, and E. Florence. 1959. Distribution of chromium sesquioxide and polyethyleneglycol in the reticulo-rumen of cattle. *Br. J. Nutr.* 13:337-345.
- De La Fuente, G., K. Skirnisson, and B. A. Dehority. 2006. Rumen ciliate fauna of Icelandic cattle, sheep, goats and reindeer. *Zootaxa* 1377:47-60.
- Desnoyers, M., C. Duvaux-Ponter, K. Rigalma, S. Roussel, O. Martin, and S. Giger-Reverdin. 2008. Effect of concentrate percentage on ruminal pH and time-budget in dairy goats. *Animal* 2:1802-1808.
- Dewhurst, R. J., J. M. Moorby, B. Vlaeminck, and V. Fievez. 2007. Apparent recovery of duodenal odd- and branched-chain fatty acids in milk of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:1775–1780.
- Doreau, M., and Y. Chilliard. 1997. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. *Br. J. Nutr.* 78, Suppl 1:S15-S35.
- Dorman, H. J. D., and S. G. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88:308-316.
- Faichney, G. J. 1975. The use of markers to partition digestion within the gastro-intestinal tract of ruminants. Pages 277-291 in 4th Int. Symp. Ruminant Physiology, Sydney. University of New England Publishing Unit, Armidale, NSW, Australia.
- Giger, S., P. Thivend, D. Sauvant, M. Dorléans, and P. Journaix. 1987. Etude de l'influence préalable de différents traitements amylolytiques sur la teneur en résidu NDF d'aliments du bétail. *Ann. Zootech.* 36:39-48.
- Glasser, F., A. Ferlay, D. Doreau, P. Schmidely, D. Sauvant, and Y. Chilliard. 2008a. Long-chain fatty acid metabolism in dairy cows: a meta-analysis of milk fatty acid yield in relation to duodenal flows and *de novo* synthesis. *J. Dairy Sci.* 91:2771-2785.
- Glasser, F., P. Schmidely, D. Sauvant, and M. Doreau. 2008b. Digestion of fatty acids in ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors: 2. C18 fatty acids. *Animal* 2:691-704.

- Hristov, A. N., M. Ivan, L. M. Rode, and T. A. McAllister. 2001. Fermentation characteristics and ruminal ciliate protozoal populations in cattle fed medium- or high-concentrate barley-based diets. *J. Anim. Sci.* 79:515-524.
- Huhtanen, P. 1988. The effects of barley, unmolassed sugar-beet pulp and molasses supplements on organic matter, nitrogen and fibre digestion in the rumen of cattle given a silage diet. *Anim. Feed Sci. Technol.* 20:259-278.
- INRA-AFZ. 2004. Tables de composition et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevage. INRA Editions, Paris, France. 301 pp.
- ISO. 1978. ISO 5984. Animal Feedingstuffs. Determination of Crude Ash. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland. 6 pp.
- Kalscheur, K. F., B. B. Teter, S. Piperova, and R. A. Erdman. 1997. Effect of dietary forage concentration and buffer addition on duodenal flow of *trans*-C18:1 fatty acids and milk fat production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:2104-2114.
- Khorasani, G. R., E. K. Okine, and J. J. Kennelly. 2001. Effects of forage source and amount of concentrate on rumen and intestinal digestion of nutrients in late-lactation cows. *J. Dairy Sci.* 84:1156-1165.
- Kucuk, O., B. W. Hess, P. A. Ludden, and D. C. Rule. 2001. Effect of forage:concentrate ratio on ruminal digestion and duodenal flow of fatty acids in ewes. *J. Anim. Sci.* 79:2233-2240.
- Lehloenya, K. V., C. R. Krehbiel, K. J. Mertz, T. G. Rehberger, and L. J. Spicer. 2008. Effects of propionibacteria and yeast culture fed to steers on nutrient intake and site and extent of digestion. *J. Dairy Sci.* 91:653–662.
- Loor, J. J., K. Ueda, A. Ferlay, Y. Chilliard, and M. Doreau. 2004. Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids in response to dietary forage:concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87:2472-2485.
- Loor, J. J., K. Ueda, A. Ferlay, Y. Chilliard, and M. Doreau. 2005. Intestinal flow and digestibility of *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids (CLA) in dairy cows fed a high-concentrate diet supplemented with fish oil, linseed oil, or sunflower oil. *Anim. Feed Sci. Technol.* 119:203–225.
- Lourenço, M., E. Ramos-Morales, and R. J. Wallace. 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal* 4:1008-1023.
- Malecky, M., and L. P. Broudiscou. 2009. Disappearance of nine monoterpenes exposed *in vitro* to the rumen microflora of dairy goats: Effects of inoculum source, redox potential, and vancomycin. *J. Anim. Sci.* 87:1366-1373.
- Malecky, M., L. P. Broudiscou, and P. Schmidely. 2009a. Effects of two levels of monoterpene blend on rumen fermentation, terpene and nutrient flows in the duodenum and milk production in dairy goats. *Anim. Feed Sci. Technol.* 154:24-35.
- Malecky, M., V. Fedele, and L. P. Broudiscou. 2009b. *In vitro* degradation by mixed rumen bacteria of 17 mono- and sesquiterpenes typical of winter and spring diets of goats on Basilicata rangelands (southern Italy). *J. Sci. Food Agric.* 89:531-536.

- Martin, C., L. Millet, G. Fonty, and B. Michalet-Doreau. 2001. Cereal supplementation modified the fibrolytic activity but not the structure of the cellulolytic bacterial community associated with rumen solid digesta. *Reprod. Nutr. Develop.* 41:413-424.
- Moon, Y. H., J. U. Ok, S. J. Lee, J. K. Ha, and S. S. Lee. 2010. Comparative study on the rumen microbial populations, hydrolytic enzyme activities and dry matter degradability between different species of ruminant. *Anim. Sci. J.* 81:642-647.
- Ollier, S., C. Leroux, A. de la Foye, L. Bernard, J. Rouel, and Y. Chilliard. 2009. Whole intact rapeseeds or sunflower oil in high-forage or high-concentrate diets affects milk yield, milk composition, and mammary gene expression profile in goats. *J. Dairy Sci.* 92:5544-5560.
- Piperova, L. S., J. Sampugna, B. B. Teter, K. Kalscheur, M. Yurawecz, Y. Ku, K. Morehouse, and R. A. Erdman. 2002. Duodenal and milk *trans* octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of *cis*-9 containing CLA in lactating dairy cows. *J. Nutr.* 132:1235-1241.
- Ramos, S., M. L. Tejido, m. E. Martinez, M. J. Ranilla, and M. D. Carro. 2009. Microbial protein synthesis, ruminal digestion, microbial populations, and N balance in sheep fed diets varying in forage to concentrate ratio and type of forage. *J. Anim. Sci.* 87:2924-2934.
- SAS Institute. 2000. User's Guide. Release 11.04. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Schmidely, P., F. Glasser, D. Doreau, and D. Sauvant. 2008. Digestion of fatty acids in ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors. 1. Total fatty acids. *Animal* 2:677-690.
- Serment, A., P. Schmidely, S. Giger-Reverdin, P. Chapoutot, and D. Sauvant. 2011. Effects of the percentage of concentrate on rumen fermentation, nutrient digestibility, plasma metabolites and milk composition in mid-lactation goats. *J. Dairy Sci.* 94:3960-3972.
- Serment, A., and S. Giger-Reverdin. 2012. Effects of the percentage of concentrate on intake pattern in mid-lactation goats. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, Submitted
- Shingfield, K. J., and J. M. Griinari. 2007. Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 109:799-816.
- Titgemeyer, E. C. 1997. Design and interpretation of nutrient digestion studies. *J. Anim. Sci.* 75:2235-2247.
- Troegeler-Meynadier, A., M. C. Nicot, C. Bayourthe, R. Moncoulon, and F. Enjalbert. 2003. Effects of pH and concentrations of linoleic and linolenic acids on extent and intermediates of ruminal biohydrogenation *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 86:4054-4063.
- Ueda, K., A. Ferlay, J. Chabrot, J. J. Loor, Y. Chilliard, and D. Doreau. 2003. Effect of linseed oil supplementation on ruminal digestion in dairy cows fed diets with different forage:concentrate ratios. *J. Dairy Sci.* 86:3299-4007.
- Van Nevel, C. J., and D. I. Demeyer. 1996. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents *in vitro*. *Reprod. Nutr. Develop.* 36:53-63.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.

- Vlaeminck, B., V. Fievez, D. Demeyer, and R. J. Dewhurst. 2006. Effect of forage:concentrate ratio on fatty acid composition of rumen bacteria isolated from ruminal and duodenal digesta. *J. Dairy Sci.* 89:2668-2678.
- Voelker, J. A., and M. S. Allen. 2003. Pelleted beet pulp substituted for high-moisture corn: 2. Effects on digestion and ruminal digestion kinetics in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:3553–3561.
- Williams, C. H., D. J. David, and O. Iismaa. 1962. The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. *J. Agric. Sci. (Camb.)* 59:381-385.
- Wu, Z., O. A. Ohajuruka, and D. L. Palmquist. 1991. Ruminal synthesis, biohydrogenation, and digestibility of fatty acids by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74:3025-3034.
- Yang, W. Z., and K. A. Beauchemin. 2007. Altering physically effective fiber intake through forage proportion and particle length: digestion and milk production. *J. Dairy Sci.* 90:3410-3421.

III. ARTICLE 3 : Effet du pourcentage de concentrés sur la dynamique d'ingestion chez la chèvre en milieu de lactation

RESUME DE L'ARTICLE 3

Objectifs :

Cet article étudie le comportement d'ingestion de 13 chèvres en milieu de lactation, recevant *ad libitum* des rations différant par leur pourcentage de concentrés (en semaine 1 : 52.5 % de concentrés, de la semaine 4 à 10 : 35 ou 70 % de concentrés). Les cinétiques d'ingestion après la distribution d'un repas ont été analysées selon plusieurs méthodes : utilisation d'un index résumant la vitesse d'ingestion pendant les premières heures après la distribution d'un repas (la proportion de MS ingérée dans les 90 minutes suivant la distribution du repas par rapport à la MSI totale), l'ajustement des courbes d'ingestion à un modèle exponentiel et une méthode de segmentation - classification des courbes.

Les objectifs de ce travail ont été : (1) d'étudier la variabilité individuelle et intra-semaine des cinétiques d'ingestion, (2) d'examiner les relations entre les cinétiques d'ingestion, le pH ruminal et la production de lait, (3) de déterminer les effets du pourcentage de concentrés sur les cinétiques d'ingestion, et, (4) de comparer les méthodes permettant d'analyser ces cinétiques.

Résultats :

En semaine 1, les animaux ont présenté une grande variabilité individuelle du comportement d'ingestion, même s'ils recevaient la même ration. Une typologie a pu être déterminée pour classer les animaux : mangeurs rapides, intermédiaires et lents pendant les premières heures suivant la distribution du repas. Certains animaux ont conservé leur profil initial pendant toute la durée de l'essai et cela malgré un changement de régime. Cela concernait principalement les animaux passant du régime à 52,5% de concentrés au régime à 35 %. D'autres ont, au contraire, changé de profil, passant d'un profil de mangeur rapide ou intermédiaire vers un profil de mangeur lent, suite à la distribution du régime riche en concentrés. La forme exponentielle de la courbe d'ingestion de ces animaux a été déstructurée. La vitesse d'ingestion a été linéairement corrélée à la chute de pH ruminal ($P = 0,001$) et à la production de lait ($P = 0,02$). En semaine 4, l'augmentation du pourcentage de concentrés n'a pas modifié la MSI, ni la vitesse d'ingestion. Le seul critère modifié a été la réduction de la durée du premier repas des animaux. En fin d'essai, la vitesse d'ingestion globale, la durée et la MS ingérée lors du premier repas ont été diminuées pour les animaux recevant les régimes riches en concentrés. Ce changement de comportement d'ingestion a permis de limiter la chute de pH ruminal.

Discussion et Conclusion :

Les animaux ont pu adapter leur comportement d'ingestion au cours des semaines, notamment lorsqu'ils recevaient une ration riche en concentrés, en diminuant leur vitesse d'ingestion. Du fait de la relation linéaire entre la vitesse d'ingestion et la chute de pH ruminal, les animaux ayant des vitesses d'ingestion importantes sont les animaux les plus enclins à présenter des épisodes d'acidose s'ils reçoivent des rations riches en concentrés. Une prise en compte des vitesses d'ingestion pourrait permettre de limiter l'occurrence de l'acidose en élevage. La vitesse d'ingestion des animaux est un paramètre important à prendre en compte également pour l'allotement des animaux lors d'études expérimentales, particulièrement s'il s'agit d'études sur les dynamiques de fermentations ruminales. Les méthodes utilisées dans cette étude ont montré des imperfections, mais se sont révélées complémentaires pour l'interprétation des données.

Effects of the percentage of concentrate on intake pattern in mid-lactation goats

A. Serment,^{a,b} and S. Giger Reverdin,^{a,b,*}

^a AgroParisTech, UMR791 Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, 16 rue Claude Bernard, F-75005 Paris, France

^b INRA, UMR791 Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, 16 rue Claude Bernard, F-75005 Paris, France

* Corresponding author at: AgroParisTech, INRA, UMR791, Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, 16 rue Claude Bernard, F-75005 Paris, France ; Tel: +33 1 44 08 17 68; Fax: +33 1 44 08 18 53;

E-mail address: sylvie.giger-reverdin@agroparistech.fr (Sylvie Giger-Reverdin)

Applied Animal Behaviour Science
<http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2012.08.004>

ABSTRACT

The aims of this work were to study the between-individual and between-week variations of intake patterns, to examine the relationship between intake pattern, rumen pH and milk production, to study the effects of the percentage of concentrate on intake patterns and to compare methods describing intake patterns. Thirteen goats (95 ± 4 days in milk) were fed *ad libitum* a diet with 52.5% of concentrate (on dry matter basis) at first week. They were assigned to a low-concentrate diet (35%) or a high-concentrate diet (70%) from week 4 to week 10 of the trial. Intake patterns were studied according to three methods: using an index of the intake rate during first hours after feeding (proportion of DM eaten at 90 min after the afternoon feeding), modelling cumulative intake profiles with an exponential model, and using a segmentation-clustering method. Even though animals received the same diet at the onset of the trial, a large between-goat variability of the ingestive behaviour was observed. Animals were classified according to 3 profiles of ingestive behaviour: fast, intermediate and slow eaters during the first 90 minutes after afternoon feeding. Several animals kept the same profile during 10 weeks and in spite of a modification of their diet (from 52.5 to 35% of concentrate), whereas the others changed their profile (fast or intermediate eater to slow eater) when they were fed the high-concentrate diet. The intake rate was related to the rumen pH drop, and raw milk yield ($P = 0.02$) and tended to be related to total dry matter intake ($P = 0.09$). In week 4, the percentage of concentrate had no effect on the total dry matter intake and the intake rate. Only the duration of the first eating bout was reduced by increasing the dietary percentage of concentrate ($P = 0.009$). At the end of the trial, the intake rate ($P = 0.001$), the duration ($P < 0.001$) and the dry matter ($P < 0.001$) eaten during the first eating bout were reduced for animals fed the high-concentrate diet. This adaptation of the ingestive behaviour allowed the animals to limit the decrease in rumen pH. None of the methods used to describe intake patterns were perfect, but they all add information to help in interpreting the data.

Key words: dairy goat, intake pattern, rumen pH, individual differences

INTRODUCTION

Feeding high-concentrate diets is often used to intensify milk production in dairy cows (Yang and Beauchemin, 2007; Agle et al., 2010) and goats (Rapetti et al., 1997; Serment et al., 2011). These diets are known to modify the ingestive behaviour of ruminants as times spent eating and ruminating generally decreased with high-concentrate diets either in cows (Johnson and Combs, 1992; Friggens et al., 1998; DeVries et al., 2007, DeVries et al., 2009) or in goats (Focant, 1984; Santini et al., 1992; Abijaoudé et al., 2000; Desnoyers et al., 2008a). An increase of the dietary percentage of concentrate can also increase the number of intake bouts and modify the intake pattern (Abijaoudé et al., 2000). In some cases, high producing ruminants fed high-concentrate diets can be in subacute ruminal acidosis (SARA), and off-feed periods can be observed (Nocek, 1997; Desnoyers et al., 2009).

Between-individual variation of ingestive behaviour in ruminants was previously studied in the literature, but quite seldom and generally in a between-diet comparison at a given period (Dulphy et al., 1990; Friggens et al., 1998; Desnoyers et al., 2011). The intake pattern determines the pattern of nutrients entering into the rumen, and thus of fermentation, and consequently of rumen pH (Gonçalves et al., 2001; Desnoyers et al., 2011). These last authors observed that fast eating goats showed a considerable drop in rumen pH, compared to slow eating goats. This shows the importance of considering individual differences.

Feeding behaviour in ruminants can be studied by describing the number of meals (or eating bouts) during a period after feed allowance (often 1 day), length and size of meals and intake rate during meals. It implies an *a priori* definition of the meals, which is dependent on authors and species (Abijaoudé et al., 2000; Landau et al., 2000; Kononoff and Heinrichs, 2003). Using automatic feeders allows the study of feeding behaviour by describing the visits of the animals (number and duration of visits, time spent feeding, food intake and feeding rate per visit) to the feeders and without the need for definition of meals (Friggens et al., 1998). An other approach consisted in calculating a very synthetic index corresponding to the proportion of feed allowance eaten during the first 90 min after feeding (P90) (Giger-Reverdin et al., 2009). A second approach to characterize eating behaviour is to modelling patterns of intake for each animal. Exponential models have been proposed by Faverdin (1985) or Baumont (1988). However, according to Giger-Reverdin et al. (2012), this method is not satisfactory, because some intake patterns did not present an exponential structure, and it is therefore not possible to compare them. Thus, these authors proposed a new segmentation-clustering method. The first step of this method cuts the intake pattern into segments by detecting slope changes. The second step categorises the segments in 8 clusters according to intake rate (slope of the segments).

In the present study, these three methods of analysis (P90, exponential model, segmentation-clustering method) were applied to data obtained in dairy goats fed total mixed rations (TMR) differing in their percentage of concentrate. The first aim of this paper was to study the between-goat variation fed a unique diet at the beginning of the experiment, as there was no data available in the literature. The second aim was to examine the relationships between intake pattern, rumen pH and milk production. A third aim was to test if the intake pattern of

the goats was modified by the type of diets differing by their concentrate percentage, and if there is any change with the duration of the trial. The data used were obtained during an experiment a part of which was previously published by Serment et al. (2011).

MATERIALS AND METHODS

Animals, Design, Diets, and Feeding

Thirteen ruminally and duodenally cannulated goats in mid-lactation (95 ± 3.7 days in milk) were used in a 10-week trial, as previously described in Serment et al. (2011). They were housed in 1.20 m x 0.75 m individual pens, with free access to water. At week 1, all goats were fed ad libitum a basal TMR containing 52.5% concentrate. Animals were accustomed to the diet for 3 weeks. At the end of week 1, goats were randomly assigned to 1 of 2 experimental groups, according to their parity, their raw milk yield during this week, their milk fat content and milk protein content, and the parameter P90 (see part 2.4 for details). In week 2, goats were progressively switched from the basal diet to their experimental diet, by increasing or decreasing by 5% the proportion of concentrate in the diet every 2 days during 6 days and by 2.5% for the last increase or decrease, so that the proportion of concentrate of their experimental diet was achieved. From week 3 to week 10, they were fed either a low-concentrate TMR (L diet, 35% of concentrate, $n = 7$ goats), or a high-concentrate TMR (H diet, 70% of concentrate, $n = 6$ goats). Ingredient composition, chemical composition and nutritive values of these diets are given in Table 1. Sampling method and frequency, methods of chemical analysis were given in Serment et al (2011). The diets were fed twice a day at 08:00 and 16:00 h, after milking, with 1/3 in the morning and 2/3 in the afternoon, to respect the time interval between milkings. The DM contents of TMR and orts were determined by oven-drying at 80°C for 24 h.

Recording of Dynamic Patterns of Intake

During weeks 1, 4 and 10, dynamic patterns of intake were recorded by weighing devices placed under the feed trough. This system recorded the weight of feed in the trough every 2 min (Desnoyers et al., 2008a). The recordings were done during 4 successive days each week and for each goat. The recordings were taken simultaneously for all goats.

Milk Production and Rumen pH

Goats were milked twice a day, at 07:00 and 15:30 h, throughout the trial. Daily raw milk yield was recorded. Body weight (BW) was measured weekly in the middle of the day (14:00 h). During weeks 1, 4 and 10, 50 mL of rumen contents was individually collected, at 0, 60, 120, 240 and 360 min after the morning feeding of the fourth day of intake recording (Serment et al., 2011). Rumen pH was measured immediately on a sample filtered through a nylon cloth with a combination Ag/AgCl pH electrode (Radiometer Analytical ®, Lyon, France)

Calculations and Statistical Analysis

Recorded data of intake were cumulated to obtain cumulated dry matter intake (DMI) after each feeding, expressed in g of DM / kg BW. Only results of the afternoon feedings are presented in this paper, because goats were less disturbed by the human activities on the farm during this part of the day and because they received the main part of their diet after the milking afternoon.

For each goat and each recording day, the proportion of feed allowance eaten during the first 90 min after the afternoon feeding (P90) was calculated.

For each goat and each recording day, cumulated DMI after the afternoon feeding (15 h after feeding) was described with an exponential model:

$$\text{Cumulative DMI } (t) = A(1 - e^{-Bt})$$

where A is the asymptote, $A \times B$ the slope of the curve, and t the time after feeding.

Data were also characterized by a segmentation-clustering method (Giger-Reverdin et al., 2012). An example of this method is given in Figure 1. The method looks for changes in the slopes of cumulated feed intake and cuts the curve into segments (which can have different durations) according to their slope.

Table 1. Ingredient composition, chemical composition, and nutritive value of basal, low- (L) and high- (H) concentrate total mixed rations.

	Diet ¹		
	Basal	L	H
Ingredients (g/100 g of DM)			
Forage:	47.5	65.0	30.0
Grass hay ²	21.9	29.9	13.8
Dehydrated alfalfa ³	25.6	35.1	16.2
Concentrate:	52.5	35.0	70.0
Commercial concentrate ⁴	35.0	20.0	50.0
Sugar beet pulp silage	13.5	7.0	20.0
Calcium salt of palm oil	0.7	1.4	-
Soybean meal	3.3	6.6	-
Chemical composition			
Dry matter (DM) (g / 100 g of fresh matter)	65.4	76.8	58.4
		(g/100 g of DM)	
aNDFom ⁵	36.3	40.9	36.0
ADFom ⁶	20.9	24.4	20.1
ADL ⁷	3.7	3.9	3.0
Starch	7.2	4.4	9.7
Ash	8.6	8.5	8.4
Nutritive values			
Net energy ⁸ (MJ / kg of DM)	6.32	5.88	6.75
PDIN ^{8,9} (g / kg of DM)	113	113	114
PDIE ^{8,9} (g / kg of DM)	109	104	114

¹ Goats were fed the basal diet in week 1. From week 4 to week 10, they were fed either the L diet (7 goats) or the H diet (6 goats).

² Grass hay is a meadow hay (mix of non-specified species)

³ Rumiluz, Désialis, Paris, France.

⁴ Agralys Aliment, Châteaudun, France. Composition: 18% Maize, 14% Sugar beet pulp, 12% Sunflower meal, 10% Wheat, 10% Soybean, 9% Rapeseed meal, 6% Soybean meal, 4% Wheat distiller, 3.5% Linseed, 3% Pea seed, 1% Rapeseed oil, 3% Molasses, 6.5% Mineral and Vitamin premix.

⁵ Neutral Detergent Fibre assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash

⁶ Acid Detergent Fibre expressed exclusive of residual ash or lignocellulose

⁷ Acid Detergent Lignin determined by solubilization of cellulose with sulphuric acid

⁸ Calculated according to the additive method from INRA tables

⁹ PDIN (or E): protein digestible at the level of intestine when nitrogen (or energy) is limiting for microbial protein synthesis

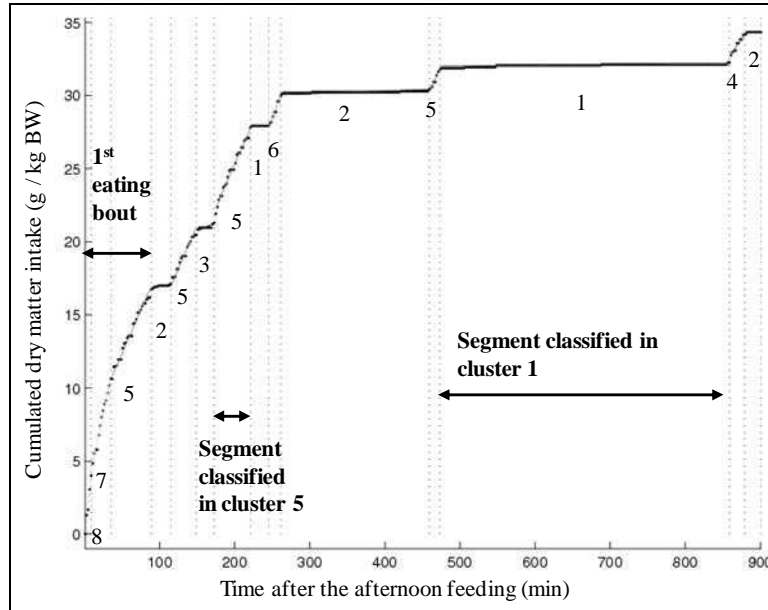


Figure 1. Example of a result of the segmentation-clustering method (Giger-Reverdin et al., 2012) on an intake pattern. The vertical dotted lines separate the segments. The numbers correspond to the number of the clusters.

The method then categorises the obtained segments into 8 clusters according to the values of their slopes: the clusters 8 to 6 correspond to the segments with the highest intake rates and the clusters 2 and 1 correspond to a period almost without intake (slope near 0).

The statistical analysis aimed at detecting these changes was described by Giger-Reverdin et al. (2012). With this method, the duration of the first eating bout can be determined: its end was defined as the time when the first segment corresponding to either clusters 2 or 1 was detected. For each intake pattern, the duration of intake and the proportion of DM eaten in each cluster were calculated. The duration and the quantity of DM eaten during the first eating bout for each intake pattern were also determined.

To study between-goat variability, for each week, cumulated DMI after the afternoon feeding were averaged for every goat. Daily raw milk yield was averaged by week and goat.

Data from weeks 4 and 10 obtained using exponential model and segmentation-clustering methods, were analysed using the MIXED procedure of SAS (SAS Institute, 2000) for repeated measurements using the following statistical model:

$$Y_{ijkl} = \mu + a_i + b_j + ab_{ij} + c_{ik} + d_{jl} + e_{ijkl}$$

where Y_{ijkl} is the response variable, μ the overall mean, a_i the fixed effect of the percentage of concentrate (L vs. H), b_j the fixed effect of week (week 4 vs. week 10), ab_{ij} the interaction between the percentage of concentrate and the week, c_{ik} the random effect of the animal, d_{jl} the fixed effect of the day of recording nested within week (6 df) and e_{ijkl} the random residual error. The model was tested with 4 covariance structures: compound symmetry, heterogeneous compound symmetry, first-order autoregressive, and heterogeneous autoregressive (1). Finally the model was tested only with the compound symmetry structure

because with the others the model didn't converge. Rumen pH drops at different times (0-60 min, 0-120 min, 0-240 min) were calculated. The parameter P90 and pH drops after feeding were analysed by using the same model, but without the fixed effect of the day of recording nested within week because these parameters were weekly means.

RESULTS

Intake patterns, rumen pH and milk production during week 1

Between-individual variation of intake patterns during week 1. Individual intake patterns after the afternoon feeding during week 1 are presented in Figure 2. Even though goats were fed the same TMR during this week (basal TMR with 52.5% concentrate), there was a large variability between individual intake patterns during the first hours after feeding. Animals were classified according to the parameter P90 (Figure 2a). During the first 90 min after feeding, 5 goats ate more than 70% of the total DMI eaten after this feeding (fast eaters) while 5 ate only 50% (slow eaters). Three goats were in the continuum between those classes (intermediate eaters).

Relationships between intake pattern, rumen pH and milk production during week 1. Animals ate between 25.0 and 32.5 g of DM/ kg BW of the basal TMR during 15 h after the afternoon feeding (Figure 2b). Total DMI tended to be related positively to P90:

$$\text{Total DMI} = 24.5 + 0.075 * P90$$

$$(n = 13, R^2 = 23.6\%, \text{RMSE} = 2.38, P = 0.09)$$

Raw milk yield was linearly correlated to P90 ($R^2 = 42.0\%$; $P = 0.02$) (Figure 3a).

Relationships between ingestive behaviour and rumen pH drops at different times (0-60 min, 0-120 min, 0-240 min) were studied. However, only the pH decrease between 0 and 120 min was presented in this paper, because values at 120 min corresponded to the minimal observed values of pH. A linear relationship was found between rumen pH drop between 0 and 120 min and P90 ($R^2 = 68.0\%$; $P = 0.001$). Slow eaters presented a pH decrease between 0 and 120 min lower than pH decrease of intermediate and fast eaters (Figure 3b).

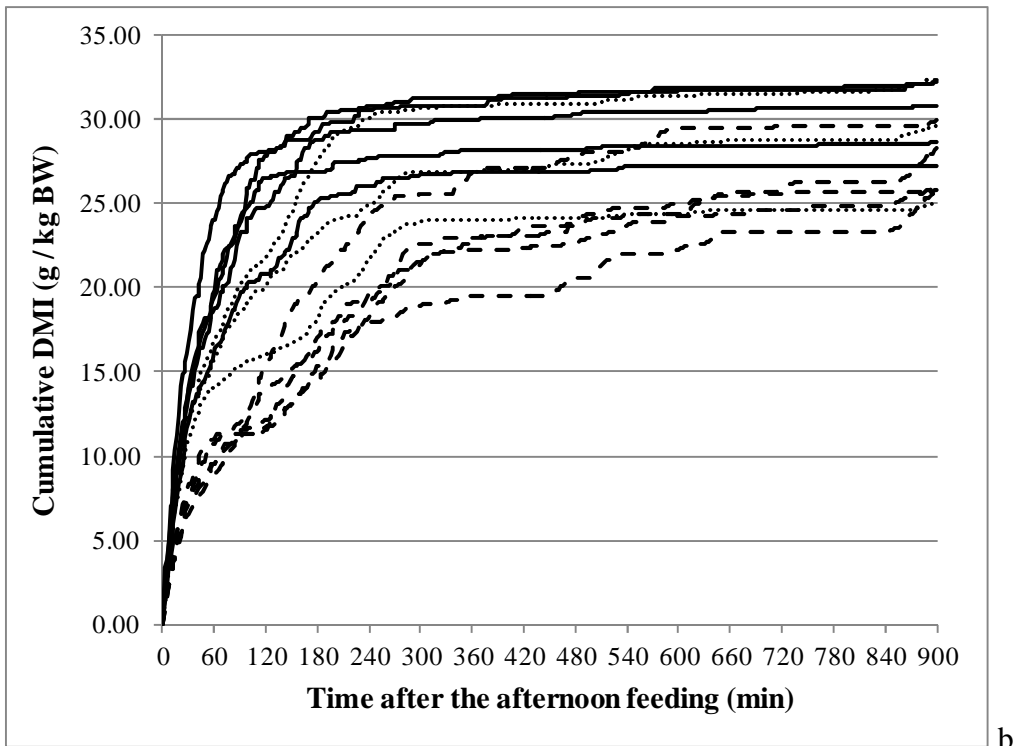
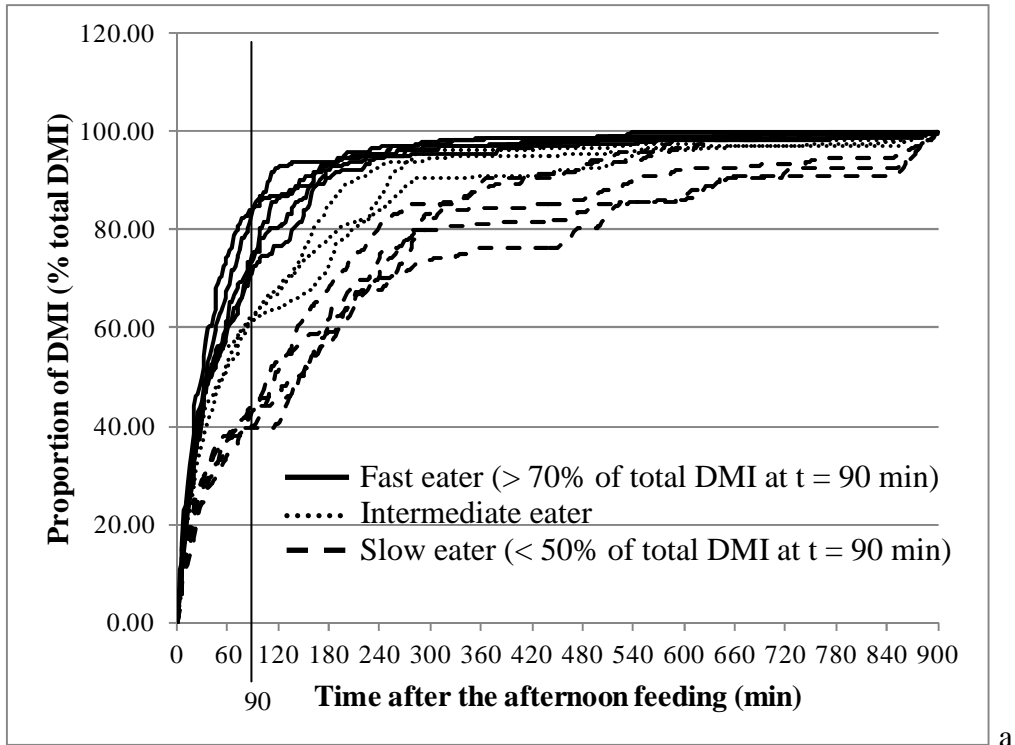


Figure 2. Intake patterns 15 h after the afternoon feeding during week 1 (means on 4 consecutive days) of 13 dairy goats fed a basal TMR containing 52.5% concentrate. Dry matter intake (DMI) was measured every 2 min by a weigh-scale fitted under the feed-trough. Figure 2a presents the dynamic patterns of the proportion of DM eaten (proportion of total DMI), Figure 2b the dynamic patterns of the cumulative DMI.

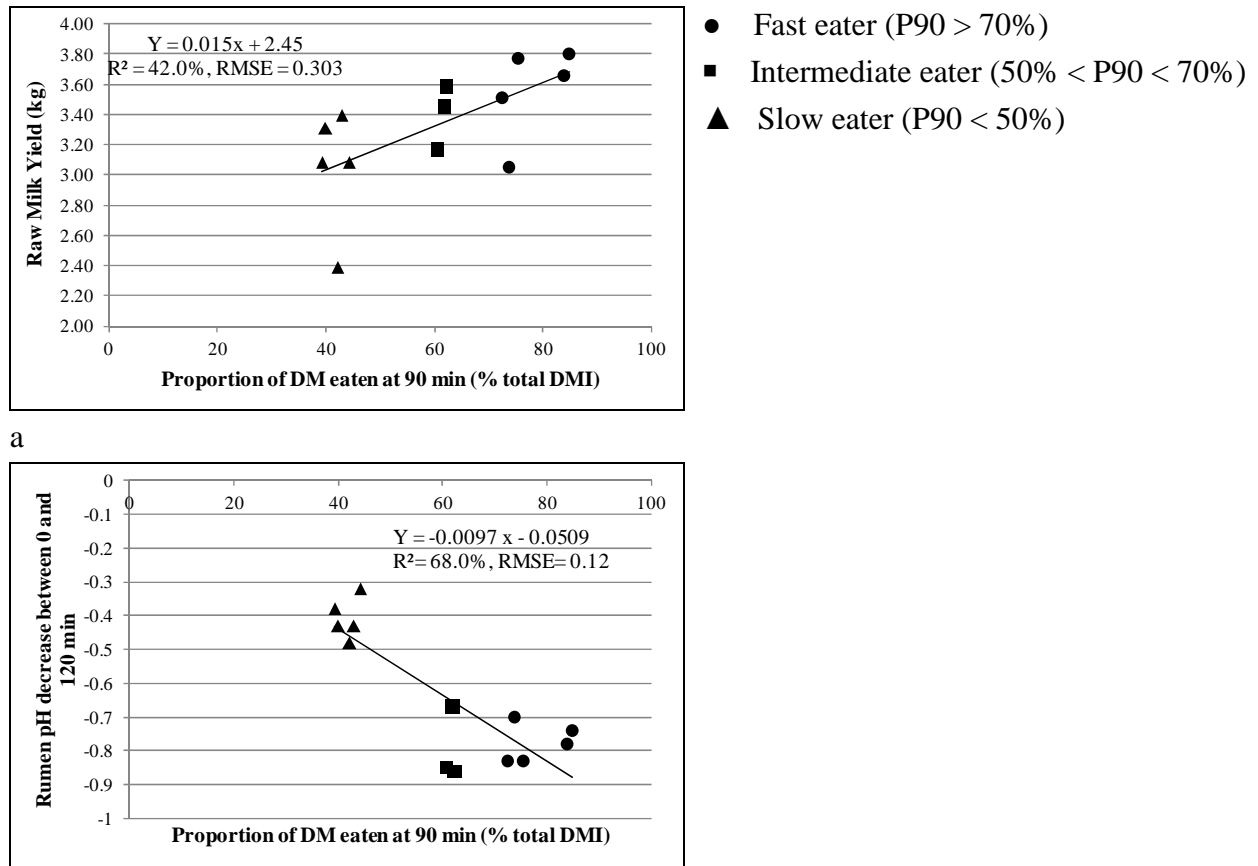
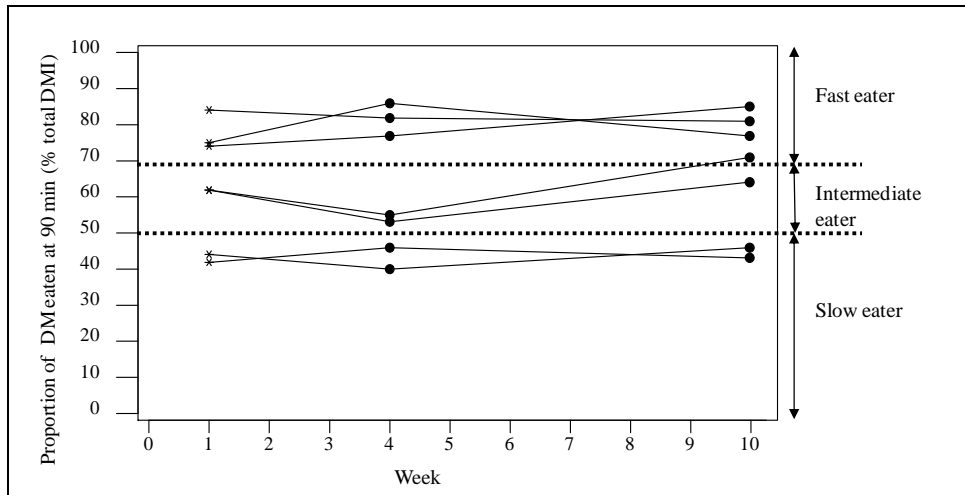


Figure 3. Relationship between raw milk yield (a), rumen pH decrease between 0 and 120 min after the morning feeding (b) and the proportion of DM eaten at 90 min after the afternoon feeding, in week 1 for goats fed a basal TMR (52.5% concentrate).

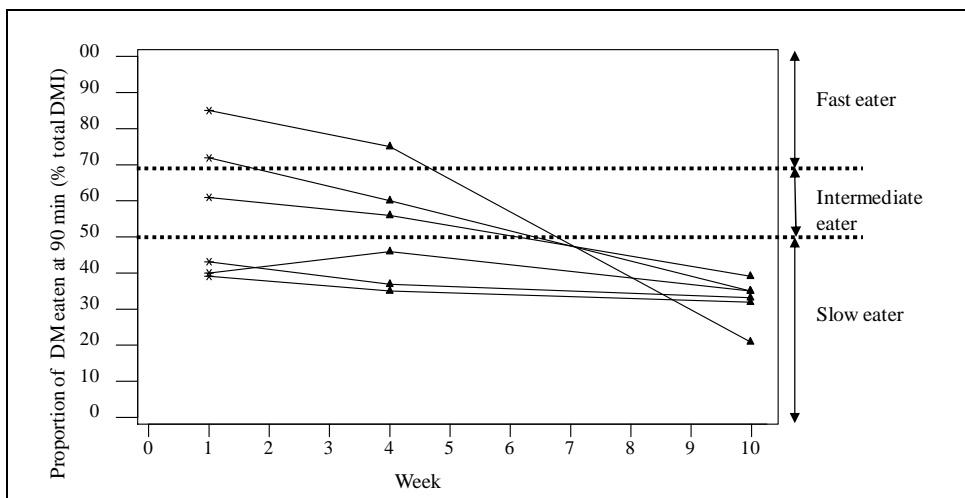
Evolution of intake patterns between weeks and effect of the percentage of concentrate

Parameter P90. The parameter P90 was studied at weeks 1, 4 and 10 for each goat (Figure 4). At week 1, goats were assigned to their experimental groups, balanced for this parameter, which, as a result, did not differ between groups ($P = 0.48$). In fact, animals which were fed the L diet from week 4 to 10 (Figure 4a) presented a P90 in week 1 equal to $56.7 \pm 19.09\%$ of the total DMI whereas the P90 of animals which were fed the H diet from week 4 to 10 (Figure 4b) was equal to $63.4 \pm 15.77\%$. The parameter P90 remained stable between weeks for goats fed the L diet (Figure 4a and Table 2), whereas it decreased for goats fed the H diet (Figure 4b and Table 2). Variability between goats fed the L diet remained stable between weeks (standard deviation equal to 18.5 and 16.5, in week 4 and 10 respectively) whereas it decreased for goats fed the H diet (standard deviation equal to 15.1 and 6.1, in week 4 and 10, respectively). As an example, Figure 5 shows the evolution of dynamic intake patterns between weeks of two goats fed the basal TMR in week 1, and either the L diet (Figure 5a) or the H diet (Figure 5b) in week 4 and 10. For the goat in Figure 5b

(fed the H diet in week 4 and 10), the exponential structure of the intake pattern observed at week 1 changed between weeks, whereas it remained stable for the other goat (Figure 5a, fed the L diet in week 4 and 10). Furthermore, even though goat had the same feed allowance in weeks 1 and 10, goat presented in Figure 5b decreased its intake rate in week 10 by increasing the number of eating bouts after the first bout.



a



b

Figure 4. Evolution of the proportion of DM eaten at 90 min after the afternoon feeding, between weeks (means on 4 consecutive days), of goats fed a basal TMR in week 1 (*) and the L diet (●, n = 7, Figure 4a) or the H diet (▲, n = 6, Figure 4b) from week 4 to 10.

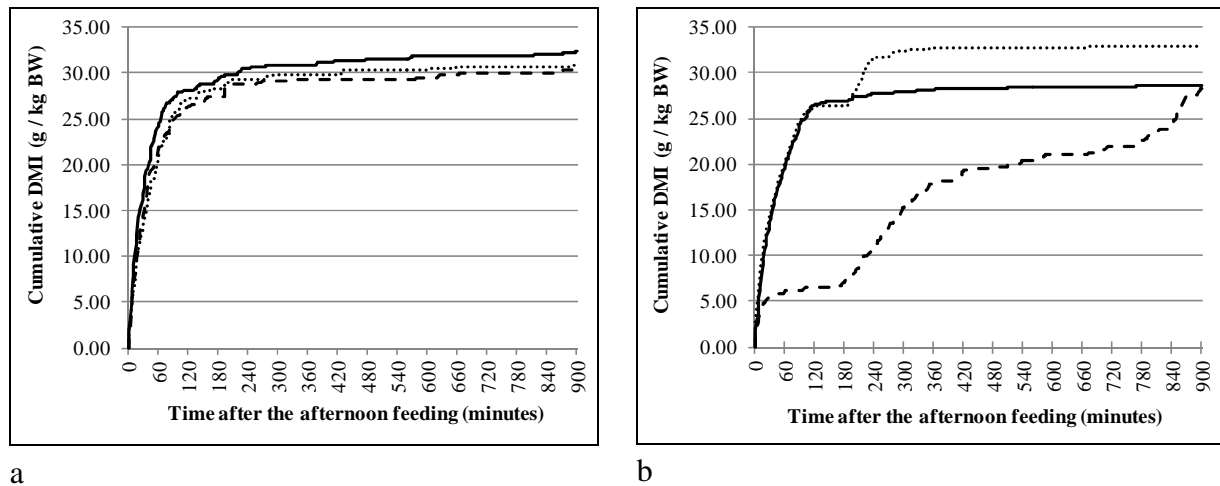


Figure 5. Intake pattern 15 h after the afternoon feeding of two dairy goats during week 1 (—), week 4 (····) and week 10 (---). The animals were fed a basal TMR in week 1. The first goat (a) was fed the L diet from week 4 to week 10 and the second one (b) the H diet.

Exponential model. According to the low RMSE, accuracy of the exponential model was satisfactory (RMSE/Cumulative DMI at 900 minutes inferior to 10%), however RMSE was lower for goats fed the L diet than those fed the H diet (RMSE = 0.82 ± 0.052 g / kg BW and 1.68 ± 0.061 , respectively, $P < 0.001$). Interactions between the percentage of concentrate and the week were found for the parameters obtained by applying the exponential model to assess the DMI patterns (Table 2). Between week 4 and 10, the asymptote of the cumulative intake profile (parameter A) was reduced by 13.8% ($P < 0.001$) and 4.9% ($P = 0.01$) for goats fed the H diet and the L diet, respectively (Table 2). The intake rate (parameter A x B) was lower for goats fed the H diet than for those fed the L diet and it decreased by 63.0% ($P < 0.001$) between week 4 and 10 for goats fed the H diet, whereas it increased only by 11% ($P = 0.02$) for goats fed the L diet (Table 2). The parameter A gave similar results as total DMI (Table 2).

Segmentation-clustering method. A cluster is a splitting of intake according to eating rate. In this paragraph, the duration and the quantity of DM eaten during the first eating bout and in each cluster are described. The highest values of clusters (8 to 6) corresponded to the segments with the highest intake rates and the lowest ones (2 and 1), to a period almost without intake.

Intake duration and DM eaten during the first eating bout were lower for goats fed the H diet than for those fed the L diet (Table 2). Furthermore, the DMI during this eating bout was reduced by 51.1% ($P < 0.001$) for goats fed the H diet between week 4 and 10 (Table 2).

The effect of the percentage of concentrate on the intake duration and the proportion of DM eaten in the clusters was not significant (Table 2 and Figure 6), except for cluster 6, where goats fed the H diet tended to eat in proportion more than goats fed the L diet ($P = 0.06$, Figure 6). However, some interactions between the percentage of concentrate and the week were found as pointed out in Table 2. For example, the intake duration spent in cluster 8 (highest intake rate) was reduced by 43.6% ($P = 0.003$) for goats fed the H diet, whereas it

was increased by 38.6% ($P=0.06$) for goats fed the L diet between weeks 4 and 10. The proportion of DM eaten in cluster 8 was numerically decreased by 19.0% ($P=0.10$) for the goats fed the H diet and increased by 22.1% ($P=0.05$) for goats fed the L diet (Figure 6). The proportion of DM eaten in cluster 7 increased between week 4 and 10 ($P=0.01$) at the expense of the proportion of DM eaten in the cluster 5 ($P=0.03$) (Figure 6). The effect of week on the intake duration for the cluster 7 was not significant whereas the intake duration in cluster 5 was decreased. The intake duration of cluster 1 (period almost without intake) was reduced by 38.8% ($P=0.02$) and that of cluster 2 was increased by 82.9% ($P=0.006$) for goats fed the H diet between week 4 and 10, whereas it remained stable for goats fed the L diet. The proportion of DM eaten in cluster 2 was increased by 123.8% ($P<0.001$) for goats fed the H diet (Figure 6). The effect of recording day was never significant.

Table 2. Effect of the percentage of concentrate on ingestive behaviour after the afternoon feeding and pH drop after the morning feeding in weeks 4 and 10 in mid-lactation goats.

Item	Diet ⁶				SEM	P-value ⁷			
	L, Wk4	L, Wk10	H, Wk4	H, Wk10		C	W	CxW	D(W)
Total DMI after 15 h post-feeding (g / kg BW)	30.3 ^{ab}	29.7 ^{ab}	32.8 ^a	29.6 ^b	0.36	0.50	<0.001	<0.001	0.33
P90 ¹	62.7 ^a	66.7 ^a	51.5 ^a	32.5 ^b	3.06	0.01	0.09	0.02	-
Exponential model ² :									
A (g / kg BW)	28.7 ^{ab}	27.3 ^c	32.5 ^a	28.0 ^{bc}	0.42	0.25	<0.001	<0.001	0.61
B (/ min)	0.0126 ^b	0.0146 ^a	0.0090 ^b	0.0040 ^c	0.00065	0.01	0.002	<0.001	<0.001
A x B (g / kg BW / min)	0.372 ^b	0.414 ^a	0.289 ^b	0.107 ^c	0.0199	0.03	<0.001	<0.001	0.001
Segmentation-clustering method ³									
Intake duration (min) ⁴									
1	360.6 ^{ab}	429.1 ^{ab}	463.8 ^a	283.9 ^b	28.08	0.86	0.31	0.01	0.61
2	358.9 ^{ab}	276.0 ^{ab}	242.0 ^b	442.6 ^a	26.05	0.73	0.23	0.004	0.72
3	66.7	92.5	71.5	79.3	8.84	0.84	0.35	0.62	0.87
4	34.6	25.6	16.0	14.7	3.62	0.19	0.42	0.55	0.49
5	40.7 ^a	22.8 ^b	31.7 ^{ab}	20.4 ^b	3.31	0.49	0.03	0.61	0.90
6	24.4 ^{ab}	19.3 ^b	43.3 ^a	30.5 ^{ab}	3.07	0.13	0.09	0.46	0.26
7	10.1	16.3	10.8	13.5	1.61	0.80	0.16	0.58	0.65
8	14.0 ^{ab}	19.4 ^{ab}	22.0 ^a	12.4 ^b	1.21	0.90	0.34	<0.001	0.85
First eating bout ⁵									
Duration (min)	119.8 ^a	127.2 ^a	57.1 ^b	27.9 ^b	7.61	<0.001	0.29	0.11	0.68
Intake (g / kg BW)	20.38 ^a	21.25 ^a	15.29 ^a	7.77 ^b	0.871	0.003	0.003	<0.001	0.39
Rumen pH decrease between 0 and 120 min after the morning feeding	-0.65 ^a	-0.66 ^a	-1.09 ^b	-0.54 ^a	0.059	0.14	0.007	0.005	-

^{a,d} Within a row, means without a common superscript letter differ ($P < 0.05$).

¹ P90 is the proportion of DM eaten at 90 min after the afternoon feeding.

² The cumulative intake profile parameters were derived from the following exponential model: $Cumulative\ DMI(t) = A(1 - e^{-B*t})$.

³ The intake pattern was segmented by detecting slope changes and the resulting segments were classified in 8 clusters according to the intake rate.

⁴ The numbers correspond to the number of the clusters.

⁵ First eating bout was defined by adding the values for the first segments (from clusters 8 to 3) until a segment corresponded to the clusters 2 or 1 was detected (end of the 1st eating bout).

⁶ L = low percentage of concentrate (n = 7 goats), H = high percentage of concentrate (n = 6 goats). Data presented in this table are least squares means.

⁷ C: percentage of concentrate; W: week, C x W: interaction between percentage of concentrate and week, D(W): day (nested within week).

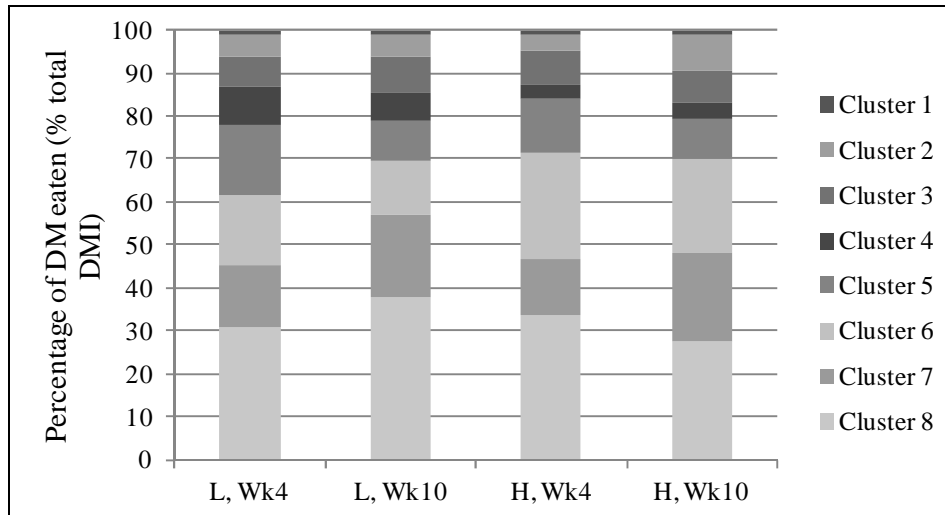


Figure 6. Effect of the percentage of concentrate on the percentage of DM eaten (proportion of total DMI) in the different segments obtained after segmentation and clustering of intake patterns in dairy goats fed experimental TMR with a low (L) or high (H) percentage of concentrate, during 15 h after the afternoon feeding in weeks 4 and 10.

DISCUSSION

P90: a tool to study individual variation in ingestive behaviour

This paper studied individual variation during two periods: the first one where all animals were fed the same diet, whereas for the second one, two diets were compared. Among publications dealing with individual variations of ingestive behaviour, few studies worked with a single diet (Giger-Reverdin et al., 2009; Desnoyers et al., 2011). In our study, the P90 criterion for the basal diet was comprised between 40 and 85 whereas it was comprised between 15 and 65 in the study of Giger-Reverdin et al. (2009). The difference could be explained by the percent of grass hay included in the TMR that was lower (21.9%) in our experiment than that (35%) in the trial of Giger-Reverdin et al. (2009). However, the sugar beet pulp silage was similar between studies (around 15%). A simple typology of ingestive behaviour can be determined according to the proportion of feed allowance eaten during a fixed duration after feeding, such as the P90 criterion. Three groups were described: fast, intermediate and slow eaters.

In our study, ingestive behaviour seemed to be repeatable between days for a same animal, but may evolve depending on the type of feed they were given. On the one hand, animals that were given the L diet had the same intake rate in week 10 as they had in week 1. On the other hand, a change to a more challenging diet (from the basal diet to the H diet) reduced the intake rate. As a result, animals fed the L diet kept the initial between-individual variation between weeks, whereas animals on the H diet reduced it.

The observed linear relationship between P90 and total DMI suggests that fast eaters are also big eaters. In previous studies, fast eaters and fast-efficient-ruminators appeared to have

highest intake capabilities (Deswysen et al., 1987). Higher intake rate can have practical consequences because fast eaters can have an increasing milk production due to the positive relationship between milk production and total DMI (Dado and Allen, 1994), and consequently energy intake, but higher intake rate can also mean higher rate of passage through the digestive tract and then decreased feed efficiency (Fisher et al., 1987). In a previous study, it was shown that milk production of multiparous cows was unrelated to eating rate, whereas production of primiparous cows tended to be related positively to this criterion (Dado and Allen, 1994).

The results concerning the rumen pH decrease during the first hours after morning with the increase of P90 measured after the afternoon feed allowance are in agreement with previously published data (Giger-Reverdin et al., 2009). Even if it is not obvious that there is a direct effect between the morning rumen pH and the ingestive behaviour during the afternoon meal, our results suggest that there is a link between these parameters. This could be explained by a between-animal hierarchy according to their intake rate and cumulated dry matter intake similar after the morning and afternoon feedings. Fast eaters would be more exposed to a higher pH decrease than slow eaters during first hours after feeding. As a consequence, they would be more predisposed to rumen acidosis if they were fed high-concentrate diets (Desnoyers et al., 2011). It should be also taken into account for allocation of animals between diets for experimental purposes in particular in studies dealing with patterns of ruminal fermentation after feeding (Giger-Reverdin et al., 2009).

In this study, there was no possibility of competition for feed between animals because they were housed in individual pens. The housing could largely influence between-individual variations of intake patterns. In fact, when animals are group-fed, it was observed that low-ranking animals increased their intake rate to a greater extent than high ranking ones, because they spend less time at the trough (Harb et al., 1985) and thus can be more sensitive to SARA.

Effect of the percentage of concentrate on ingestive behaviour and rumen pH

In week 4, no effect of the percentage of concentrate was detected on DMI (parameter A of the exponential model, total DMI and DM eaten in the clusters) and the intake rate (parameter A x B, P90). The only effect of this factor concerned the first eating bout, the duration of which was halved in goats fed the H diet compared to goats fed the L diet, whereas the DM eaten during this eating bout was similar between experimental groups. It could be explained by a lower fill effect of the H diet compared with the L diet as was hypothesized in Serment et al. (2011). It led to a fast entry of nutrients into the rumen of goats fed the H diet. As the H diet contained more rapidly fermentable carbohydrates than the L diet, intense fermentations can rapidly occur in the rumen. As the H diet was less fibrous than the L diet, rumination was certainly less favoured and thus buffer production was limited. These elements could explain the greater decrease of pH 2 hours after feeding for those goats.

In week 10, DMI (total DMI, parameter A, DM eaten in the clusters) was similar between experimental groups, while the intake rate (P90, parameter A x B), the duration and the DM eaten during the first eating bout were lower for goats fed the H diet than for goats fed the L diet. Changes between week 4 and 10 were limited for goats fed the L diet, whereas decreases

in intake rate and DMI were observed for goats fed the H diet. Such adaptations of ingestive behaviour by favouring a slow intake rate rather than a fast intake rate were also observed in goats attempting to avoid acidosis when they were fed high-concentrate diets (Desnoyers et al., 2008b). In the present study, goats fed the H diet ate similar total DMI as goats fed the L diet but the DM eaten during the first eating bout was significantly lower. These animals seemed to fractionate more their eating bouts in the period after feeding. This is consistent with observations of Abijaoudé et al. (2000) where goats increased their numbers of eating bouts after the first one and those of Friggens et al. (1998) who observed that cows fed a TMR with a high amount of concentrate (65% DM) are able to express more numerous short-term feeding behaviour (feeding frequency, intake per visit) than cows fed a diet with a low amount of concentrate (30% DM). A slower intake rate during first hours after feeding could lead to a less massive entry of nutrients into the rumen, and thus less rapid fermentations in the rumen. It would allow greater chewing and thus higher salivation and production of buffer. It would explain the smaller pH decrease between week 4 and week 10 for goats fed the H diet. The ingestive behaviour helped to maintain the rumen environment within a certain physiological range, as was also observed in sheep by James and Kyriazakis (2002). Rumen pH used in this study corresponded to the pH measured after the morning feeding. The rumen pH drop must have been higher after the afternoon feeding than after the morning feeding as animals were fed 2/3 of their diet in the afternoon (this was indeed observed in goats with similar conditions of feed distribution by Desnoyers et al. (2008a)).

Comparison of the methods of analysis of ingestive behaviour

Three approaches were used in this study. The use of an index such as P90 could give descriptive information on feeding behaviour and it does not require an expensive system of weighing such as the one used in this study. The second approach consisted in fitting dynamic intake patterns to an exponential model. This model allows the quantification of two global criteria: the principal slope and the asymptote of the curve. This method has the advantage of being easy to apply when data are available. This approach was previously used to model the first eating bout following the feed distribution in cows (Faverdin, 1985) and sheep (Baumont, 1988). Even through accuracy of the exponential model was broadly acceptable, it was not completely satisfactory, notably for curves with successive plateaux. Such curves were principally observed for goats fed the H diets (Figure 5b), which can explain the higher RMSE for those goats than for goats fed the L diet. The last approach is a method proposed by Giger-Reverdin et al. (2012), which segmented intake patterns into 8 clusters. The duration and feed intake in each cluster and during the first eating bout were provided by this method. Information given by duration and feed intake in each cluster was difficult to interpret in this study. However, in a previous study (Giger-Reverdin et al., 2012), this method allowed the identification of animals suffering of acidosis relative to controls, by a reduction of the time spent eating and the percentage of DM eaten in clusters of segments with highest intake rates. The detection of the first eating bout was very informative in order to detect differences between the experimental diets.

All the methods used in this article presented some weaknesses. The use of a method is a trade-off between ease to obtaining and interpreting information and closeness to the behavioural reality. The methods are complementary to interpret the data.

CONCLUSIONS

Goats kept under the same conditions on the same feeds showed considerable individual variability in ingestive behaviour. These individual differences showed a high degree of repeatability, being maintained across six weeks in a stable environment. When the feed was changed to one that was more likely to provoke rumen acidosis, animals adapted their feeding behaviour, with a consequent reduction in between-individual variability. However, because of the relationship between the intake rate and rumen pH drop, fast eaters remain predisposed to experience rumen acidosis in the short term, when fed a high-concentrate diet. Ingestive behaviour should be taken into account in experimental studies, especially in studies dealing with rumen fermentation.

ACKNOWLEDGMENTS

J. Teissier, A. Eymard, G Durandet, J.-P. Bonte and J. Chevallier (INRA, UMR791 Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, Paris and Thiverval-Grignon, France) are gratefully acknowledged for obtaining research data on goats. We thank A. Séverin (INRA, UMR791) for her help during data treatments, and H. W. Erhart, P. Morand-Fehr and N. C. Friggens (INRA-AgroParisTech, UMR791) for their useful comments and rereading the manuscript.

REFERENCES

- Abijaoudé, J. A., P. Morand-Fehr, J. Tessier, P. Schmidely, and D. Sauvant. 2000. Diet effect on the daily feeding behaviour, frequency and characteristics of meals in dairy goats. *Livest. Prod. Sci.* 64:29-37.
- Agle, M., A. N. Hristov, S. Zaman, C. Schneider, P. M. Ndegwa, and V. K. Vaddella. 2010. Effect of dietary concentrate on rumen fermentation, digestibility, and nitrogen losses in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:4211–4222.
- Baumont, R. 1988. Cinétique d'ingestion lors du grand repas chez le mouton : influence du temps d'accès au foin et de son ingestibilité. *Reprod. Nutr. Develop.* 28:183-184
- Dado, R. G., and M. S. Allen. 1994. Variation in and relationships among feeding, chewing, and drinking variables for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77:132-144.
- Desnoyers, M., C. Duvaux-Ponter, K. Rigalma, S. Roussel, O. Martin, and S. Giger-Reverdin. 2008a. Effect of concentrate percentage on ruminal pH and time-budget in dairy goats. *Animal* 2:1802-1808.

- Desnoyers, M., S. Giger-Reverdin, C. Duvaux-Ponter, E. Lebarbier, and D. Sauvant. 2008b. Modélisation des épisodes d'acidose sub-clinique et du comportement alimentaire associé : application à la chèvre laitière. *Renc. Rech. Ruminants* 15:339-343.
- Desnoyers, M., S. Giger-Reverdin, C. Duvaux-Ponter, and D. Sauvant. 2009. Modeling of off-feed periods caused by subacute acidosis in intensive lactating ruminants: Application to goats. *J. Dairy Sci.* 92:3894-3906.
- Desnoyers, M., S. Giger-Reverdin, D. Sauvant, and C. Duvaux-Ponter. 2011. The use of a multivariate analysis to study between-goat variability in feeding behavior and associated rumen pH patterns. *J. Dairy Sci.* 94:842-852.
- Deswysen, A. G., W. C. Ellis, and K. R. Pond. 1987. Interrelationships among voluntary intake, eating and ruminating behavior and ruminal motility of heifers fed corn silage. *J. Anim. Sci.* 64:835-841.
- DeVries, T. J., K. A. Beauchemin, F. Dohme, and K. S. Schwartzkopf-Genswein. 2009. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: feeding, ruminating, and lying behavior. *J. Dairy Sci.* 92:5067–5078.
- DeVries, T. J., K. A. Beauchemin, and M. A. G. von Keyserlingk. 2007. Dietary forage concentration affects the feed sorting behavior of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:5572–5579.
- Dulphy, J. P., B. Carle, and C. Demarquilly. 1990. Quantités ingérées et activités alimentaires comparées des ovins, bovins et caprins recevant des fourrages conservés avec ou sans aliment concentré. I. Etude descriptive. *Ann. Zootech.* 39:95-111.
- Faverdin, P. 1985. Régulation de l'ingestion des vaches laitières en début de lactation. PhD Thesis, Institut National Agronomique, Paris Grignon, 131 pp.
- Fisher, D. S., J. C. Burns, and K. R. Pond. 1987. Modeling ad libitum dry matter intake by ruminants as regulated by distension and chemostatic feedbacks. *J. theor. Biol.* 126:407-418.
- Focant, M. 1984. Comportement alimentaire, rumination, fermentations réticulo-ruminales et acides gras volatils plasmatiques, comparés chez la chèvre et le mouton ; influence du régime. *Reprod. Nutr. Develop.* 24:239-250.
- Friggens, N. C., B. L. Nielson, I. Kyriazakis, B. J. Tolcamp, and G. C. Emmans. 1998. Effects of feed composition and stage of lactation on the short-term feeding behavior of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:2368-3277.
- Giger-Reverdin, S., C. Duvaux-Ponter, and D. Sauvant. 2009. Relationships between feed intake variability and rumen pH in mid-lactating goats fed an acidogenic diets. Page 792–793 in *Proceedings of the XIth International Symposium on Ruminant Physiology*. Y. Chilliard, F. Glasser, Y. Faulconnier, F. Bocquier, I. Veissier, and M. Doreau (Ed.), Clermont-Ferrand, France, 6 – 9 September 2009, p. 792–793.
- Giger-Reverdin, S., E. Lebarbier, C. Duvaux-Ponter, and M. Desnoyers. 2012. A new segmentation-clustering method to analyse feeding behaviour of ruminants from within-day cumulative intake patterns. *Computers and Electronics in Agriculture* DOI: 10.1016/j.compag.2012.02.007.

- Gonçalves, A. L., R. d. P. Lana, M. T. Rodrigues, R. A. M. Vieira, A. C. Queiroz, and D. S. Henrique. 2001. Padrão nictemeral do pH ruminal e comportamento alimentar de cabras leiteiras alimentadas com dietas contendo diferentes relações volumoso:concentrado. *Rev. Bras. Zootecn.* 30:1886-1892.
- Harb, M. Y., V. S. Reynolds, and R. C. Campling. 1985. Eating behavior, social dominance and voluntary intake of silage in group-fed milking cattle. *Grass Forage Sci.* 40:113-118.
- James, S. M., and I. Kyriazakis. 2002. The effect of consumption of foods that differ in energy density and/or sodium bicarbonate supplementation on subsequent diet selection in sheep. *Br. J. Nutr.* 88:81-90
- Johnson, T. R., and D. K. Combs. 1992. Effects of inert rumen bulk on dry matter intake in early and midlactation cows fed diets differing in forage content. *J. Dairy Sci.* 75:508-519.
- Kononoff, P. J., and A. J. Heinrichs. 2003. The effect of reducing alfalfa haylage particle size on cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 86:1445-1457.
- Landau, S., N. Silanikove, Z. Nitsan, D. Barkai, H. Baram, F. D. Provenza, and A. Perevolotsky. 2000. Short-term changes in eating patterns explain the effects of condensed tannins on feed intake in heifers. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 69:199-213.
- Nocek, J. E. 1997. Bovine acidosis: Implications on laminitis. *J. Dairy Sci.* 80:1005-1028.
- Rapetti, L., A. Tamburini, G. M. Crovetto, G. Galassi, and G. Succi. 1997. Energy utilization of diets with different hay proportions in lactating goats. *Zootec. Nutr. Anim.* 23:317-328.
- Santini, F. J., C. D. Lu, M. J. Potchoiba, J. M. Fernandez, and S. W. Coleman. 1992. Dietary fiber and milk yield, mastication, digestion, and rate of passage in goats fed alfalfa hay. *J. Dairy Sci.* 75:209-219.
- SAS Institute. 2000. User's Guide. Release 11.04. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Serment, A., P. Schmidely, S. Giger-Reverdin, P. Chapoutot, and D. Sauvant. 2011. Effects of the percentage of concentrate on rumen fermentation, nutrient digestibility, plasma metabolites and milk composition in mid-lactation goats. *J. Dairy Sci.* 94:3960-3972.
- Yang, W. Z., and K. A. Beauchemin. 2007. Altering physically effective fiber intake through forage proportion and particle length: digestion and milk production. *J. Dairy Sci.* 90:3410-3421.

CHAPITRE 3 : Essais *in vitro*

Introduction

Ce chapitre décrit les deux essais *in vitro* réalisés (Articles 4 et 5 ; **Figure 55**). La technique *in vitro* utilisée est une adaptation de la méthode des seringues de l'université d'Hohenheim (Menke et al., 1979), qui permet de mesurer les dynamiques des fermentations des aliments (Maaroufi et al., 2009). Ces essais ont permis d'augmenter le nombre de facteurs expérimentaux par rapport à l'essai *in vivo* :

- pourcentage de concentrés du substrat incubé (rations L ou H, les mêmes rations que celles utilisées dans l'essai *in vivo*) ;
- adaptation ou non de l'inoculum au substrat (animaux-donneurs recevant les rations L ou H), qui a permis d'évaluer l'activité des microorganismes en présence ;
- et supplémentation en huiles (AG polyinsaturés).

Lors de ces essais, des mesures qu'il n'avait pas été possible de faire dans notre contexte expérimental *in vivo* (production de gaz), ont été réalisées, en supplément des mesures des paramètres ruminiaux déjà réalisées en *in vivo*.

L'expérimentation *in vitro* a permis également d'explorer des niveaux sous-jacents par rapport à ce qui a été réalisé *in vivo*. Notamment, des bilans à l'échelle des éléments chimiques (carbone, hydrogène) ont pu être réalisés. Ce travail s'est appuyé sur la connaissance des réactions chimiques se produisant dans le rumen (relations stœchiométriques) (Article 4 et Complément).

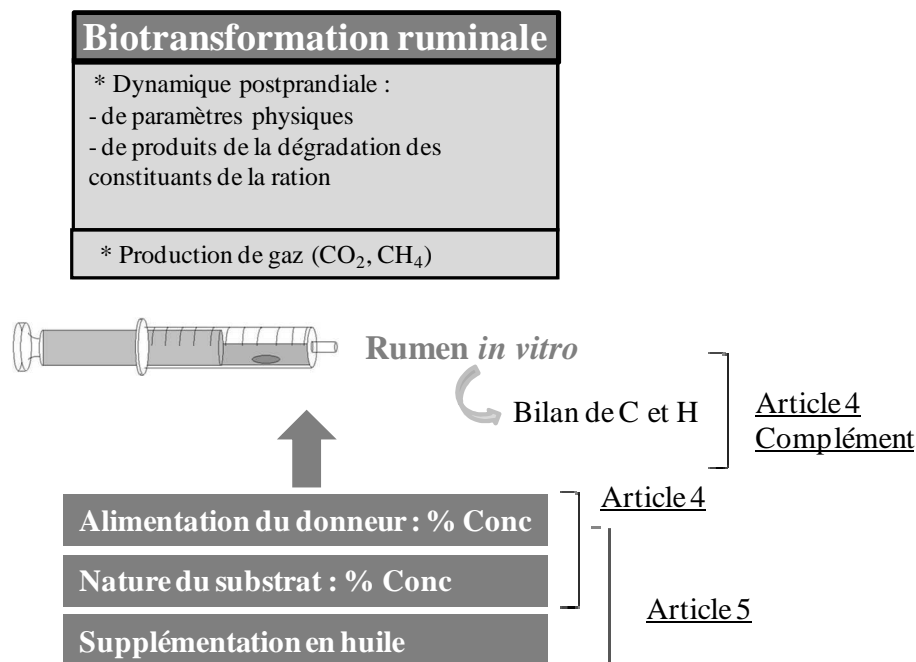


Figure 55 : Descriptif des essais in vitro.

I. **ARTICLE 4 : Influence du pourcentage de concentrés sur les dynamiques de fermentation *in vitro***

RESUME DE L'ARTICLE 4

Objectifs :

Les techniques *in vitro* sont des outils intéressants pour prédire la valeur nutritionnelle des aliments chez les ruminants et caractériser la dynamique des fermentations ruminales. Du fait de l'influence du régime sur l'écosystème microbien, sur l'activité enzymatique des microbes et sur les conditions physico-chimiques dans le rumen, le régime des animaux donneurs de jus de rumen peut influencer les résultats des fermentations conduites *in vitro*, en termes d'intensité et de dynamique. De plus, l'influence relative du régime du donneur et du substrat sur les fermentations n'a jamais été clairement étudiée. Ainsi le premier objectif de cette étude a été de quantifier cette influence relative en étudiant les fermentations ruminales (acides gras volatils – AGV, glucides solubles, ammoniac - $\text{NH}_3\text{-N}$ et pH), la production et la composition de gaz (méthane - CH_4 , dioxyde de carbone – CO_2 et hydrogène – H_2) à différentes durées d'incubation.

L'étude de la stœchiométrie des fermentations ruminales (carbone et hydrogène moléculaire) permet de comprendre la partition des produits issus de la dégradation et de la fermentation des constituants de la ration, entre des produits « utiles » (AGV et biomasse microbienne) et des produits « inutilisables » (CH_4 , CO_2). De nombreux auteurs ont étudié les relations entre la production d'AGV et la production de gaz, mais leurs calculs n'ont pas toujours été validés par des mesures de la composition des gaz. Le second objectif de cette étude était d'effectuer ces calculs sur nos données.

Matériels et Méthodes

Les substrats utilisés dans cette étude étaient deux rations mixtes : une ration pauvre en concentrés (L ; 35 % MS) et une ration riche en concentrés (H ; 70 % MS). Six chèvres en milieu de lactation et canulées du rumen ont reçu *ad libitum* pendant 3 semaines, soit la ration L pour 3 d'entre elles, soit la ration H pour les 3 autres. Ainsi les 2 substrats ont été incubés dans des mélanges composés d'une solution tampon et de jus de rumen prélevés chez ces chèvres (appelé inoculum). La technique *in vitro* utilisée dans cette étude est une adaptation de la méthode des seringues de l'université d'Hohenheim (Menke et al., 1979), qui permet de mesurer les dynamiques des fermentations (Maaroufi et al., 2009). Avec cette méthode, les mesures peuvent être réalisées en stoppant les fermentations et en prélevant simultanément un échantillon de gaz et des jus de fermentation. Les durées d'incubation choisies dans cette étude étaient 0, 3, 6, 9, 12 et 24 h. Les productions d'AGV et de CH_4 ont été interprétées en termes de productions théoriques de gaz, d' H_2 moléculaire et d'adénosine triphosphate (ATP), selon les relations stœchiométriques classiquement rapportées dans la littérature.

Résultats et Discussion :

L'effet du pourcentage de concentrés étudié dans cet essai, peut être attribué au substrat incubé et à l'inoculum (influencé lui-même par le régime des animaux donneurs). Pour la majorité des mesures réalisées et quelle que soit la durée d'incubation, le substrat et l'inoculum ont conduit aux mêmes effets : d'une part, une augmentation de la production de gaz totaux, de CH₄ et de CO₂, des concentrations en glucides solubles et en AGV totaux et, d'autre part, une diminution du ratio acétate sur propionate et de la concentration en NH₃-N, pour l'inoculum et le substrat H comparativement à l'inoculum et au substrat L. L'effet de l'inoculum est néanmoins prédominant par rapport à celui du substrat. Cela est certainement dû à la faible quantité de substrat dans la seringue par rapport au volume de jus de rumen présent dans l'inoculum. De plus, la production d'H₂ moléculaire estimée à partir des relations stœchiométriques et la production de CH₄ mesurée présentent une relation quadratique. Lorsque l'H₂ moléculaire est très disponible dans le milieu, la production de CH₄ semble saturée. Environ 89 % de H₂ moléculaire estimé ont été capturés pour produire du CH₄. Moins d'1 % de l'H₂ moléculaire estimé a été récupéré sous forme d'H₂ gazeux. La production d'ATP estimée a été plus importante avec l'inoculum et le substrat H qu'avec l'inoculum et le substrat L.

Conclusion :

Cette étude *in vitro* a permis d'évaluer l'impact du substrat et de l'inoculum (régime du donneur) sur les fermentations ruminales. Les effets du substrat et de l'inoculum sont additifs avec un effet prédominant de l'inoculum. Cette étude a généré un nombre important de mesures effectuées simultanément, qui peuvent servir pour la construction ou l'amélioration de modèles mécanistes qui prédisent le fonctionnement ruminal.

***In vitro* fermentation and methane production during the incubation of total mixed rations differing by the percentage of concentrate in rumen fluid from goats fed these diets**

A. Serment, ^{a,b,*} S. Giger-Reverdin, ^{a,b} P. Schmidely, ^{a,b} O. Dhumez, ^{a,b} L. P. Broudiscou, ^{a,b} and D. Sauvant ^{a,b}

^a AgroParisTech, UMR791 Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, 16 rue Claude Bernard, F-75005 Paris, France

^b INRA, UMR791 Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, 16 rue Claude Bernard, F-75005 Paris, France

* Corresponding author: Amélie Serment
tel.: 33 1 44 08 17 66; fax: 33 1 44 08 18 53
E-mail address: amelie.serment@agroparistech.fr

En préparation pour Journal of the Science of Food and Agriculture

ABSTRACT

The principal aim of this study was to examine *in vitro* fermentation of two total mixed rations, varying by their percentage of concentrate (low-concentrate diet (L): 35% vs. high-concentrate diet (H): 70% on dry matter basis) through the measurement of cumulative gas production and its composition in carbon dioxide (CO₂), methane (CH₄) and hydrogen (H₂), as well as volatile fatty acid (VFA) concentration and profile, soluble carbohydrate (SC) and ammonia (NH₃-N) concentrations, and pH of the fermentation fluid. Six ruminally cannulated goats were fed *ad libitum* twice a day, either the L diet for three of them or the H diet for the others. The incubation of the substrates L and H occurred in mixes composed of rumen fluid from these dairy goats and buffer solution (mix hereafter called inoculum). The fermentation evolutions were studied using a syringe gas-test method at the incubation times of 0, 3, 6, 9, 12 and 24 h. The effect of the percentage of concentrate studied in this experiment can be attributed to the simultaneous effects of the incubated substrate and the diet fed the animal donors and thus the inoculum. For the majority of the measurements, and whatever the incubation time, the inoculum and the substrate led to the same type of effects: higher cumulative gas production, CO₂ and CH₄ productions, SC and VFA concentrations, and lower acetate to propionate ratio and NH₃-N concentration with the H inoculum and substrate compared with the L ones. However, the effect of the inoculum was generally predominant in comparison with the effect of the substrate, probably due to the low concentration of substrate in the volume of rumen fluid in the syringe. Further, the productions of VFA and CH₄ were interpreted in terms of theoretical production of gas, molecular H₂ and adenosine triphosphate (ATP), according to the classic stoichiometric assumptions. The estimated molecular H₂ production captured in the CH₄ exhibited a quadratic relationship and on average 89% of molecular H₂ was used to produce CH₄. Less than 1% of estimated molecular H₂ were recovered as gaseous H₂. The estimated ATP production was higher with the H inoculum or substrate H than with the L inoculum or substrate ($P < 0.001$). This work generated a large number of simultaneous measurements, which could be used for building or improving mechanistic models aimed at predicting rumen functioning.

Key words: *in vitro* gas production, methane production, rumen, percentage of concentrate

Abbreviations: ADFom, acid detergent fibre expressed exclusive of residual ash or lignocellulose; ADL, lignin determined by solubilization of cellulose with sulphuric acid; aNDFom, neutral detergent fibre assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash; A:P ratio, acetate to propionate ratio; ATP, Adenosine triphosphate; BCVFA, branched-chain volatile fatty acids; BW, body weight; DIM, day in milk; DM, dry matter; DMI, dry matter intake; DOM, digestible organic matter; FA, fatty acid; FOM, fermented organic matter; GLM, Generalized Linear Model; N, nitrogen; NH₃, ammonia; OM, organic matter; RMY, raw milk yield; SC, soluble carbohydrates; SEM., standard error of the mean; TMR, total mixed ration; VFA, volatile fatty acid

INTRODUCTION

The *in vitro* techniques are interesting tools to predict ruminant feedstuff value and characterize dynamics of rumen fermentation. Several factors may influence the *in vitro* fermentations such as the time (Menke and Steingass, 1988; Cone et al., 1996; Payne et al., 2002) and the frequency (Nagadi et al., 1999) of the collection of rumen fluid or the rumen fluid concentration in buffer solution (Pell and Schofield, 1993; Rymer et al., 1999; Mould et al., 2005a). As the diet largely influences the microbial ecosystem, microbial enzymatic activities, and the physicochemical conditions in the rumen (Latham et al., 1971; Oshio et al., 1987; Hristov et al., 2001.; Brown et al., 2006), the diet of the donor animals can also influence results of the *in vitro* fermentation of the tested substrates, notably the total gas production or its production profile (Trei et al., 1970; Nagadi et al., 2000). However, influence of the diet of the donor animals on other measurements, such as pH, volatile fatty acid (VFA) concentration and profile, ammonia (NH₃-N) concentration or methane (CH₄) production, was rarely reported in the literature (Huntington et al., 1998; Nagadi et al., 2000). Further, the relative impact of the diet of the donors (and thus the inoculum) and the substrate on the fermentations has not been clearly separated.

Stoichiometry of carbon and hydrogen in rumen fermentation can allow to understand the partition of degradable dietary compounds between useful fermentation products (VFA and microbial biomass) and waste products such as CH₄ and carbon dioxide (CO₂). Several authors studied the relationship between VFA and gas production in an *in vitro* device (Blümmel et al., 1999; Blümmel et al., 2003), but their calculations were not always validated by measurements of gas composition.

The first objective of this study was to quantify the relative effects of the inoculum and the substrate on ruminal fermentations, gas production, and notably CH₄ production at different incubation times. Substrates used in this study were two total mixed rations differing by their percentage of concentrate, which were also fed to the donor animals. These total mixed rations were previously studied in an *in vivo* study (Serment et al., 2011). An adaptation of the syringes' method of Hohenheim University (Menke et al., 1979) which allows to measure dynamic patterns of fermentation and gas production (Maaroufi et al., 2009) was used. With this method, measurements can be performed by stopping the incubation and sampling simultaneously gas and incubation content of the syringe.

The second objective of this study was to validate the estimation of the flows of carbon and hydrogen in the syringes from the stoichiometry of VFA by gas measurements.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of the Substrates

The tested substrates were two total mixed rations (TMR) differing by their percentage of concentrate: high-concentrate percentage (H, 70% of concentrate / DM) vs. low-concentrate percentage (L, 35% of concentrate / DM). Both substrates were composed of grass hay,

dehydrated alfalfa hay (Rumiluz, Désialis, Paris, France) for the forage part, and of a commercial concentrate (Agralys Aliment, Châteaudun, France) and sugar beet pulp silage for the concentrate part, as previously described by Serment et al. (2011). Soybean meal and palm oil calcium salt were added to the concentrate part of the L substrate (Ls) to have similar calculated crude protein and total fatty acid (FA) content as the H substrate (Hs). The ingredient composition of both substrates is given in Table 1.

Samples of each substrate were dried at 60°C in an air-oven for 48 h, and ground to pass through a 1 mm sieve using a hammer mill (Retsch GmbH, Haan, Germany). About 200 mg DM of sample were exactly weighed into a 100 mL calibrated glass syringes with pistons lubricated with vaseline (Menke et al., 1979).

Dry matter content of the substrates was determined by oven-drying at 103°C for 24 h (AFNOR, 1982). Ash and starch contents were analysed according to ISO (1978) and AFNOR (1997) methods, respectively. Cell wall content was estimated by the neutral detergent fibre method of Van Soest and Wine (1967) modified by Giger et al. (1987) with the use of a heat stable alpha-amylase but without sodium sulfite and decalin as proposed by Robertson and Van Soest (1981) and expressed exclusive of residual ash (aNDFom). Lignocellulose (ADFom) and H₂SO₄ 72% lignin (ADL) were obtained using a sequential approach on the NDF residue (Giger et al., 1987) and expressed exclusive of residual ash. Total N was determined by the Dumas technique (Sweeney and Rexroad, 1987). Analysis of FA content was described by Andrade and Schmidely (2006) with an extraction of lipid achieved according to Folch et al. (1957).

Table 1. Ingredient composition, chemical composition, and nutritive values of the experimental substrates.

	Substrate ¹	
	L substrate	H substrate
Ingredients (g/100 g of DM)		
Forage:	65	30
Grass hay	29.9	13.8
Dehydrated alfalfa ²	35.1	16.2
Concentrate:	35	70
Commercial concentrate ³	20	50
Sugar beet pulp silage	7	20
Calcium salt of palm oil	1.4	-
Soybean meal	6.6	-
Chemical composition and nutritive values (g/100 g of DM)		
Crude Protein	14.4	14.1
aNDFom	40.5	32.6
ADFom	23.0	18.0
ADL	3.12	2.30
Starch	4.39	9.39
Ash	8.40	7.05
Fatty Acid	2.35	2.55
Calculated PDIME ⁴	49.6	56.5
Calculated DOM ⁵	60.2	66.0
Calculated FOM ⁶	53.4	60.9

¹ L substrate: total mixed ration with a low percentage of concentrate, H substrate: total mixed ration with a high percentage of concentrate.

² Rumiluz, Désialis, Paris, France.

³ Agralys Aliment, Châteaudun, France. Composition: 18% Maize, 14% Sugar beet pulp, 12% Sunflower meal, 10% Wheat, 10% Soybean, 9% Rapeseed meal, 6% Soybean meal, 4% Wheat distiller, 3.5% Linseed, 3% Pea seed, 1% Rapeseed oil, 3% Molasses, 6.5% Mineral and Vitamin premix.

⁴ PDIME: Microbial protein digestible at the level of the intestine when the energy is limiting, calculated according to the additive method from INRA tables (Baumont *et al.*, 2007).

⁵ DOM: Digestible Organic Matter, assuming a OM total-tract digestibility of the L substrate and the H substrate equal to $65.7 \pm 1.31\%$ and $71.0 \pm 1.31\%$, respectively (Serment *et al.*, 2011).

⁶ FOM: Fermentable Organic Matter, assuming 145 g microbial nitrogen per kg of FOM.

Animals, Diets and Preparation of the Inocula

Rumen contents were collected before the morning feeding from six ruminally fistulated Alpine or Saanen goats (BW = 72 ± 7.2 kg, DMI = 2.9 ± 0.32 kg/d) in mid-lactation (DIM = 101 ± 3.6 d; RMY = 3.2 ± 0.51 kg). Diets fed to the animal donors were the same as substrates, but without grinding. Three goats were fed the H diet and the three other were fed the L diet for 3 weeks before the first collection of rumen contents. Animals were fed *ad libitum* twice a day. Goats of both groups were housed and maintained under similar conditions, in accordance with the French legislation on animal experimentation in line with the European Convention for the Protection of Vertebrates used for Experimental and other Scientific Purposes (European Directive 86/609).

Samples of rumen contents of each goat were filtered through a nylon cloth (150 µm-pore). Rumen fluids from goats were pooled within their experimental group and transferred into a pre-warmed thermos flask saturated with CO₂. The two thermos flasks were transported immediately to the laboratory.

Buffered mineral solution (Menke and Steingass, 1988) was prepared and placed into two bottles in a waterbath at 39°C under continuous flushing with CO₂. The H and L inocula (Hi and Li) were prepared by adding to the prewarmed buffer mineral solution (1:2 v/v) the rumen fluids from animals fed the H diet and the B diet respectively. These operations were done with constant stirring, in a water bath at 39°C, under continuous flushing with CO₂.

In Vitro Gas Production Technique and Experimental Design

Gas production was determined by using an adaptation of the initial gas-test method described by Menke and Steingass (1988). This adaptation allows a dynamic study of substrate fermentation (Maaroufi et al., 2009). In this study, incubation times were 3, 6, 9, 12 and 24 h. The experiment used a 2 x 2 factorial arrangement of treatments. The main effects were the inoculum type (Li vs. Hi) and the substrate type (Ls vs. Hs), given 4 treatments LiLs, LiHs, HiLs, HiHs. For each fermentation run, 10 syringes were allocated to each treatment (Table 2).

These syringes were each filled with about 30 mL of inoculum containing 200 mg DM of substrate. Seventeen supplementary syringes were filled only with inoculum ('blank': 8 with Hi and 9 with Li). Syringes were assigned to a specific incubation time so that at each incubation time, each experimental combination was duplicated, except for blanks at 12 h (for Hi) and 24 h (for Hi and Li). Each run was repeated 4 times (4 successive days) with a new collection of rumen content for each run. All handling was under continuous flushing with CO₂. After closing the clips, the initial volume was recorded and the syringe was placed in a rotor inside an incubator at 39°C. The rotor, in which the syringes were placed, contains 57 syringes.

Table 2. Experimental design giving the number of syringes per run allocated to each treatment combination.

	Blank ¹		Substrate + Inoculum ¹			
Inoculum ²	Li	Hi	Li	Li	Hi	Hi
Substrate ³	-	-	Ls	Hs	Ls	Hs
Incubation time (h)	Number of concerned syringes					
0						
3	2	2	2	2	2	2
6	2	2	2	2	2	2
9	2	2	2	2	2	2
12	2	1	2	2	2	2
24	1	1	2	2	2	2

¹ Blank: syringe containing only 30 mL of inoculum; Substrate + Inoculum: syringe containing 30 mL of inoculum and 20 mg DM of substrate.

² L inoculum (Li): mix of rumen fluid from 3 goats fed a total mixed ration with 35% of concentrate and buffer mineral solution (1:2 v/v); H inoculum (Hi): mix of rumen fluid from 3 goats fed a total mixed ration with 70% of concentrate and buffer mineral solution (1:2 v/v).

³ L substrate (Ls): total mixed ration with 35% of concentrate; H substrate (Hs): total mixed ration with 70% of concentrate.

Gas Volume and Gas Composition Measurements, Sampling and Analytical Methods

At each incubation time, syringes were rapidly removed from the incubator and gently shaken. Gas volumes were recorded and syringes were put back into the incubator until the following incubation time, except syringes assigned to this specific incubation time. At 3 and 12 h, before being put back into the incubator, syringes were degassed. After gas volume recording, the syringes assigned to the specific incubation time were rapidly placed at 4°C to stop fermentation. Two mL of gas were sampled from each syringe and analysed by micro gas-chromatography (Varian, Les Ulis, France) and composition of gases (CH₄, CO₂, H₂) was determined. Calibration was done with a mixture of gases prepared by Air Liquide (Air Liquide, Mitry-Mory, France). The syringe was then emptied and pH was immediately determined. Two aliquots of fermentation fluid (3 mL) were acidified with 25% H₃PO₄ (vol/vol) and kept at -20°C until the analysis of NH₃-N with an autoanalyser (Technicon, Oise - France), according to the method of Weatherburn (1967) and until analysis of VFA by gas chromatography (Kristensen, 2000). A third aliquot of fermentation fluid (3 mL) was mixed with 0.15% HCl (vol/vol) and stored at -20°C until the analysis of soluble carbohydrates (SC) with an autoanalyser (Technicon, Oise, France), according to the method of Brown and Boston (1961). The SC resulted from the reduction of free sugars and fructosans were expressed as glucose equivalent. Samples of the rumen fluids used to create Hi and Li were also sampled and analysed as previously described.

Calculations and Statistical Analysis

Data were expressed on a standard basis of 200 mg DM (except for 'blanks') and of 30 mL. Cumulative gas production was calculated for each syringe from corrected gas volume

recordings. Gas composition was studied by time intervals: 0 – 3 h, 3 – 12 h and 12 – 24 h of incubation.

Statistical analyses were done for each incubation time separately or by time interval for gas composition. Data from rumen fluids and from ‘blanks’ were analysed using the GLM procedure of SAS (SAS Institute, 2000) according to the following model:

$$Y_{ikl} = \mu + \alpha_i + \gamma_k + \varepsilon_{ikl}$$

Y_{ikl} is the dependant variable, μ the overall mean, α_i the effect of the inoculum (for rumen fluids: H vs. L; within blanks: Hi vs. Li; 1df), γ_k the effect of the day of run (3 df) and ε_{ikl} the residual error and l the index of replication (equal to 2 for data from blanks at 3, 6, 9 h). Data from syringes containing a substrate and an inoculum were analysed using the GLM procedure of SAS (SAS Institute, 2000):

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha*\beta_{ij} + \gamma_k + \varepsilon_{ijkl}$$

Y_{ijkl} is the dependant variable, μ the overall mean, α_i the effect of the inoculum (Hi. vs. Li, 1 df), β_j the effect of the substrate (Hs vs. Ls, 1 df), $\alpha*\beta_{ij}$ the effect of the interaction between the substrate and the inoculum (1 df), γ_k the effect of the day of run (3 df), ε_{ijkl} the residual error, and l the index of replication (equal to 2).

Significant differences were accepted if $P \leq 0.05$. All the data presented in this paper are least-squares means \pm SEM.

To go further in the interpretation of data, several calculations were performed on them. The productions of VFA were used to calculate the theoretical production of gas, of molecular hydrogen (H_2) and ATP as follows. Gas produced in this *in vitro* technique was gas directly produced as an outcome of fermentation (CO_2 and CH_4) and the indirect gas produced by the buffering of VFA (Blümmel et al., 1999; Mould et al., 2005b). The direct production (mmol of carbon / mmol VFA) was estimated from stoichiometric equations proposed by Blümmel et al. (1999):

$$\text{Direct gas production} = 1 * \text{Acetate} + 2 * \text{Butyrate} + 1 * \text{Minor VFA}$$

The indirect production was calculated assuming that 1 mmol of neutralized VFA is accompanied by 1 mmol of CO_2 (Mould et al., 2005b). Moreover, to better interpret the differences in CH_4 production, theoretical molecular H_2 production (mmol of carbon / mmol VFA) occurring during fermentations was calculated by classic stoichiometric assumptions (Demeyer, 1991):

$$H_2 \text{ production} = 2 * \text{Acetate} - 1 * \text{Propionate} + 2 * \text{Butyrate}$$

Potential CH_4 production was assumed to be 0.25 of the molecular H_2 production (Demeyer, 1991). The ATP production (mmol / mmol VFA) was calculated from VFA and CH_4 production (Isaacson et al., 1975):

$$\text{ATP production} = 2 * \text{Acetate} + 3 * \text{Propionate} + 3 * \text{Butyrate} + 1 * CH_4$$

Microbial growth was indirectly predicted, by using a mean Y_{ATP} value of 15 g of microbial growth / mmol ATP.

RESULTS

Chemical Composition and Nutritive Values of the Experimental Substrates (diets fed to the donor animals)

Compared with the L substrate, the H substrate had lower aNDFom and ADFom contents, and higher starch content and calculated DOM and FOM (Table 1).

Characteristics of Rumen Fluids

The effect of the day of collection of rumen content was not significant, except for the concentration of total VFA. Consequently, rumen fluids used to create the inocula were homogenous between days. Increasing the dietary percentage of concentrate didn't affect the concentration of total VFA and the proportion of valerate in rumen fluid (Table 3). However, it modified the molar proportions of each VFA by decreasing the proportion of acetate and branched-chain VFA (BCVFA), and increasing the proportions of propionate, butyrate and the acetate to propionate ratio (A:P ratio) (Table 3). Increasing the dietary percentage of concentrate decreased or tended to decrease rumen NH₃-N concentration and pH, whereas it increased rumen SC concentration (Table 3).

Fermentation in “blanks”

Whatever the incubation time, cumulative gas production was higher in syringes containing Hi than in those containing Li (Figure 1a). Moreover, the productions of CH₄, CO₂ and H₂ were higher in syringes containing Hi than in those containing Li, except for CO₂ ($P = 0.07$) and H₂ between 12 and 24 h (Table 4). The CO₂ to CH₄ ratio was lower with Hi than with Li between 0 and 3 h (Table 4).

The concentration of SC was higher in syringes containing Hi than in those containing Li at 3, 6 and 9 h (Figure 1b). Whatever the incubation time, the concentration of total VFA, the proportions of butyrate and valerate were higher in syringes containing Hi than in those containing Li, whereas the proportion of acetate and the A:P ratio were lower (Figure 1c, Table 5). The proportion of propionate was higher in syringes containing Hi than in those containing Li at 3 and 6 h whereas the proportion of BCVFA was lower at 3, 6 and 9 h (Table 5). The concentration of NH₃-N increased during the first 12 h of incubation and was lower in syringes containing Hi than in those containing Li (Figure 1d). The pH was lower in syringes containing Hi than in those containing Li (Figure 1e)

Table 3. Characteristics of rumen fluids collected during the in vitro experiment from rumen cannulated goats fed low-concentrate diet (L, 3 goats) or high-concentrate diet (H, 3 goats) for 4 successive days. Analyses were done on rumen fluids pooled by diet and per day.

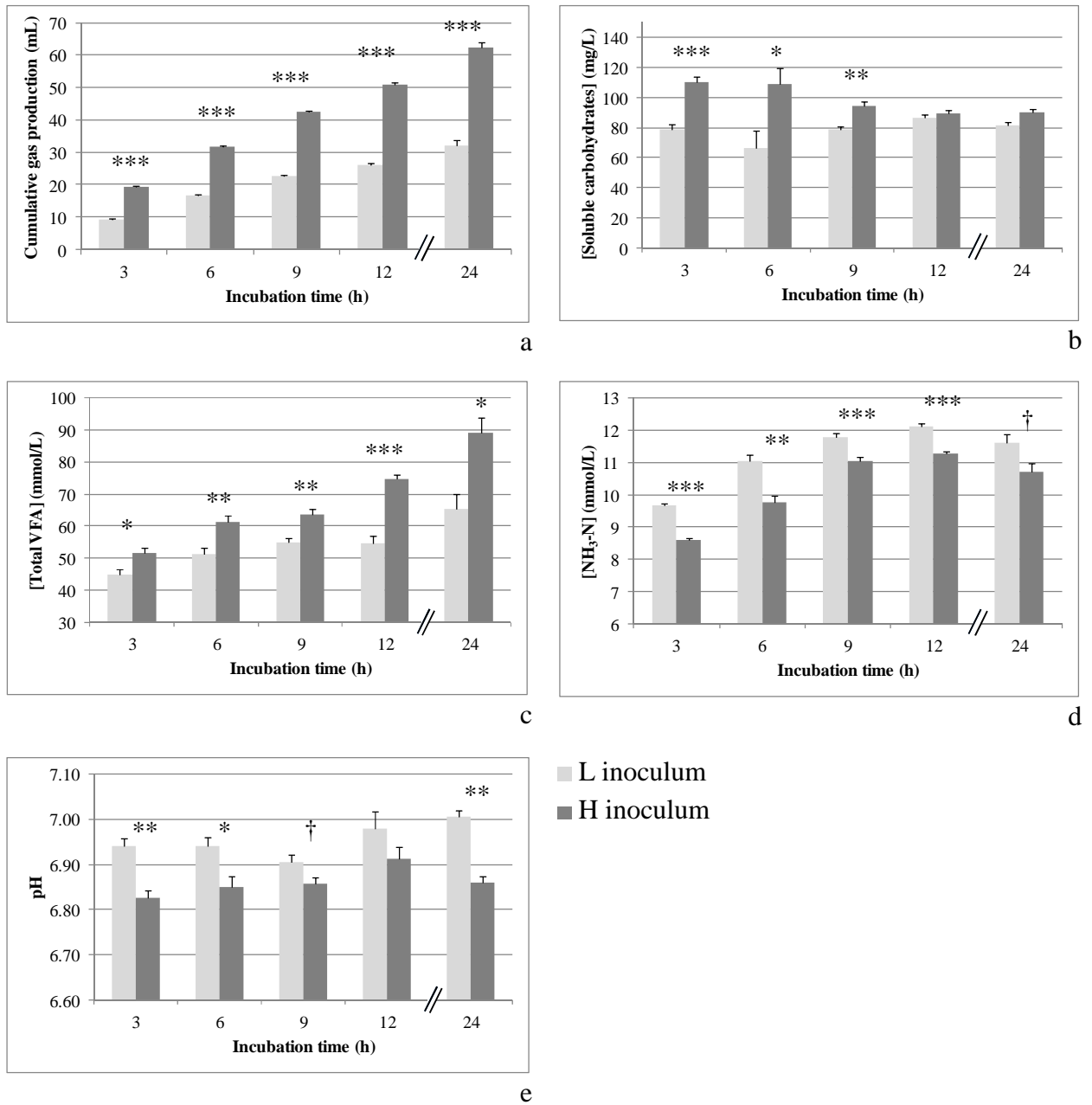
	Rumen fluid		SEM	P-value	
	L	H		Diet	Day
pH	6.63	6.45	0.057	0.07	0.24
NH ₃ -N (mmol/L)	5.84	2.25	0.754	0.002	0.35
SC (mg/L)	413	709	64.7	0.005	0.25
Total VFA (mmol/L)	102.5	102.7	6.31	0.97	0.03
VFA, mol/100 mol					
Acetate (A)	65.0	60.1	1.23	0.007	0.06
Propionate (P)	17.8	19.5	0.40	0.05	0.71
Butyrate	12.8	17.0	0.99	0.006	0.10
BCVFA	2.44	1.53	0.210	0.007	0.17
Valerate	1.12	1.17	0.041	0.31	0.08
A:P ratio	3.66	3.09	0.138	0.02	0.31

Table 4. Production of gases with incubation of 'blanks' with L or H inocula (30 mL).

	L Inoculum ²	H Inoculum ²	SEM	P-value	
				Inoculum	Day
CH ₄ production ¹ (μmol)					
0-3 h	59.4	135.6	12.7	<0.001	0.004
3-12 h	145	260	17.9	<0.001	0.07
12-24 h	60.1	95.4	12.1	0.05	0.16
CO ₂ production ¹ (μmol)					
0-3 h	230	454	35.7	<0.001	0.06
3-12 h	462	827	58.7	<0.001	0.009
12-24 h	13.4	21.3	31.2	0.07	0.16
H ₂ production ¹ (μmol)					
0-3 h	0.188	0.355	0.045	<0.001	<0.001
3-12 h	0.297	0.491	0.041	0.005	0.09
12-24 h	0.066	0.035	0.016	0.62	0.85
CO ₂ :CH ₄ ratio ¹					
0-3 h	4.03	3.43	0.184	0.01	0.007
3-12 h	3.17	3.19	0.094	0.64	<0.001
12-24 h	2.19	2.18	0.096	0.89	0.21

¹ These values were corrected from temperature.

² L inoculum: mix of rumen fluid from 3 goats fed a total mixed ration with 35% of concentrate and buffer mineral solution (1:2 v/v); H inoculum: mix of rumen fluid from 3 goats fed a total mixed ration with 70% of concentrate and buffer mineral solution (1:2 v/v).



*** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; † $P < 0.10$.

Figure 1. a) Cumulative gas production, b) concentration of soluble carbohydrates, c) concentration of total volatile fatty acids, d) concentration of ammonia-N, and e) pH during incubation of blanks (30 mL of inoculum and 0 mg of substrate).

Table 5. Concentrations and molar proportions of volatile fatty acids with incubation of 'blanks' with L or H inocula (30 mL).

Time (h)	L Inoculum ²	H Inoculum ²	SEM	P-value	
				Inoculum	Day
Total VFA (mmol/L)					
3	44.8	51.4	1.96	0.03	0.02
6	51.2	61.3	2.12	0.008	0.11
9	54.8	63.6	1.73	0.003	0.08
12	54.7	74.7	3.49	<0.001	0.04
24	65.3	89.2	6.52	0.04	0.25
VFA, mol/100 mol					
Acetate (A)					
3	62.4	58.3	0.61	<0.001	0.01
6	61.3	56.2	0.78	<0.001	0.03
9	59.8	54.1	0.88	<0.001	0.01
12	59.3	54.3	0.80	<0.001	0.12
24	60.5	54.7	1.38	0.02	0.34
Propionate (P)					
3	17.6	18.2	0.12	0.01	0.63
6	17.4	18.6	0.18	<0.001	0.27
9	17.6	17.9	0.14	0.23	0.64
12	17.3	17.7	0.14	0.11	0.04
24	16.9	17.3	0.20	0.32	0.33
Butyrate					
3	14.1	18.3	0.60	<0.001	0.02
6	14.5	18.9	0.66	<0.001	0.04
9	15.1	20.1	0.73	<0.001	0.001
12	15.3	19.8	0.68	<0.001	0.91
24	14.4	19.0	0.99	0.008	0.49
BCVFA ¹					
3	3.47	2.63	0.139	<0.001	<0.001
6	4.01	3.33	0.122	<0.001	0.004
9	4.68	4.38	0.121	0.03	<0.001
12	5.00	4.76	0.135	0.13	0.005
24	5.15	5.23	0.172	0.81	0.33
Valerate					
3	1.49	1.56	0.030	0.02	<0.001
6	1.76	2.08	0.059	<0.001	0.04
9	2.02	2.51	0.084	<0.001	0.05
12	2.16	2.62	0.084	<0.001	0.03
24	2.13	2.80	0.162	0.02	0.34
A:P ratio					
3	3.55	3.21	0.054	<0.001	0.15
6	3.52	3.02	0.073	<0.001	0.24
9	3.41	3.02	0.065	<0.001	0.34
12	3.42	3.08	0.063	<0.001	0.05
24	3.57	3.17	0.110	0.05	0.30

¹ BCVFA = branched-chain VFA (isobutyrate + isovalerate).² L inoculum: mix of rumen fluid from 3 goats fed a total mixed ration with 35% of concentrate and buffer mineral solution (1:2 v/v); H inoculum: mix of rumen fluid from 3 goats fed a total mixed ration with 70% of concentrate and buffer mineral solution (1:2 v/v).

Fermentation of the Substrate

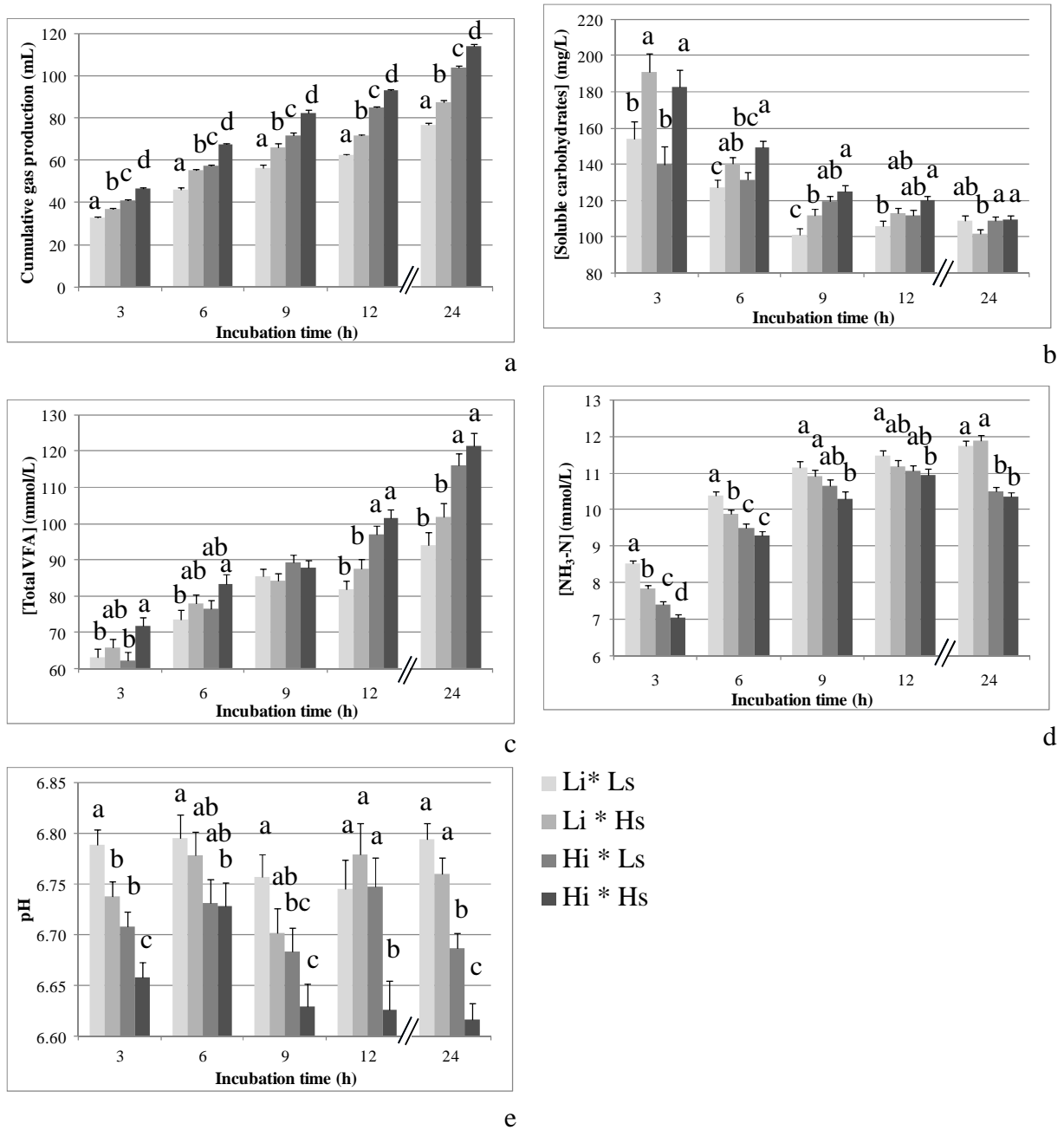
Cumulative gas production (Figure 2a), production of CH₄ and CO₂ (Table 6) were systematically higher in syringes containing Hi than in those containing Li and higher with Hs than with Ls. Interactions between inoculum and substrate was significant for CH₄ production and CO₂ production between 3 and 12 h suggesting a limitation of CH₄ and CO₂ production in the HiHs combination (Table 6). The production of H₂ was higher in syringes containing Hi than in those containing Li only between 3 and 12 h (Table 6). The CO₂ to CH₄ ratio was lower with Hi compared with Li between 0 and 12 h whereas between 12 and 24 h, it was lower with Hs compared with Ls (Table 6). It numerically decreased with the time interval (Table 6).

The concentration of SC was higher with Hs than with Ls, except at 24 h (Figure 2b). The concentration of total VFA was higher or tended to be higher with Hs than with the Ls, except at 9 h (Figure 2c, Table 7). The concentration of SC was higher with Hi than with Li at 9 and 12 h (Figure 2b) whereas it was higher from 3 h for blanks (Figure 1b). The concentration of total VFA was higher with Hi than with Li from 12 h (Figure 2c, Table 7).

The A:P ratio and the molar proportions of acetate and of BCVFA were lower with Hi than with Li (except for BCVFA at 9 and 12 h), whereas the molar proportions of propionate, butyrate and valerate were higher or tended to be higher (Table 7). The substrate had or tended to have an effect on the proportion of propionate at 12 and 24 h, on the proportion of BCVFA (except at 24 h) and on the proportion of valerate (except at 9 h) with lower proportions of those VFA with Hs than with Ls (Table 7). At 9, 12 and 24 h, the proportion of butyrate was higher or tended to be higher with the Hs than with the Ls (Table 7).

Concentrations of NH₃-N with Hi were significantly or numerically lower than with Li (Figure 2d). Concentration of NH₃-N was lower at 3 and 6 h with Hs than with Ls (Figure 2d). The concentration of NH₃-N increased until 12 h of incubation for all the syringes. At 24 h it continued to increase for syringes containing Li whereas it decreased for those containing Hi, in a similar manner to the blanks (Figure 2d).

Whatever the incubation time, the pH was high, revealing a high buffering capacity of the medium. However, pH was lower in syringes containing Hi than in those containing Li. At 3, 9 and 24 h, the pH was lower with Hs than with Ls (respectively $P = 0.002$, $P = 0.03$, $P = 0.003$) (Figure 2e).



^{a,d} Within a row, means without a common superscript letter differ ($P < 0.05$).

Figure 2. (a) Cumulative gas production, (b) concentration of soluble carbohydrates, (c) concentration of total volatile fatty acids, (d) concentration of ammonia-N and (e) pH during the incubation of the L or H substrates (200 mg DM; Ls and Hs, respectively) with the L or H inocula (30 mL; Li and Hi, respectively).

Table 6. Production of gases with incubation of L or H TMR (200 mg DM) with L or H inocula (30 mL).

	L Inoculum		H Inoculum		SEM	P-value ³			Day
	L substrate	H substrate	L substrate	H substrate		S	I	S*I	
CH ₄ production ² (μmol)									
0-3 h	214 ^d	236 ^c	288 ^b	328 ^a	9.6	0.001	<0.001	0.17	<0.001
3-12 h	227 ^d	265 ^c	321 ^b	334 ^a	8.3	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
12-24 h	124 ^d	136 ^c	155 ^b	176 ^a	5.2	<0.001	<0.001	0.21	<0.001
CO ₂ production ² (μmol)									
0-3 h	914 ^d	984 ^c	1111 ^b	1267 ^a	29.7	<0.001	<0.001	0.04	<0.001
3-12 h	820 ^c	950 ^b	1108 ^a	1138 ^a	29.0	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
12-24 h	336 ^c	361 ^c	415 ^b	463 ^a	14.6	0.004	<0.001	0.29	<0.001
H ₂ production ² (μmol)									
0-3 h	0.739	0.736	0.704	0.874	0.0372	0.19	0.42	0.17	0.03
3-12 h	0.467 ^c	0.520 ^c	0.588 ^b	0.655 ^a	0.0168	0.009	<0.001	0.53	0.26
12-24 h	0.179	0.148	0.147	0.149	0.0111	0.58	0.55	0.53	0.05
CO ₂ :CH ₄ ratio ³									
0-3 h	4.24 ^a	4.16 ^a	3.88 ^b	3.89 ^b	0.048	0.57	<0.001	0.44	<0.001
3-12 h	3.59 ^a	3.59 ^a	3.47 ^b	3.41 ^b	0.060	0.17	<0.001	0.23	<0.001
12-24 h	2.71 ^a	2.65 ^{ab}	2.70 ^{ab}	2.63 ^b	0.038	0.02	0.46	0.93	<0.001

^{a,d} Within a row, means without a common superscript letter differ ($P < 0.05$).

¹ These values were corrected from temperature.

² S = substrate; I = inoculum; S*I= interaction between substrate and inoculum.

Table 7. Concentration and molar proportions of volatile fatty acids with incubation of *L* or *H* substrates (200 mg DM) with *L* or *H* inocula (30 mL).

Time (h)	L Inoculum		H Inoculum		SEM	P-value ²			Day
	L substrate	H substrate	L substrate	H substrate		S	I	S*I	
Total VFA (mmol/L)									
3	63.0 ^b	65.6 ^{ab}	62.3 ^b	71.7 ^a	1.66	0.02	0.26	0.16	<0.001
6	73.5 ^b	77.8 ^{ab}	76.3 ^{ab}	83.5 ^a	1.59	0.04	0.11	0.59	0.01
9	85.4	84.1	89.2	87.7	1.50	0.53	0.09	0.96	<0.001
12	81.8 ^b	87.5 ^b	97.0 ^a	101.4 ^a	2.30	0.06	<0.001	0.81	<0.001
24	94.1 ^b	101.9 ^b	116.1 ^a	121.6 ^a	3.00	0.08	<0.001	0.75	0.005
VFA, mol/100 mol									
Acetate (A)									
3	63.2 ^a	63.2 ^a	57.9 ^b	59.2 ^b	0.50	0.17	<0.001	0.13	0.05
6	62.4 ^a	62.7 ^a	57.4 ^b	57.5 ^b	0.54	0.49	<0.001	0.83	<0.001
9	62.3 ^a	61.4 ^a	56.3 ^b	55.9 ^b	0.58	0.07	<0.001	0.58	<0.001
12	60.9 ^a	61.3 ^a	55.6 ^b	56.4 ^b	0.52	0.15	<0.001	0.63	0.12
24	61.0 ^a	59.8 ^a	55.5 ^b	55.1 ^b	0.55	0.09	<0.001	0.41	0.04
Propionate (P)									
3	20.2 ^b	20.1 ^b	21.0 ^a	20.7 ^a	0.11	0.28	<0.001	0.43	0.07
6	20.0 ^b	19.8 ^b	20.6 ^a	20.4 ^a	0.10	0.14	<0.001	0.88	0.003
9	19.6 ^b	19.8 ^{ab}	20.2 ^a	19.9 ^{ab}	0.10	0.88	0.02	0.17	0.10
12	19.5 ^{ab}	19.2 ^c	19.9 ^a	19.3 ^{bc}	0.10	<0.001	0.08	0.33	<0.001
24	18.6 ^b	18.6 ^b	19.4 ^a	18.8 ^b	0.10	0.005	<0.001	0.02	<0.001
Butyrate									
3	12.2 ^b	12.4 ^b	16.8 ^a	16.1 ^a	0.41	0.33	<0.001	0.09	0.01
6	12.6 ^b	12.8 ^b	16.9 ^a	17.3 ^a	0.44	0.15	<0.001	0.74	<0.001
9	12.5 ^d	13.5 ^c	17.7 ^b	18.6 ^a	0.49	<0.001	<0.001	0.84	<0.001
12	13.6 ^b	14.1 ^b	17.9 ^a	18.3 ^a	0.41	0.07	<0.001	0.89	0.46
24	13.5 ^d	14.7 ^c	17.6 ^b	18.5 ^a	0.40	<0.001	<0.001	0.55	0.53

Table 7. (continued)

Time (h)	L Inoculum		H Inoculum		SEM	P-value ²			
	L substrate	H substrate	L substrate	H substrate		S	I	S*I	Day
BCVFA ¹									
3	2.43 ^a	2.23 ^b	2.07 ^c	1.77 ^d	0.054	<0.001	<0.001	0.35	0.001
6	2.77 ^a	2.46 ^b	2.50 ^b	2.27 ^c	0.052	<0.001	<0.001	0.40	<0.001
9	3.20 ^a	2.94 ^{bc}	3.08 ^{ab}	2.86 ^c	0.059	0.004	0.18	0.81	<0.001
12	3.45 ^a	3.16 ^b	3.55 ^a	3.20 ^b	0.055	<0.001	0.23	0.60	<0.001
24	4.08 ^a	4.05 ^a	4.25 ^a	4.21 ^a	0.053	0.59	0.04	0.96	<0.001
Valerate									
3	1.28 ^b	1.28 ^b	1.49 ^a	1.34 ^{ab}	0.023	0.03	<0.001	0.04	0.08
6	1.46 ^b	1.41 ^b	1.76 ^a	1.69 ^a	0.035	0.03	<0.001	0.67	<0.001
9	1.67	1.67	2.02	2.00	0.045	0.85	<0.001	0.81	0.002
12	1.78 ^b	1.72 ^b	2.29 ^a	2.15 ^a	0.051	0.05	<0.001	0.45	0.035
24	2.00 ^b	2.13 ^b	2.58 ^a	2.65 ^a	0.061	0.07	<0.001	0.66	0.01
A:P ratio									
3	3.13 ^a	3.14 ^a	2.75 ^b	2.86 ^b	0.039	0.22	<0.001	0.28	0.22
6	3.13 ^a	3.17 ^a	2.79 ^b	2.81 ^b	0.038	0.24	<0.001	0.79	<0.001
9	3.19 ^a	3.11 ^a	2.79 ^b	2.81 ^b	0.039	0.43	<0.001	0.28	0.08
12	3.12 ^a	3.21 ^a	2.80 ^b	2.94 ^b	0.037	0.009	<0.001	0.52	0.009
24	3.28 ^a	3.23 ^a	2.87 ^b	2.93 ^b	0.042	0.80	<0.001	0.15	0.002

^{a,d} Within a row, means without a common superscript letter differ ($P < 0.05$).

¹ BCVFA = branched-chain VFA (isobutyrate + isovalerate).

² S = substrate; I = inoculum; S*I= interaction between substrate and inoculum.

Interpretation of the Fermentation

The incubations of Li or Hi (30 mL) with or without Ls or Hs (200 mg DM) were used to do the calculations described in this paragraph. The calculations of total gas, CH₄ and CO₂ productions as a result of the fermentation (direct gases) and the buffering of the VFA by the bicarbonate (indirect gases) in the syringes are shown in Figure 3 for the time intervals 0 – 3 h and 12 – 24 h. These intervals were chosen to show differences between the beginning and the end of the incubation. The predictions of gas production from VFA stoichiometry were better for the 0 – 3 h period than for the 12 – 24 h period (Figure 3). The estimated production of total gas was well related to the recorded gas production (in mmol of carbon) for the 0 - 3 h period with a slope not different from 1 (Figure 3a). In contrast, the calculated production of total gas was 2.5 higher than the recorded gas production (in mmol of carbon) for the 12 – 24 h period (Figure 3b). For this last period, the estimation of CO₂ is much worse than the estimation of CH₄ production.

For the 0 – 3 h period, 89% of molecular H₂ predicted from the stoichiometry of VFA was captured in the CH₄ production. However, this percentage is variable because the relationship between molecular H₂ predicted from the stoichiometry of VFA and recorded CH₄ is quadratic (Figure 4a). The gaseous H₂ production is linearly linked to the production of molecular H₂. The Figure 4b suggests that less than 1% of molecular H₂ was recovered as gaseous H₂. The inoculum and the substrate had an effect on the ATP production with a higher production with Hi or Hs than with Li or Ls ($P < 0.001$). A mean partition of carbon of 44.6, 29.9 and 25.5% between the VFA, gas and microbial growth was found, assuming a YATP equal to 15. A significant negative relationship was found between the estimated quantity of microbial nitrogen and the production of NH₃-N (Figure 4c).

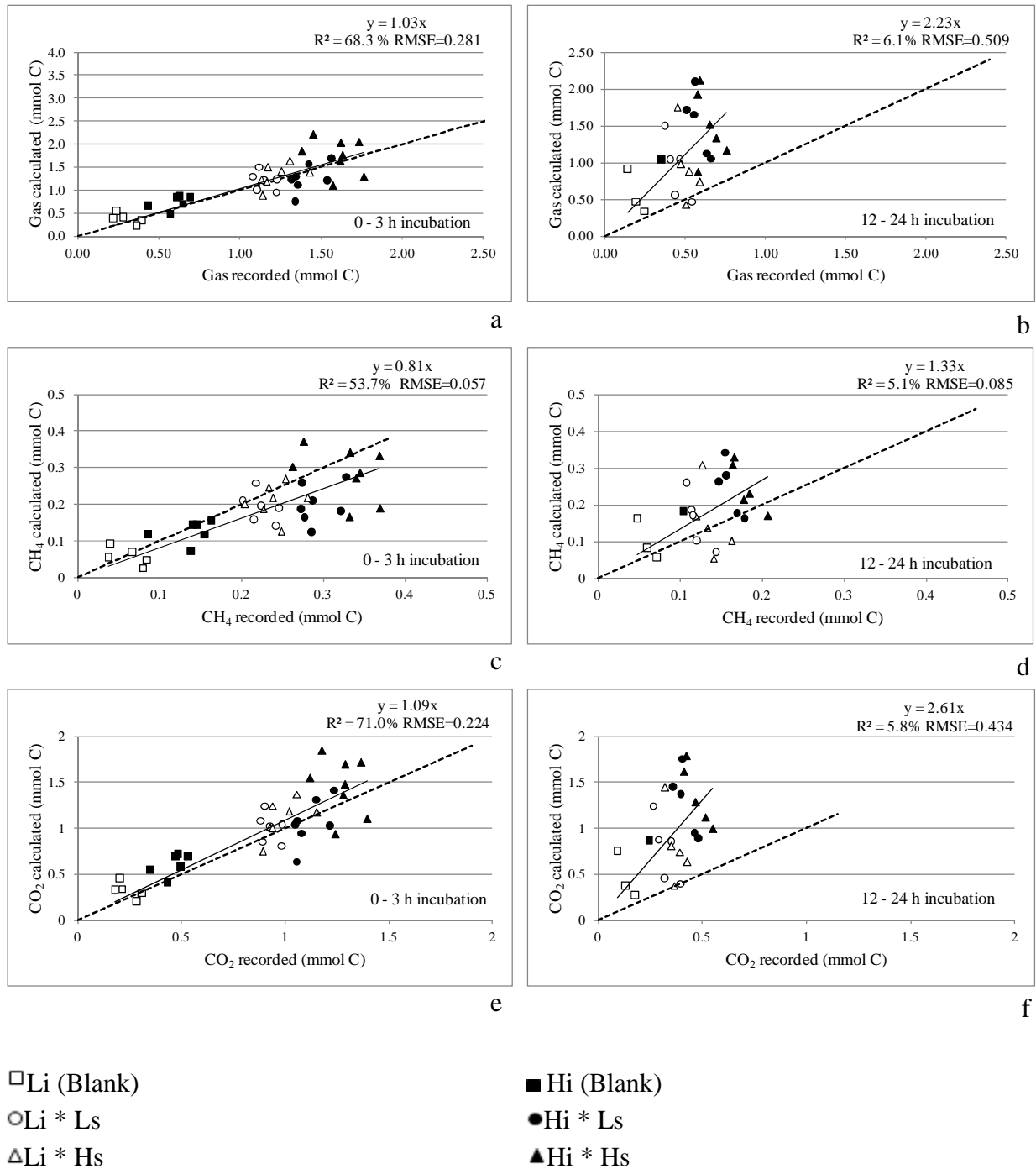


Figure 3. Stoichiometrically calculated gas, CH₄ and CO₂ productions vs. recorded gas, CH₄ and CO₂ productions (solid line) during the incubation of the L or H inocula (30 mL; Li and Hi respectively) with or without the L or H substrates (200 mg DM; Ls and Hs respectively). Presented data correspond to the time intervals 0 – 3 h (a, c, e) and 12 – 24 h of incubation (b, d, f). The bisector $y = x$ is represented by dotted line.

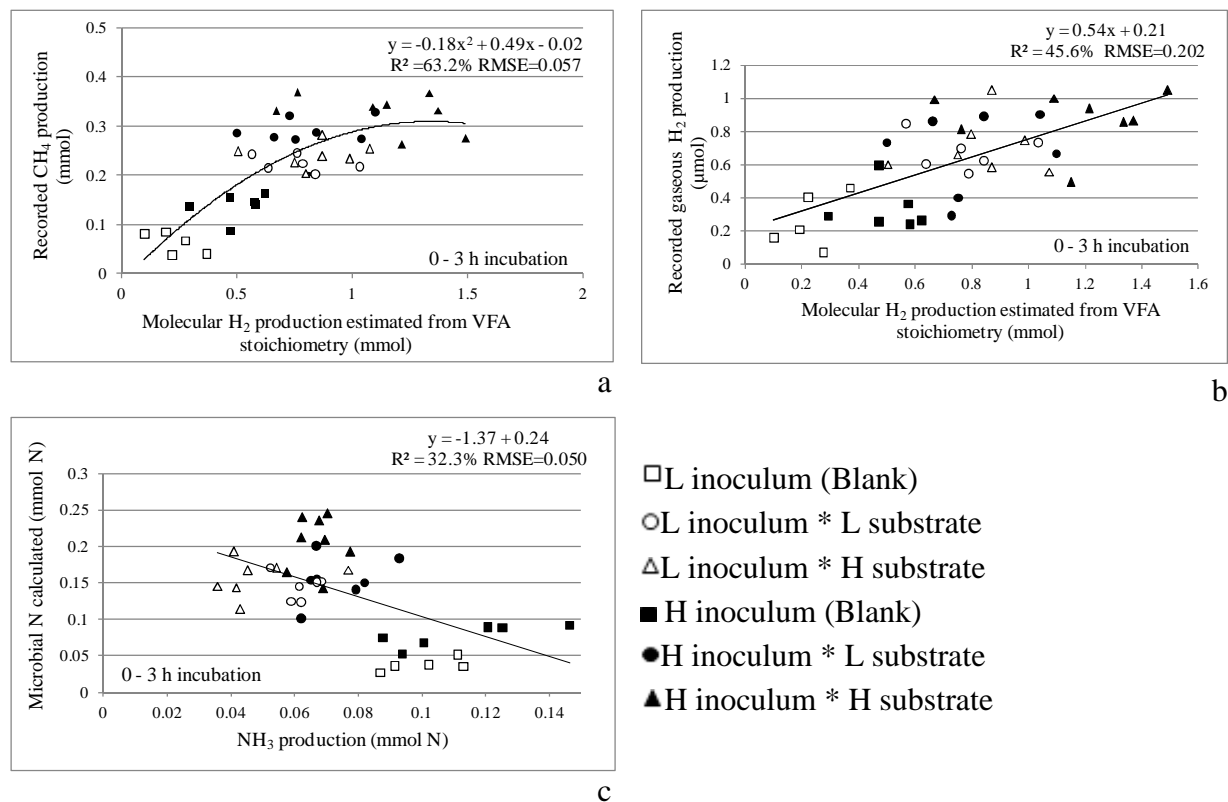


Figure 4. Relationship between molecular hydrogen production occurring during fermentations (estimated from VFA production) and recorded CH_4 production (a) and recorded H_2 production (b), and relationship between the NH_3 -N production and the estimation of microbial nitrogen (c). Presented data correspond to the time intervals 0 – 3 h.

DISCUSSION

Influence of the Experimental Conditions on the Interpretation of the Effects of the Inoculum and the Substrate

The ‘blanks’ are syringes containing the inoculum without addition of substrate, that are generally used to correct data from the residual fermentable OM included in the inoculum (Rymer et al., 2005). As proposed by Williams et al. (2005), we have chosen to report data from blanks separately from the data of substrate fermentation and to report data from these syringes without subtraction of blank data. Indeed, microbial activity in blanks is likely different from microbial activity with substrate as energy source. Comparisons between the different inocula in our study and among other published *in vitro* studies are facilitated if results on blanks are given (Singh et al., 2001). The incubation of blanks gives a measurement of the initial microbial activity of the inoculum. The inocula were very active in our study. Menke and Steingass (1988) recommended a blank gas volume at least equal to 7 mL in 24 h when total incubation volume was 30 ml, whereas Nagadi et al. (1999) recommended a blank gas volume at least equal to 15.5 mL / syringe (with a ratio of sheep rumen fluid to buffer solution equal to 1:2 v/v, which corresponded in their study to 93.7 mg bacterial

DM / 10 cm³), which is largely reached in this study. It ensured that the gas production kinetic, when a substrate would be incubated in an inoculum, would not be affected by a too low microbial activity of the inoculum (Nagadi et al., 2000). It should be noted that values of blanks obtained in this study were much higher than in the study of Nagadi et al. (2000) who used sheep, probably at maintenance, as animal donors. Maaroufi et al. (personal communication) obtained blank gas volume equal to 6 mL in 24 h with identical laboratory conditions to the present study but with rumen fluid collected from dry cows instead of lactating goats, and with a different diet. Discrepancies between these last results and our study can be explained either by the species, the feeding level (maintenance vs. lactation) or the diet fed to the donor animals.

The values of concentrate to forage ratios in our study (35:65 and 70:30) were in the range of values proposed by Nagadi et al. (2000), although the forage part of our TMR is certainly more digestible than the one of Nagadi et al. (2000) which was composed of hay.

Differences between Hi and Li blanks were significant for the majority of the measurements. It agrees with a previous study that showed that the bacterial DM and blank gas volume increased as the ratio of concentrate to hay increased in the donor animal diet (Nagadi et al., 2000).

For the syringes containing both inoculum and substrate, the effect of the interaction between the substrate and the inoculum was seldom significant. Thus, the effects of the inoculum and the substrate can be considered as additive. Moreover, for the majority of the measurements, the inoculum and the substrate led to the same type of effect. With the exception of SC and total VFA concentrations at the beginning of the incubation, the effect of the inoculum is largely predominant in comparison with the effect of the substrate (substrate concentration of 6.6 g DM / L of inoculum). The predominance of the effect of the inoculum can be explain by the low dilution of the rumen fluid in the buffer solution, equal to 333 mL / L in this study. It is the dilution used in the syringe method (Menke et al., 1979) but it is the lowest dilution comparing with other gas production methods, which ranged from 100 mL / L to 333 mL / L (Pell and Schofield, 1993; Waghorn and Stafford, 1993; Theodorou et al., 1994; Cone et al., 1996; Mauricio et al., 1999; Adesogan et al., 2005). High proportion of rumen fluid in the buffer solution allowed higher volume of gas produced, rate of gas production and reduction of the lag time as reviewed by Rymer et al. (2005). Indeed no lag phase was detected at the beginning of the incubation in this study with a time interval between the beginning of the incubation and the first measurement of 3 h.

Interpretation of the Profiles of the Soluble Carbohydrates, Ammonia-N and Volatile Fatty Acid Concentrations, pH and methane Production

Changes in the rumen SC compartment size reflect the balance between degradation of carbohydrates and its utilization by micro-organisms as energy source. For all substrate-inoculum combinations, the SC concentration decreased with time because degradation rate of polymerised carbohydrates did not compensate the SC utilization rate by micro-organisms. During the first hours of incubation, the SC concentration was higher with Hs than with Ls due to the higher starch content of the Hs compared with Ls. However, it should be noted that

the concentration of SC in the rumen fluid of donors was higher with animals fed the H diet than animals fed the L diet.

The effects of the substrate and the inoculum on the VFA concentration are almost the same as those on the SC concentration, as the VFA are the results of the fermentation of the SC. The profile of VFA was much more influenced by the inoculum than by the substrate. Even in presence of a substrate different from the diet of the donor animals, the microbial populations orientated the fermentations to the same VFA profile as the VFA profile in the rumen of the donor animals. It confirms certain inertia to change the VFA profile.

In syringes, the $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration is an intermediary compartment between protein degradation and use of nitrogen for the microbial growth. In this study, the $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration was much lower with Hi than with Li and with Hs than with Ls. Calculations on potential ATP production show that the energy availability in the syringe was much higher for Hi or Hs than for Li or Ls. This energy could stimulate microbial growth (Isaacson et al., 1975). Thus, the $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration would decrease because of sustained microbial growth. Similar results on $\text{NH}_3\text{-N}$ were observed *in vivo* when animals were fed the same TMR as the substrates of this experiment (Serment et al., 2011). The accumulation of the $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration with the time can be partly related to the microbial lysis (Cone et al., 1997).

Changes in pH were small because of the quantity of buffers in the inoculum. In fact, buffers were added to maintain pH of the syringe content within a range such that degradation is not compromised (Mould et al., 2005b).

At the end of the incubation, fermentation rate slowed down due to the degradation of slowly digestible fraction, to the low availability of easily digestible fraction of the substrate, and probably to the decrease of activity of the microbial population.

It has previously been shown that the relationship between the dietary percentage of concentrate and the methanogenesis is curvilinear, and that with a high percentage of concentrate in the diets methanogenesis (expressed on a digestible organic matter basis) is reduced (Sauvant et al., 2011). However, in the present study the production of methane was increased by Hi and Hs, which can have 3 explanations. First at all, higher fermentation occurred in syringes containing Hi and Hs, which led to a higher gas production. Moreover, the pH in the syringes didn't decrease enough to have an impact on methanogenesis. Van Kessel and Russell (1996) showed that inhibitor effects of pH on methanogenesis occur with a pH lower than 6.0. Finally, with Hi and Hs, the lower production of acetate should decrease the release of molecular H_2 in the syringe and the higher production of propionate, as a molecular H_2 sink, should decrease the availability of molecular H_2 for CH_4 production. However, the higher production of butyrate can also release molecular H_2 , potentially available for CH_4 production (Janssen, 2010).

Usefulness of Gas Production Technique for the Understanding of Rumen Fermentation

In articles using gas production techniques, it is fairly rare that the dynamic pattern of other parameters than gas production was measured, notably the concentrations of VFA (Getachew et al., 2005). Thus, in such studies, it is not possible to do similar calculations as proposed in the present one.

In this study, in addition to direct measurement, gas production was estimated from the amount and stoichiometry of the VFA. For the determination of indirect gas, one mole of VFA was assumed to release one mole of carbon (CO_2) from a bicarbonate buffer (Blümmel et al., 1999). This hypothesis supposed a total neutralization of VFA. During the 0 – 3 h period, our initial assumption appeared to be satisfying. In contrast, during the 12 – 24 h period, the productions of total gas and of CO_2 were overestimated, with an estimated production almost twice higher than the recorded production. This may be due to the buffers containing both bicarbonate and phosphate (Menke and Steingass, 1988). As the VFA were neutralized by bicarbonate or phosphate, the estimated quantity of indirect gas would be likely overestimated (Mould et al., 2005b). To correct the estimation, it would be necessary to consider only direct gas (from fermentations) and a small part of the indirect gas (from the buffering of VFA). During this last period, the buffering capacity of the liquid was not overloaded, because the pH in the syringes remained relatively high (superior to 6.6). Further, the VFA production ranged from 1.6 to 2.4 mmol during 24 h of incubation, for initial quantities of bicarbonate and phosphate in the buffer solution equal to 2.3 mmol and 0.2 mmol respectively. Also, syringes were twice degassed which could provoke perturbations in the fermentation, because of possible entry of air in the syringe during those operations.

The fermentation of carbohydrates produced molecular H_2 , notably during glycolysis and by the formation of acetate and butyrate (Janssen, 2010). An increase of the partial pressure of molecular H_2 can potentially inhibit the normal functioning of the rumen by NADH accumulation because of a reduction of the activity of NADH dehydrogenase, and thus can reduce rumen fermentation (Wolin et al., 1997). Methane is one of the largest sinks for ruminal molecular H_2 , it is generally accepted that 48% of the molecular H_2 form CH_4 (Czerkawski, 1986). In this study, the CH_4 captured 89% of molecular H_2 . The molecular H_2 captured in the CH_4 exhibited a quadratic relationship. There was an apparent saturation of the methanogenesis when a high quantity of molecular H_2 was available. Such a trend was recently observed on *in vivo* data by Sauviant et al. (2011). This suggests an increasing role of other sinks for molecular H_2 as it becomes more available. Volatile fatty acids production (notably propionate), growth of microbes, fatty acid biohydrogenation (Czerkawski, 1986), reductive acetogenesis, nitrate and sulphur reduction (Morgavi et al., 2010) have been described in the literature as other potential sinks of molecular H_2 . Further, in the present work, gaseous H_2 production was linearly increased with the theoretical increase of molecular H_2 availability. Further, estimation of molecular H_2 (and thus the potential CH_4 production) in this study considered only major VFA (acetate and, propionate and butyrate) as in the majority of publications (Blümmel et al., 1999; Fievez et al., 2005). Some authors have added BCVFA and valerate in this calculation (Demeyer, 1991; Alemu et al., 2011) but not as the same way. We tried to consider these minor VFA with the data of this study but it was not reported in the present paper because it didn't improve the quality of the prediction.

These results suggest that this kind of *in vitro* studies are useful for building or assessing mechanistic models of rumen functioning, such as the model of Serment and Sauviant (2010) which describes pH and gas exchanges in a syringe. The measurements of gas composition

and VFA profile presented here, allowed the completion of such approach by assessing the partition of carbon and hydrogen.

As direct quantification of CH₄ produced by the animals is fairly complicated (Getachew et al., 2005), such models combined with the *in vitro* gas production technique provide an interesting tool to study in details determinants of CH₄ emissions. Among these determinants, the type of substrate, the fermentation rate, the diet of the donor; the animal and additives can be quoted (Demeyer and Fievez, 2000; Boadi et al., 2004; Martin et al., 2010).

CONCLUSIONS

Using an *in vitro* method, this study evaluated the relative impact on ruminal fermentations, gas production, and notably methane production, of the substrate and the diet fed to the donor animals that provided the inoculum. The effect of the percentage of concentrate can be attributed to the simultaneous effects of both the substrate and the inoculum. The effects were additive and the inoculum, i.e. the microbial profile of the adapted rumen, had the stronger effect. From the stoichiometry of VFA and gas measurements, this study allowed the estimation of the flows of carbon and hydrogen in the syringes, This study can contribute to improving models aimed at predicting rumen functioning.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank J. Tessier and his team (INRA, UMR 791, Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, Paris and Thiverval-Grignon) for the care of the goats and their technical assistance during the collections of rumen content. J.-L. Le Pierres (AgroParisTech, UMR 791) is gratefully acknowledged for his advices on the *in vitro* technique. We thank F. Ternois (AgroParisTech, UMR 791) for the analysis of the samples and N. C. Friggens (INRA, UMR791) for rereading the manuscript.

REFERENCES

- Adesogan, A. T., N. K. Krueger, and S. C. Kim. 2005. A novel, wireless, automated system for measuring fermentation gas production kinetics of feeds and its application to feed characterization. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124:211-223.
- AFNOR. 1982. V18-109. Aliments des animaux. Détermination de la teneur en eau. Association française de normalisation, La Plaine Saint-Denis, France. 9 p.
- AFNOR. 1997. V18-121. Aliments des animaux. Détermination enzymatique de la teneur totale en amidon. Association française de normalisation, La Plaine Saint-Denis, France. 9 p.
- Alemu, A. W., J. Dijkstra, A. Bannink, J. France, and E. Kebreab. 2011. Rumen stoichiometric models and their contribution and challenges in predicting enteric methane production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167:761-778.

- Andrade, P. V. D., and P. Schmidely. 2006. Influence of percentage of concentrate in combination with rolled canola seeds on performance, rumen fermentation and milk fatty acid composition in dairy goats. *Livest. Sci.* 104:77-90.
- Baumont, R., J. P. Dulphy, D. Sauvant, G. Tran, F. Meschy, J. Aufrère, J. L. Peyraud, and P. Champciaux. 2007. Les tables de la valeur des aliments. Page 181-286 in *Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux–Valeurs des Aliments. Tables INRA 2007.* Ed. Quae, Versailles, France.
- Blümmel, M., K. P. Aiple, H. Steingass, and K. Becker. 1999. A note on the stoichiometrical relationship of short chain fatty acid production and gas formation *in vitro* in feedstuffs of widely differing quality. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* 81:157-167.
- Blümmel, M., A. Karsli, and J. R. Russell. 2003. Influence of diet on growth yields of rumen micro-organisms *in vitro* and *in vivo*: influence on growth yield of variable carbon fluxes to fermentation products. *Br. J. Nutr.* 90:625-634.
- Boadi, D., C. Benchaar, J. Chiquette, and D. Masse. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: update review. *Can. J. anim. Sci.* 84:319-335.
- Brown, M. E., and M. S. Boston. 1961. Ultra-microsinger determination using 2.9 dimethyl. 1. 10 phenanthroline hydrochloryde (neocuproine). *Diabetes* 10:60-62.
- Brown, M. S., C. H. Ponce, and R. Pulikanti. 2006. Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: performance and ruminal metabolism. *J. Anim. Sci.* 84:E25-E33.
- Cone, J. W., A. H. van Gelder, and F. Driehuis. 1997. Description of gas production profiles with a three-phasic model. *Anim. Feed Sci. Technol.* 66:31-45.
- Cone, J. W., A. H. van Gelder, G. J. W. Visscher, and L. Oudshoorn. 1996. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Anim. Feed Sci. Technol.* 61:113-128.
- Czerkawski, J. W. 1986. *An Introduction to Rumen Studies.* Pergamon Press, Oxford. 236 p.
- Demeyer, D., and V. Fievez. 2000. Ruminants et environnement : la méthanogenèse. *Ann. Zootech.* 49:95-112.
- Demeyer, D. I. 1991. Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and hindgut. Page 217-237 in *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion.* J.-P. Jouany (Ed.), INRA Editions, Paris, France.
- European Directive 86/609. 1986. Council Directive on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31986L0609:EN:HTML> Accessed September 27, 2010
- Fievez, V., O. J. Babayemi, and D. Demeyer. 2005. Estimation of direct and indirect gas production in syringes: A tool to estimate short chain fatty acid production that requires minimal laboratory facilities. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124:197-210.
- Folch, J., M. Lees, and G. H. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497– 509.

- Getachew, G., P. H. Robinson, E. J. DePeters, S. J. Taylor, D. D. Gisi, G. E. Higginbotham, and T. J. Riordan. 2005. Methane production from commercial dairy rations estimated using an *in vitro* gas technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124:391-402.
- Giger, S., P. Thivend, D. Sauvant, M. Dorléans, and P. Journaix. 1987. Etude de l'influence préalable de différents traitements amylolytiques sur la teneur en résidu NDF d'aliments du bétail. *Ann. Zootech.* 36:39-48.
- Hristov, A. N., M. Ivan, L. M. Rode, and T. A. McAllister. 2001. Fermentation characteristics and ruminal ciliate protozoal populations in cattle fed medium- or high-concentrate barley-based diets. *J. Anim. Sci.* 79:515-524.
- Huntington, J. A., C. Rymer, and D. I. Givens. 1998. The effect of host diet on the gas production profile of hay and high-temperature dried grass. *Anim. Sci.* 67:59-64.
- Isaacson, H. R., F. C. Hinds, M. P. Bryant, and F. N. Owens. 1975. Efficiency of energy utilization by mixed rumen bacteria in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 58:1645-1659.
- ISO. 1978. ISO 5984. Animal Feedingstuffs. Determination of Crude Ash. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland. 6 p.
- Janssen, P. H. 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Anim. Feed Sci. Technol.* 160:1-22.
- Kristensen, N. B. 2000. Quantification of whole blood short-chain fatty acids by gas chromatographic determination of plasma 2-chloroethyl derivatives and correction for dilution space in erythrocytes. *Acta Agric. Scand. Sect. A. Anim. Sci.* 50:231-236.
- Latham, M. J., M. E. Sharpe, and J. D. Sutton. 1971. The microbial flora of the rumen of cows fed hay and high cereal rations and its relationship to the rumen fermentation. *J. appl. Bacteriol.* 34:425-434.
- Maaroufi, C., P. Chapoutot, D. Sauvant, and S. Giger-Reverdin. 2009. Fractionation of pea flour with pilot scale sieving. II. *In vitro* fermentation of pea seed fractions of different particle sizes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 154:135-150.
- Martin, C., D. P. Morgavi, and M. Doreau. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4:351-365.
- Mauricio, R. M., F. L. Mould, M. S. Dhanoa, E. Owen, K. S. Channa, and M. K. Theodorou. 1999. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 79:321-330.
- Menke, K. H., L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz, and W. Schneider. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. agric. Sci. Camb.* 93:217-222.
- Menke, K. H., and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Develop.* 28:7-55.
- Morgavi, D. P., E. Forano, C. Martin, and C. Newbold. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal* 4:1024-1036.

- Mould, F. L., K. E. Kliem, R. Morgan, and R. M. Mauricio. 2005a. *In vitro* microbial inoculum: a review of its function and properties. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124:31-50.
- Mould, F. L., R. Morgan, K. E. Kliem, and E. Krystallidou. 2005b. A review and simplification of the *in vitro* incubation medium. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124:155-172.
- Nagadi, S., M. Herrero, and N. S. Jessop. 1999. Effect of frequency of ovine ruminal sampling on microbial activity and substrate fermentation. *Proc. Br. Soc. Anim. Sci.*:154 (abstract).
- Nagadi, S., M. Herrero, and N. S. Jessop. 2000. The influence of diet of the donor animal on the initial bacterial concentration of ruminal fluid and *in vitro* gas production degradability parameters. *Anim. Feed Sci. Technol.* 87:231-239.
- Oshio, S., I. tahata, and H. Minato. 1987. Effects of diets differing in ratios of roughage to concentrate on microflora in the rumen of heifers. *J Gen Appl Microbiol* 33:99-111.
- Payne, J. S., A. R. Hamersley, J. C. Milligan, and J. A. Huntington. 2002. The effect of rumen fluid collection time on its fermentative capacity and the stability of rumen conditions in sheep fed a constant diet. *Proc. Br. Soc. Anim. Sci.*:165 (abstract).
- Pell, A. N., and P. Schofield. 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 76:1063-1073.
- Robertson, J. B., and P. J. Van Soest. 1981. The detergent system of analysis and its application to human foods. Pages 123-158 in *The analysis of dietary fiber in food*. W. P. T. James, and O. Theander (Ed.), Marcel Dekker, Inc., Basel, Switzerland.
- Rymer, C., J. A. Huntington, and D. I. Givens. 1999. Effects of inoculum preparation method and concentration, method of inoculation and pre-soaking the substrate on the gas production profile of high temperature dried grass. *Anim. Feed Sci. Technol.* 78:199-213.
- Rymer, C., J. A. Huntington, B. A. Williams, and D. I. Givens. 2005. *In vitro* cumulative gas production techniques: history, methodological considerations and challenges. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124:9-30.
- SAS Institute. 2000. *User's Guide*. Release 11.04. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Sauvant, D., S. Giger-Reverdin, A. Serment, and L. P. Broudiscou. 2011. Influences des régimes et de leur fermentation dans le rumen sur la production de méthane par les ruminants. *INRA Prod. Anim.* 24:433-446.
- Serment, A., and D. Sauvant. 2010. A mechanistic model of pH and gas exchanges in the rumen and its *in vitro* application. Page 148-157 in 7th International Workshop on Modelling Nutrient Digestion and Utilisation in Farm Animals, Paris, France, 10-12 September, 2009. D. Sauvant, J. Van Milgen, P. Faverdin, and N. Friggens (Ed.).
- Serment, A., P. Schmidely, S. Giger-Reverdin, P. Chapoutot, and D. Sauvant. 2011. Effects of the percentage of concentrate on rumen fermentation, nutrient digestibility, plasma metabolites and milk composition in mid-lactation goats. *J. Dairy Sci.* 94:3960-3972.
- Singh, B., T. K. Bhat, and O. P. Sharma. 2001. Biodegradation of tannic acid in an *in vitro* ruminal system. *Livest. Prod. Sci.* 68:259-262.

- Sweeney, R. A., and P. R. Rexroad. 1987. Comparison of leco FP-228 'nitrogen determinator' with AOAC copper catalyst kjeldahl method for crude protein. *J. AOAC. Int.* 70:1028-1030.
- Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan, and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48:185-197.
- Trei, J., W. Hale, and B. Theurer. 1970. Effect of grain processing on *in vitro* gas production. *J. Anim. Sci.* 30:825-831.
- Van Kessel, J. S., and J. B. Russell. 1996. The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 20:205-210.
- Van Soest, P. J., and R. H. Wine. 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *J. AOAC. Int.* 50:50-55.
- Waghorn, G. C., and K. J. Stafford. 1993. Gas production and nitrogen digestion by rumen microbes from deer and sheep. *N. Z. J. agric. Res.* 36:493-497.
- Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 38:971-977.
- Williams, B. A., M. W. Bosch, H. Boer, M. W. A. Verstegen, and S. Tamminga. 2005. An *in vitro* batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124:445-462.
- Wolin, M., T. Miller, and C. Stewart. 1997. Microbe-microbe interactions. Pages 467-491 in *The rumen microbial ecosystem*. P. N. Hobson, and C. Stewart (Ed.), Chapman & Hall, London.

II. **ARTICLE 5 : Effets du pourcentage de concentrés et de la supplémentation en huile sur les fermentations *in vitro***

RESUME DE L'ARTICLE 5

Objectifs :

Le pourcentage de concentrés incorporés dans la ration et la supplémentation en huile sont des facteurs connus pour modifier les fermentations ruminales, la production de CH₄ et la biohydrogénation ruminale des acides gras (AG). Néanmoins, il existe peu d'études où ces deux facteurs ont été étudiés en interaction.

L'objectif de cette étude a été d'étudier les effets du pourcentage de concentrés et d'une supplémentation en huile riche en AG polyinsaturés (mélange d'huiles de lin et de tournesol, 1:1 v/v) sur ces paramètres, en utilisant une adaptation de la méthode des seringues de l'université d'Hohenheim (Maaroufi et al., 2009).

Matériels et Méthodes :

Six chèvres en milieu de lactation et canulées du rumen ont reçu *ad libitum* pendant 3 semaines, soit une ration pauvre en concentrés (L ; 35 % MS) pour 3 d'entre elles, soit une ration riche en concentrés (H ; 70 %) pour les 3 autres. Ces rations sont les mêmes que celles utilisées dans l'essai *in vivo* et dans le premier essai *in vitro*. Les inocula L et H ont été fabriqués à partir d'une solution tampon et de jus de rumen prélevés chez les animaux recevant les rations L ou H, respectivement (pool des 3 animaux). Les substrats utilisés dans cette étude étaient ces rations L et H qui ont été incubées dans les inocula L et H, respectivement. Le mélange d'huile a été supplémenté à un niveau de 10 % de la MS du substrat. La production de gaz et sa composition en CO₂, CH₄ et H₂, la concentration et le profil en acides gras volatils (AGV), les concentration en glucides solubles et en ammoniac (NH₃-N), le pH et le profil en AG des jus fermentaires ont été mesurés. Les durées d'incubation choisies dans cette étude étaient 0, 3, 6, 9, 12 et 24 h.

Résultats et Discussion :

L'accroissement du pourcentage de concentrés a augmenté la production de gaz totaux, les concentrations en glucides solubles et en AGV totaux, et la proportion molaire de butyrate. La concentration de NH₃-N, le pH, le ratio acétate / propionate et les proportions en AGV ramifiés ont par contre été diminués. La supplémentation en huile n'a eu pratiquement aucun effet sur les paramètres fermentaires.

L'augmentation du pourcentage de concentrés a accru la production de CH₄ et la proportion molaire de CH₄ par rapport aux gaz totaux (sauf entre 12 et 24 h). La supplémentation en huile n'a pas eu d'effet sur la production de CH₄, mais a réduit la proportion molaire de CH₄. La biohydrogénation ruminale des AG a eu lieu pendant toute la durée de l'incubation car la proportion en C18:0 (par rapport aux AG totaux) a continué à augmenter jusqu'à 24 h. Cependant, les réactions se sont principalement déroulées pendant les premières heures de

l'incubation (6 heures). Les effets du pourcentage de concentrés et de la supplémentation en huile sur les intermédiaires de la biohydrogénation semblent être reliés aux teneurs initiales de leurs précurseurs dans le substrat et l'huile. La proportion d'AG *trans* a été augmentée par le pourcentage de concentrés et la supplémentation en huile. Le *trans*-11 C18:1 est l'AG *trans* C18:1 majoritaire.

Conclusion :

Cette étude *in vitro* a permis d'évaluer l'impact du pourcentage de concentrés et de la supplémentation en huile sur les fermentations, le CH₄ et le profil en AG. Seul, le profil en AG semble affecté par l'interaction de ces deux facteurs expérimentaux. Cette étude a fourni un nombre important de mesures de nature différente (CH₄, intermédiaires de la biohydrogénation des AG insaturés notamment), en dynamique, qui pourront être utiles pour construire ou améliorer des modèles mécanistes de fonctionnement ruminal.

Effects of the dietary percentage of concentrate and oil supplementation on the *in vitro* fermentation, methane production and fatty acid profile

A. Serment, ^{a,b,*} P. Schmidely, ^{a,b} Giger-Reverdin, S., ^{a,b} Dhumez, O., ^{a,b} L. P. Broudiscou, ^{a,b} and D. Sauvant ^{a,b}

^a AgroParisTech, UMR791 Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, 16 rue Claude Bernard, F-75005 Paris, France

^b INRA, UMR791 Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, 16 rue Claude Bernard, F-75005 Paris, France

* Corresponding author: Amélie Serment
tel.: 33 1 44 08 17 66 fax: 33 1 44 08 18 53
E-mail address: amelie.serment@agroparistech.fr

En préparation pour Journal of the Science of Food and Agriculture

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the effects of the dietary percentage of concentrate and oil supplementation (mix of linseed oil and sunflower oil, 1:1 v/v) on rumen fermentation, methane production and fatty acid (FA) profile, using an *in vitro* gas production technique. Two total mixed rations, varying by their percentage of concentrate were used as a substrate: a low-concentrate diet (L, 35% concentrate on dry matter basis) and a high-concentrate one (H, 70%). They were incubated in rumen juice, from 3 ruminally cannulated goats fed *ad libitum* the L diet and from 3 others fed the H diet, respectively. Oil was added at a level of 10% of substrate dry matter. Cumulative gas production and its composition in carbon dioxide, methane (CH₄) and hydrogen, volatile fatty acid (VFA) concentration and profile, soluble carbohydrates (SC) and ammonia (NH₃) concentrations, pH, and FA profile of the fermentation juice were measured. The fermentation evolutions were studied using the HFT gas-test method at the incubation times of 0, 3, 6, 9, 12 and 24 h. Increasing the dietary percentage of concentrate increased total gas production, concentrations of SC and of total VFA, and butyrate proportion and decreased the NH₃-N concentration, the pH, the acetate to propionate ratio and the proportions of branched-chain VFA. Effect of oil supplementation on fermentation was almost null. The dietary percentage of concentrate increased CH₄ in term of production and proportion (except between 12 and 24 h) of total gases, while oil supplementation had no effect on CH₄ production, but reduced molar proportion of CH₄. The FA biohydrogenation process occurred over time, as the proportion of C18:0 still increased until 24 h of incubation. However, reactions mainly occurred during first hours of the incubation. The effect of percentage of concentrate and oil supplementation on the intermediates of biohydrogenation seems to be linked to the initial contents of their precursor in the substrates and oil. The proportion of *trans*-FA was increased by the percentage of concentrate and oil supplementation. The *trans*-11 C18:1 is the major *trans* C18:1. Thanks to the dynamic approach and the number of the measurements, in particular in CH₄ production and the measurement of the intermediates of the unsaturated FA biohydrogenation, this present study can provide useful data to build novel or improve existing dynamic mechanistic model of rumen functioning.

Keywords: *in vitro* gas production, methane production, fatty acid, rumen, percentage of concentrate, oil

Abbreviations: ADFom, acid detergent fibre expressed exclusive of residual ash or lignocellulose; ADL, lignin determined by solubilisation of cellulose with sulphuric acid; aNDFom, NDF assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash; BCVFA, branched-chain volatile fatty acids; BH, biohydrogenation; BW, body weight; DIM, day in milk; df, degree of freedom; DM, dry matter; FA, fatty acid; F:C, forage to concentrate ratio; GLM, Generalized Linear Model; LSMEAN, Least-squares mean; N, nitrogen; NH₃, ammonia; PDI, truly digestible proteins in the small intestine; OM, organic matter; SEM., Standard error of the mean; TMR, total mixed ration; VFA, volatile fatty acid

INTRODUCTION

In ruminants, eructed methane (CH₄) is produced from the reduction of carbon dioxide (CO₂) by molecular hydrogen (H₂) during methanogenesis in the rumen, which makes it a contributor to the greenhouse gas effect, and then global warming (Moss et al., 2000). The dietary percentage of concentrate may have an effect on methanogenesis. In fact, as reviewed by Sauvant et al. (2011), the relationship between the dietary percentage of concentrate and the production of CH₄ (expressed on a digestible organic matter basis) is curvilinear: when the percentage of concentrate is ranged between 0 and 30-40%, CH₄ emissions are quite stable or slightly increase, whereas the methanogenesis is reduced with higher percentage of concentrate in the diets. Increasing the dietary percentage of concentrate results in an increase of feed intake, rates of ruminal fermentation and feed turnover, which modify physicochemical conditions and microbial populations in the rumen (Martin et al., 2010). Notably, increasing the percentage of concentrate decreases rumen pH which can shift the metabolic pathways in the rumen, and particularly inhibit methanogenesis (Demeyer and Henderickx, 1967; Van Kessel and Russell, 1996). Modifications of the fermentation profile from acetate to propionate result a lower CH₄ production. In fact, propionate competes against CH₄ as molecular H₂ sink and the lower production of acetate decreases the release of molecular H₂ in the rumen (Janssen, 2010). Methane emissions can be mitigated by additives and dietary ingredients (Martin et al., 2010). As an example, adding lipids to the diets can reduce CH₄ production by lowering ruminal fermentability and, to a lesser extent, increasing H₂ sinks through hydrogenation of the dietary unsaturated FA (Johnson and Johnson, 1995; Beauchemin et al., 2009; Martin et al., 2010). However, the inhibitory effect on rumen methanogenesis depends on both amount and source of fat (degree of unsaturation for example) (Popova et al., 2011).

Dietary lipids are first lipolyzed by microbial lipases with production of free unsaturated FA, that further undergo microbial biohydrogenation (BH) of the double bonds with the production of saturated FA via isomerization to *trans* FA intermediates (Harfoot and Hazlewood, 1997; Jenkins et al., 2008; Lourenço et al., 2010). The factors interfering on the rumen BH of FA are relatively well-known, notably by *in vitro* studies: amount and source of fat (oil, grain or pure FA, protected form or not) (Beam et al., 2000), ruminal pH (Van Nevel and Demeyer, 1996) or dietary percentage of concentrate (Latham et al., 1972). However, the interactions between these factors were not as well studied, mainly the interaction between supplementation of fat and percentage of concentrate (Wang et al., 2002).

The objective of this study was to study the interaction between the dietary percentage of concentrate and oil supplementation (polyunsaturated FA) on the *in vitro* fermentation and methane production. A second objective was to study the influence of these factors on the processes of biohydrogenation. An adaptation of the syringes' method of Hohenheim University (Menke et al., 1979) which allows to measure dynamic patterns of fermentation and gas production (Maaroufi et al., 2009) was used.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of the Substrates

The substrates tested *in vitro* were two total mixed rations (TMR) differing by their percentage of concentrate: high percentage of concentrate (H, 70% of concentrate / DM) *vs.* low percentage of concentrate (L, 35% of concentrate / DM). These substrates were previously used *in vivo* (Serment et al., 2011) and *in vitro* (Serment et al., 2012). Both substrates were composed of grass hay (46% of forage DM) and dehydrated alfalfa hay (Rumiluz, Désialis, Paris, France; 54% of forage DM) for the forage part, and of a commercial concentrate (Agralys Aliment, Châteaudun, France) and sugar beet pulp silage for the concentrate part. Soybean meal and palm oil calcium salt were added to the concentrate part of the L substrate so that this substrate had similar calculated crude protein and total FA contents as the H substrate. The ingredient composition of both substrates was given in Serment et al. (2011).

Samples of each substrate were dried at 60°C in an air-oven for 48 h, and ground to pass a 1 mm sieve using a hammer mill (Retsch GmbH, Haan, Germany). About 200 mg DM of sample were exactly weighed into a 100 mL calibrated glass syringes with pistons lubricated with vaseline (Menke et al., 1979).

DM content of the substrates was determined by oven-drying at 103°C for 24 h (AFNOR, 1982). Ash and starch contents were analysed according to ISO (1978) and AFNOR (1997) methods, respectively. Cell wall content was estimated by the neutral detergent fibre method of Van Soest and Wine (1967) modified by Giger et al. (1987) with the use of a heat stable α -amylase but without sodium sulfite and decalin as proposed by Robertson and Van Soest (1981) and expressed exclusive of residual ash (aNDFom). Lignocellulose (ADFom) and H₂SO₄ 72% lignin (ADL) were obtained using a sequential approach on the NDF residue (Giger et al., 1987) and expressed exclusive of residual ash. Total N was determined by the Dumas technique (Sweeney and Rexroad, 1987). Analysis of FA contents was described by Andrade and Schmidely (2006) with an extraction of lipid achieved according to Folch et al. (1957).

Animal Donors and Rumen Fluid Sampling

Animal donors were six ruminally fistulated goats (BW = 72.9 ± 7.6 kg) in mid-lactation (DIM = 108 ± 3.6 d; RMY = 3.2 ± 0.47 kg). They were fed *ad libitum* twice a day. Three of them were fed the H diet while the three other were fed the L diet. Details on housing of goats were given in Serment et al. (2011; 2012). Rumen contents were collected before the morning feeding and samples of individual rumen contents were filtered through a nylon cloth (150 µm-pore). Rumen fluids from animals of the same experimental group were pooled and transferred into a pre-warmed thermos flask saturated with CO₂. The two thermos flasks were taken immediately to the laboratory.

Preparation of the Syringes and Incubation

Strained rumen fluids from animals fed the H or L diets were mixed with a buffered mineral solution (Menke and Steingass, 1988) at a ratio of 1:2 (v/v) under flushing of CO₂, at 39°C to form the H or L inocula, respectively.

The rotor, in which the syringes were placed, contains 57 syringes (Table 1). Thirty mL of the H inoculum were added to 200 mg DM of the H substrate (20 syringes, called H syringes), and the L inoculum was added to the L substrate (20 syringes, called L syringes). The half of these syringes was supplemented with 20 mg of a mix of linseed oil and sunflower oil (1:1 v/v) and represented 10% of substrate DM. Supplementary syringes (blanks) were filled with the H and L inocula without any substrate. The syringes were placed in a rotor inside an incubator at 39°C.

A run corresponded to a 24-hour incubation and incubation times were 3, 6, 9, 12, 24 h. Syringes were assigned to a specific incubation time so that at each incubation time, each experimental combination was duplicated (Table 1). The *in vitro* study was conducted 4 times (4 successive days) under similar conditions, with rumen juice collected each day.

Table 1. Composition of syringes during a run.

Inoculum (+ Substrate) ² Oil supplementation ³	Blank ¹		Substrate + Inoculum ¹			
	L Blank	H Blank	L Control	L Oil	H Control	H Oil
Incubation time (h)	Number of concerned syringes					
0						
3	2	2	2	2	2	2
6	2	2	2	2	2	2
9	2	2	2	2	2	2
12	2	1	2	2	2	2
24	1	1	2	2	2	2

¹ Blank: syringe containing only 30 mL of inoculum (mix of rumen juice from 3 goats and buffer mineral solution (1:2 v/v)); Substrate + Inoculum: syringe containing 30 mL of inoculum and 20 mg DM of substrate.

² L Blank: inoculum from goats fed the L diet; H Blank: inoculum from goats fed the H diet; L: total mixed ration with 35% of concentrate and inoculum from goats fed this diet; H: total mixed ration with 70% of concentrate and inoculum from goats fed this diet.

³ Control: no supplementation; Oil = supplementation with mixture of linseed oil and sunflower oil (1:1 v/v).

Sampling and Chemical Analyses

At each incubation time, gas volumes of all syringes were recorded. Syringes assigned to the incubation time were placed at 4°C to stop fermentation, whereas others were put back into the incubator until the next incubation time. At 3 and 12 h, before being put back into the incubator, syringes were degassed. A gas sample was collected from syringes by aspiration of 2 mL of gas and composition of gases (CH₄, CO₂, H₂) was determined by micro gas-chromatography (Varian, Les Ulis, France). Calibration was done with a mixture of gases prepared by Air Liquide (Air Liquide, Mitry-Mory, France). The syringe was then emptied in a tube and pH was immediately determined. Six mL of fermentation juice was collected and acidified with H₃PO₄ 25% (vol/vol) for NH₃-N (3 ml) and VFA (3 mL) analysis. Three mL

were mixed with HCl 0.15% (vol/vol) for soluble carbohydrates analysis. All samples and tubes containing the remaining fermentation juice were kept frozen at -20°C.

Analysis of NH₃-N was done with an autoanalyser (Technicon, Oise, France), according to Wheatherburn (1967) method, and analysis of the soluble carbohydrates according to Brown and Boston (1961) method. The VFA were analysed by gas chromatography (Kristensen, 2000). The tubes containing the remaining fermentation juice were freeze-dried. Samples were pooled by incubation time and by experimental combination before FA analysis. Fat extraction from these samples and FA analysis were carried out according to the method of Bas et al. (2007). Fat was extracted with a solution of CHCl₃ / methanol/ distilled water and with a solution of KCl and HCl. Heneicosanoic acid methyl ester was added to the solution as an internal standard. The FA were firstly methylated with sodium methanolate and then with a methanolic BF₃ solution (14%, wt/vol) at room temperature. Methyl-esters of FA were recuperated in hexane and separated using a gas chromatograph Varian Chrompack CP 3800 system (Varian SA, Les Ulis, France), and using a 100 m x 0.25 mm fused silica capillary column (CP-Sil 88, Varian SA, Les Ulis, France). The split ratio was 20:1 and injector and detector temperatures were maintained at 250°C. The column was at an initial temperature of 50°C for 1 min. The column temperature increased at a rate of 10°C / min up to 170°C (held for 78 min) and then increased at a rate of 5°C / min up to 220°C (held for 10 min). FA methyl esters were identified with methyl ester standards and FA mixture ester mixture (purity at least 98%) purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA).

Calculations and Statistical Analysis

Data were expressed as a standard basis of 200 mg DM and of 30 mL. They were not corrected by data of blanks, as indicated in Serment et al. (2012). From gas volume recording, cumulative gas production was calculated for each syringe.

Gas composition was studied by time intervals: 0 – 3 h, 3 – 12 h and 12 – 24 h of incubation. Statistical analyses were done for each incubation time or by time interval for gas composition. Data were analysed using the GLM procedure of SAS (SAS Institute, 2000):

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha*\beta_{ij} + \gamma_k + \varepsilon_{ijkl}$$

Y_{ijkl} is the dependant variable, μ the overall mean, α_i the effect of the dietary percentage of concentrate (H syringe vs L syringe, 1 df), β_j the effect of oil supplementation (1 df), $\alpha*\beta_{ij}$ the effect of the interaction between the percentage of concentrate and oil supplementation (1 df), γ_k the effect of the run (3 df), ε_{ijkl} the residual error, and l the index of repetition (equal to 2). As samples were pooled for FA analysis, the effect of the day was deleted from the statistical analysis of FA profiles. All the data presented in this paper are least-squares means \pm SEM.

RESULTS

Chemical Composition of the Substrates and Supplemented Oil

The H substrate had lower aNDFom and ADFom contents and higher starch content than the L one (Table 2). The H and L substrates had similar contents in crude protein and FA (Table 2). The H substrate had lower proportions of C16:0 and C18:0 and higher proportions of *cis*-9 C18:1, *cis*-9, *cis*-12 C18:2 in dietary FA than the L one (Table 2). Oil supplementation was principally composed of *cis*-9 C18:1, *cis*-9, *cis*-12 C18:2 and *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3 (Table 2).

Table 2. Chemical composition of the experimental substrates and of supplemented oil.

	L ¹	H ²	Oil ³
	g / 100g DM		
Crude Protein	14.4	14.1	
aNDFom	40.5	32.6	
ADFom	23.0	18.0	
ADL	3.12	2.30	
Starch	4.39	9.39	
Ash	8.40	7.05	
Fatty Acid	2.35	2.55	
	g/100 g total FA		
Total fatty acid			
C _{14:0}	2.00	1.22	0.06
C _{16:0}	32.7	16.5	6.22
C _{18:0}	4.13	3.33	3.75
<i>cis</i> -9 C _{18:1}	24.9	28.0	24.0
<i>cis</i> -(9,12) C _{18:2}	20.6	34.8	37.0
<i>cis</i> -(9,12,15) C _{18:3}	9.43	9.71	27.1

¹ L = Substrate containing 65% forage and 35% concentrate, DM basis.

² H = Substrate containing 30% forage and 70% concentrate, DM basis.

³ Oil = mixture of linseed oil and sunflower oil (1:1 v/v).

Characteristics of Rumen Fluids and Fermentations in “Blanks”

Characteristics of rumen fluids and of fermentations in “blanks” (L inoculum or H inoculum without substrate) were not presented in this paper, as they were similar to those of Serment et al. (2012).

Effects of the Dietary Percentage of Concentrate and Oil Supplementation on Fermentations

Concentrations of soluble carbohydrates (Figure 1a) and of total VFA (Figure 1b) were higher in the H syringes than in the L ones, whereas the concentration of NH₃-N (Figure 1c) and pH (Figure 1d) were lower. The molar proportions of acetate and of branched-chain VFA (BCVFA) and the acetate to propionate ratio (A:P ratio) were lower in the H syringes than in

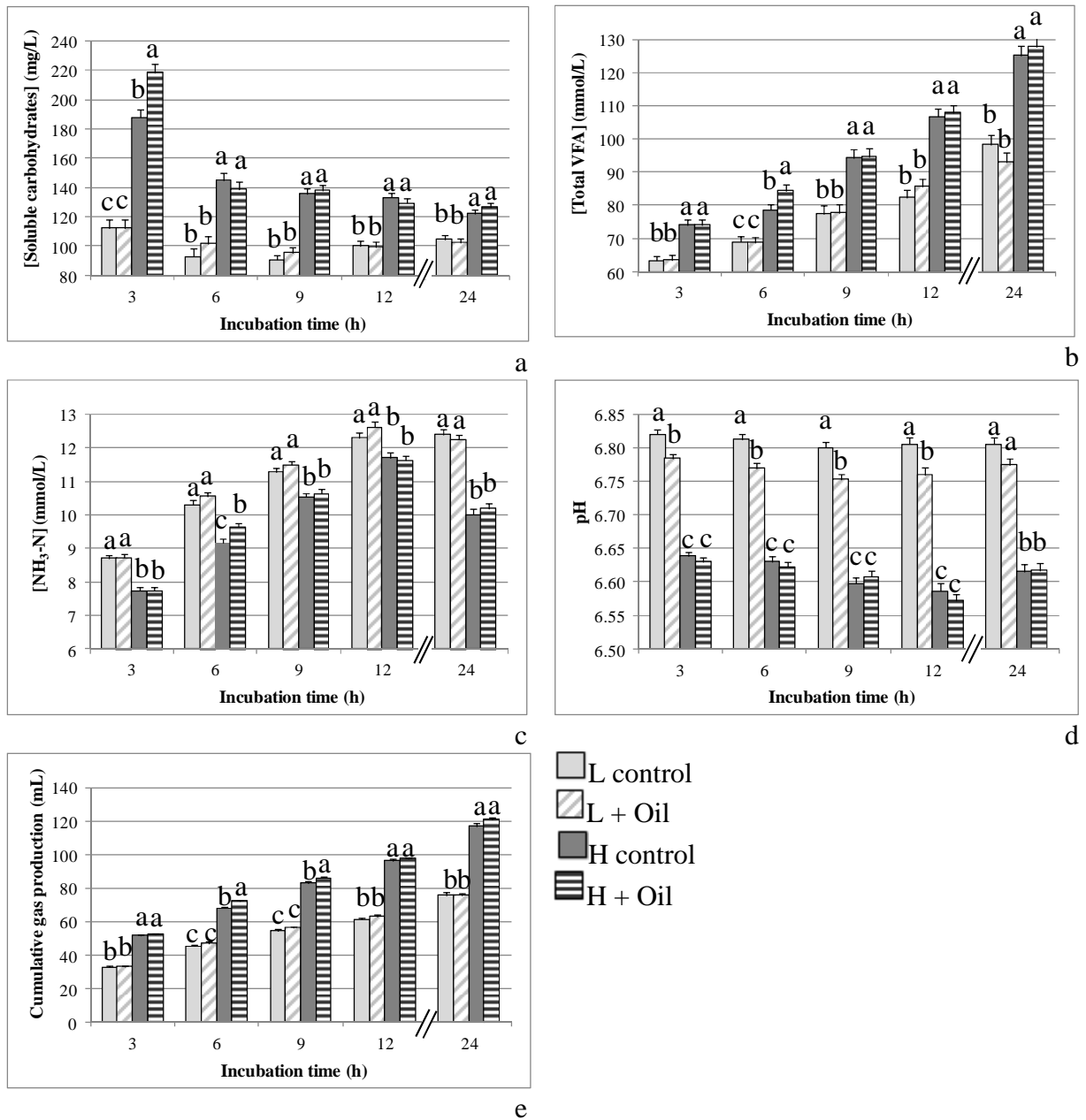
the L ones, whereas the proportions of propionate, butyrate and valerate were higher (Table 3).

Oil supplementation increased the concentration of soluble carbohydrates only in the H syringes at 3 h (Figure 1a) and the concentration of $\text{NH}_3\text{-N}$ at 6 h (Figure 1c). It decreased pH in the L syringes at 3, 6, 9 and 12 h of incubation (Figure 1d). Oil supplementation tended to increase the concentration of total VFA for the H syringes and the proportion of acetate at 6 h (Table 3), and decreased the proportion of propionate at 12 h (Table 3). Thus interaction between dietary percentage of concentrate and oil supplementation on these measurements was low.

Effects of the Dietary Percentage of Concentrate and Oil Supplementation on Gas Production

Cumulative gas production (Figure 1e), productions of CH_4 , CO_2 and H_2 , and molar proportion of CH_4 (except between 12 and 24 h) (Table 4) were higher in the H syringes than in the L ones.

Oil supplementation increased cumulative gas production at 6 and 9 h of incubation (Figure 1e). It decreased the molar proportion of CH_4 whatever the time interval, but had no effect on the production of CH_4 (Table 4). It decreased also the H_2 production between 0 and 3 h (only in the H syringes), and between 3 and 12 h of incubation (Table 4). It tended to decrease the CO_2 production between 12 and 24 of incubation (Table 4).



^{a,d} Within a row, means without a common superscript letter differ ($P < 0.05$).

Figure 1. Effect of the dietary percentage of concentrate (L: 35%, H: 70%; DM basis) and oil supplementation (20 mg of linseed oil and sunflower oil (1:1 v/v)) on concentrations of soluble carbohydrates (a), of total volatile fatty acids (b), of ammonia-N (c), pH (d) and cumulative gas production (e) during an in vitro 24-hour incubation (200 mg DM of substrate for 30 mL of inoculum).

Table 3. Effect of the dietary percentage of concentrate (% C) and oil supplementation (O) on molar proportions of volatile fatty acids during an in vitro 24-hour incubation (200 mg DM of substrate for 30 mL of inoculum).

Time (h)	L ¹		H ¹		SEM	P-value			Day
	Control	Oil ¹	Control	Oil ¹		% C	O	% C x O	
Total VFA (mmol/L)									
3	63.3 ^b	63.6 ^b	74.1 ^a	74.0 ^a	1.40	<0.001	0.95	0.92	<0.001
6	68.9 ^c	68.7 ^c	78.6 ^b	84.5 ^a	1.49	<0.001	0.11	0.09	0.16
9	77.4 ^b	77.8 ^b	94.3 ^a	94.5 ^a	1.99	<0.001	0.91	0.98	0.48
12	82.4 ^b	85.5 ^b	106.8 ^a	108.0 ^a	2.65	<0.001	0.36	0.67	<0.001
24	98.3 ^b	93.0 ^b	125.2 ^a	127.8 ^a	3.26	<0.001	0.63	0.18	0.02
VFA, mol/100 mol									
Acetate (A)									
3	64.3 ^a	64.1 ^a	59.2 ^b	59.0 ^b	0.49	<0.001	0.37	0.95	0.25
6	62.4 ^a	62.4 ^a	57.7 ^c	58.6 ^b	0.41	<0.001	0.11	0.08	0.13
9	62.4 ^a	62.7 ^a	58.0 ^b	58.0 ^b	0.46	<0.001	0.68	0.60	0.60
12	61.8 ^a	62.1 ^a	57.4 ^b	57.7 ^b	0.43	<0.001	0.16	0.89	<0.001
24	61.2 ^a	61.0 ^a	55.5 ^b	55.2 ^b	0.55	<0.001	0.42	0.78	0.01
Propionate (P)									
3	19.1 ^b	19.2 ^b	21.3 ^a	21.3 ^a	0.20	<0.001	0.80	0.95	0.003
6	19.4 ^b	19.4 ^b	20.7 ^a	20.4 ^a	0.12	<0.001	0.13	0.43	0.01
9	19.0 ^b	18.8 ^b	19.8 ^a	19.7 ^a	0.10	<0.001	0.16	0.31	<0.001
12	18.9 ^b	18.7 ^b	19.2 ^a	19.1 ^a	0.05	<0.001	0.04	0.52	0.001
24	18.5 ^b	18.5 ^b	18.7 ^a	18.9 ^a	0.05	<0.001	0.43	0.07	0.009
Butyrate									
3	12.2 ^b	12.4 ^b	15.9 ^a	16.0 ^a	0.34	<0.001	0.30	0.98	0.003
6	13.3 ^c	13.4 ^c	17.4 ^a	16.9 ^b	0.36	<0.001	0.18	0.07	<0.001
9	13.4 ^b	13.3 ^b	17.5 ^a	17.6 ^a	0.40	<0.001	0.91	0.74	0.18
12	13.7 ^b	13.6 ^b	18.0 ^a	17.8 ^a	0.40	<0.001	0.23	0.73	<0.001
24	13.7 ^b	13.9 ^b	18.3 ^a	18.4 ^a	0.43	<0.001	0.25	0.91	<0.001

Table 3. (continued)

Time (h)	L ¹		H ¹		SEM	P-value			Day
	Control	Oil ¹	Control	Oil ¹		% C	O	% C x O	
BCVFA ²									
3	2.39 ^a	2.41 ^a	1.79 ^b	1.79 ^b	0.064	<0.001	0.82	0.86	0.01
6	2.86 ^a	2.73 ^a	2.18 ^b	2.10 ^b	0.067	<0.001	0.15	0.76	0.12
9	3.12 ^a	2.90 ^a	2.55 ^b	2.57 ^b	0.060	<0.001	0.29	0.19	0.09
12	3.45 ^a	3.38 ^a	3.04 ^b	3.03 ^b	0.050	<0.001	0.60	0.68	0.28
24	4.14	4.16	4.31	4.33	0.041	0.02	0.75	0.99	0.04
Valerate									
3	1.28 ^b	1.29 ^b	1.40 ^a	1.42 ^a	0.020	<0.001	0.67	0.80	0.12
6	1.53 ^b	1.56 ^b	1.66 ^a	1.60 ^{ab}	0.016	0.006	0.53	0.13	0.15
9	1.63 ^b	1.62 ^b	1.80 ^a	1.82 ^a	0.029	<0.001	0.88	0.76	0.36
12	1.79 ^b	1.76 ^b	2.06 ^a	2.04 ^a	0.033	<0.001	0.58	0.82	0.01
24	2.00 ^b	2.03 ^b	2.65 ^a	2.65 ^a	0.062	<0.001	0.65	0.74	0.01
A:P ratio									
3	3.36 ^a	3.35 ^a	2.78 ^b	2.77 ^b	0.054	<0.001	0.52	0.95	0.04
6	3.21 ^a	3.22 ^a	2.79 ^b	2.87 ^b	0.039	<0.001	0.12	0.23	0.05
9	3.28 ^a	3.34 ^a	2.94 ^b	2.94 ^b	0.038	<0.001	0.35	0.40	0.04
12	3.28 ^a	3.32 ^a	2.99 ^b	3.02 ^b	0.029	<0.001	0.05	0.61	0.003
24	3.30 ^a	3.31 ^a	2.96 ^b	2.92 ^b	0.036	<0.001	0.44	0.32	0.03

^{a,d} Within a row, means without a common superscript letter differ ($P < 0.05$).

¹L = Substrate and diet of the donor animals containing 65% forage and 35% concentrate, DM basis; H = Substrate and diet of the donor animals containing 30% forage and 70% concentrate, DM basis; Oil = 20 mg of linseed oil and sunflower oil (1:1 v/v).

²BCVFA = branched-chain VFA (isobutyrate + isovalerate).

Table 4. Effect of the dietary percentage of concentrate (% C) and oil supplementation (O) on gas production and molar proportion of gas during an in vitro 24-hour incubation (200 mg DM of substrate for 30 mL of inoculum).

Time (h)	L ¹		H ¹		SEM	P-value			
	Control	Oil ¹	Control	Oil ¹		% C	O	% C x O	Day
CH ₄ production (μmol) ²									
0-3	226 ^b	223 ^b	368 ^a	369 ^a	13.9	<0.001	0.68	0.55	<0.001
3-12	225 ^b	230 ^b	354 ^a	353 ^a	11.7	<0.001	0.67	0.50	0.05
12-24	119 ^b	115 ^b	197 ^a	191 ^a	9.30	<0.001	0.27	0.85	<0.001
CO ₂ production (μmol) ²									
0-3	972 ^b	965 ^b	1537 ^a	1534 ^a	56.4	<0.001	0.83	0.94	<0.001
3-12	805 ^b	851 ^b	1245 ^a	1244 ^a	39.5	<0.001	0.21	0.19	0.004
12-24	352 ^b	336 ^b	569 ^a	538 ^a	25.7	<0.001	0.08	0.58	<0.001
H ₂ production (μmol) ²									
0-3	0.588 ^b	0.503 ^b	0.836 ^a	0.495 ^b	0.0344	0.02	<0.001	0.01	0.20
3-12	0.419 ^b	0.277 ^c	0.617 ^a	0.453 ^b	0.0231	<0.001	<0.001	0.38	0.007
12-24	0.118 ^b	0.102 ^b	0.173 ^a	0.175 ^a	0.0094	<0.001	0.34	0.22	<0.001
Molar proportion of CH ₄ (% total gas) ²									
0-3	17.6 ^b	17.2 ^c	18.2 ^a	18.1 ^a	0.09	<0.001	0.05	0.27	0.14
3-12	20.2 ^b	19.9 ^b	20.9 ^a	20.4 ^{ab}	0.17	0.007	0.05	0.57	<0.001
12-24	22.3 ^{ab}	21.9 ^b	22.5 ^a	21.9 ^{ab}	0.33	0.51	0.04	0.67	<0.001
CO ₂ :CH ₄ ratio ²									
0-3	4.29 ^a	4.33 ^a	4.17 ^b	4.15 ^b	0.030	<0.001	0.79	0.36	<0.001
3-12	3.58 ^b	3.71 ^a	3.51 ^c	3.52 ^c	0.034	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
12-24	2.94 ^a	2.92 ^a	2.90 ^a	2.83 ^b	0.020	<0.001	0.01	0.28	<0.001

^{a,d} Within a row, means without a common superscript letter differ ($P < 0.05$).

¹L = Substrate and diet of the donor animals containing 65% forage and 35% concentrate, DM basis; H = Substrate and diet of the donor animals containing 30% forage and 70% concentrate, DM basis; Oil = 20 mg of linseed oil and sunflower oil (1:1 v/v).

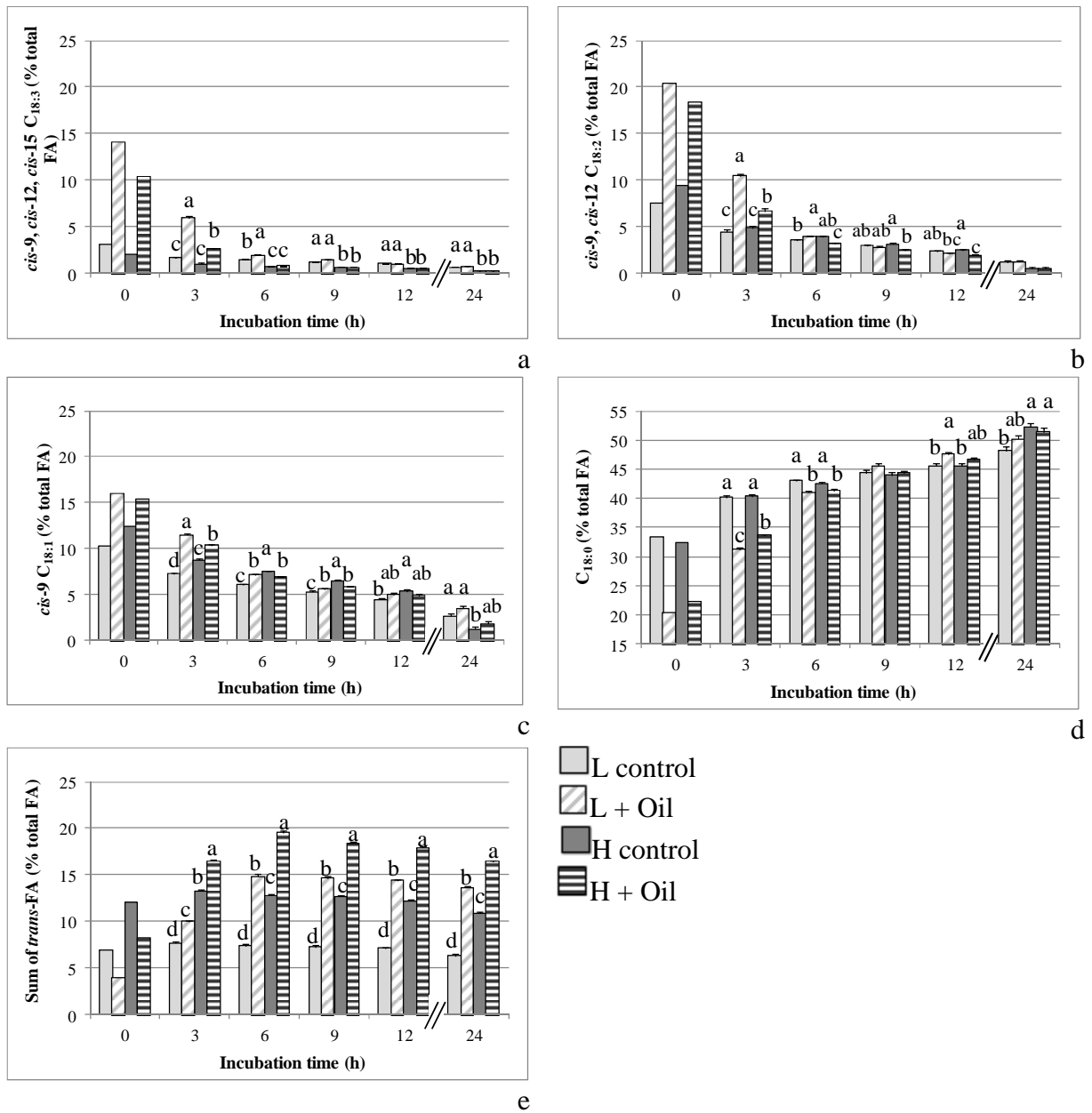
² These values were corrected from temperature.

Effects of the Dietary Percentage of Concentrate and Oil Supplementation on Fatty Acid Profiles

Increasing the dietary percentage of concentrate decreased the proportion of *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3 (Figure 2a), and the proportions of *cis*-9, *cis*-12 C18:2 and *cis*-9 C18:1 at 24 h (Figure 2b and Figure 2c). The percentage of concentrate increased the proportion of C18:0 at 24 h (Figure 2d) and the proportions of all *trans* FA (Table 5 and Figure 2e).

Oil supplementation increased at 3 h the proportions of *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3 (Figure 2a), *cis*-9, *cis*-12 C18:2 (Figure 2b), and *cis*-9 C18:1 (Figure 2c). Oil supplementation decreased the proportion of C18:0 at 3 and 6 h, but increased this proportion at 12 h (Figure 2d). Oil supplementation increased the proportions *trans*-FA whatever the incubation time (Figure 2e). Numerous interactions between the percentage of concentrate and oil supplementation were observed, notably during the first hours of incubation. Oil supplementation increased the proportions of *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3 at 6 h only in the L syringes (Figure 2a). Oil supplementation increased the proportions of *cis*-9, *cis*-12 C18:2 and *cis*-9 C18:1 in the L syringes, whereas it was decreased in the H syringes at 6 h (Figure 2b, Figure 2c).

Trans-10, *cis*-12 C18:2 was not detected in the syringes. *Trans*-11 C18:1 isomer is the major *trans*-FA (between 41 and 58% of *trans*-FA) (Table 5). With oil supplementation, the proportions of *cis*-9, *trans*-11 C18:2 and *trans*-11, *cis*-15 C18:2 reached their maximum after 3 h of incubation, whereas the proportion of *trans* FA reached their maximum at around 6 h of incubation (Table 5).



^{a,d} Within a row, means without a common superscript letter differ ($P < 0.05$).

Values at the beginning of the incubation were done for information purposes only. No statistical tests were done on these values.

Figure 2. Effect of the dietary percentage of concentrate (L: 35%, H: 70% ; DM basis) and oil supplementation (20 mg of linseed oil and sunflower oil (1:1 v/v)) on the composition in linolenic acid (*cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C_{18:3}, a), in linoleic acid (*cis*-9, *cis*-12 C_{18:2}, b), in oleic acid (*cis*-9 C_{18:1}, c), in stearic acid (C_{18:0}, d), and in total trans-FA (e), during an in vitro 24-hour incubation (200 mg DM of substrate for 30 mL of inoculum).

Table 5. Effect of the dietary percentage of concentrate (% C) and oil supplementation (O) on composition in intermediates of the biohydrogenation of polyunsaturated FA during an in vitro 24-hour incubation (200 mg DM of substrate for 30 mL of inoculum).

Time (h)	L ¹		H ¹		SEM	P-value		
	Control	Oil ¹	Control	Oil ¹		% C	O	% C x O
FA, g/100 g total FA								
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 C _{18:2}								
3	0.228 ^c	1.04 ^b	0.214 ^c	1.32 ^a	0.1992	0.05	<0.001	0.03
6	0.189 ^c	0.882 ^a	0.209 ^c	0.568 ^b	0.1171	0.05	<0.001	0.03
9	0.198 ^c	0.829 ^a	0.300 ^c	0.541 ^b	0.1007	0.16	0.001	0.02
12	0.353 ^b	0.860 ^a	0.286 ^b	0.447 ^b	0.0942	0.02	0.007	0.06
24	0.401 ^b	0.724 ^a	0.162 ^c	0.297 ^{bc}	0.0851	<0.001	<0.001	0.06
<i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15 C _{18:2}								
3	0.142 ^b	1.12 ^a	0.158 ^b	1.28 ^a	0.2138	0.12	<0.001	0.18
6	0.138 ^b	1.04 ^a	0.138 ^b	0.927 ^a	0.1724	0.18	<0.001	0.19
9	0.122 ^b	0.872 ^a	0.116 ^b	0.859 ^a	0.1509	0.07	<0.001	0.41
12	0.115 ^b	0.816 ^a	0.122 ^b	0.765 ^a	0.1363	0.34	<0.001	0.22
24	0.062 ^b	0.694 ^a	0.098 ^b	0.755 ^a	0.1310	0.12	<0.001	0.64
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -12 C _{18:2}								
3	0.050 ^c	0.113 ^a	0.051 ^c	0.071 ^b	0.0103	0.002	<0.001	0.001
6	0.045 ^{ab}	0.052 ^a	0.036 ^b	0.031 ^b	0.0036	0.02	0.76	0.17
9	0.041 ^a	0.045 ^a	0.041 ^a	0.033 ^b	0.0019	0.02	0.34	0.02
12	0.041 ^a	0.035 ^{ab}	0.029 ^b	0.032 ^{ab}	0.0020	0.05	0.65	0.13
24	0.008	0.024	nd	0.014	0.0048	0.36	0.14	0.91
<i>trans</i> -10 C _{18:1}								
3	0.476 ^b	0.433 ^b	0.994 ^a	0.910 ^a	0.1026	<0.001	0.17	0.62
6	0.437 ^c	0.675 ^b	1.04 ^a	1.10 ^a	0.1095	<0.001	<0.001	0.005
9	0.368 ^c	0.664 ^b	0.915 ^a	1.01 ^a	0.1015	<0.001	<0.001	0.04
12	0.393 ^c	0.711 ^b	0.983 ^a	0.959 ^a	0.0973	<0.001	0.02	0.009
24	0.318 ^c	0.573 ^b	0.962 ^a	0.969 ^a	0.1118	<0.001	0.01	0.02
<i>trans</i> -11 C _{18:1}								
3	4.06 ^d	5.78 ^c	6.99 ^b	9.63 ^a	0.822	<0.001	<0.001	0.005
6	3.83 ^d	8.53 ^b	6.37 ^c	11.2 ^a	1.105	<0.001	<0.001	0.42
9	3.74 ^d	8.36 ^b	6.24 ^c	10.5 ^a	1.015	<0.001	<0.001	0.04
12	3.53 ^d	8.29 ^c	5.85 ^b	10.2 ^a	1.009	<0.001	<0.001	0.003
24	2.87 ^d	7.76 ^b	4.46 ^c	8.77 ^a	0.969	<0.001	<0.001	0.05
<i>trans</i> -15 C _{18:1}								
3	0.467 ^d	0.610 ^c	0.810 ^b	0.903 ^a	0.0689	<0.001	<0.001	0.07
6	0.471 ^c	0.858 ^b	0.836 ^b	1.09 ^a	0.0891	<0.001	<0.001	0.004
9	0.486 ^c	0.864 ^b	0.826 ^b	1.03 ^a	0.0802	<0.001	<0.001	0.005
12	0.468 ^c	0.829 ^b	0.806 ^b	1.02 ^a	0.0806	<0.001	<0.001	0.01
24	0.413 ^c	0.778 ^b	0.781 ^b	0.970 ^a	0.0815	<0.001	<0.001	<0.001

^{a,d} Within a row, means without a common superscript letter differ ($P < 0.05$).

¹L = Substrate and diet of donor animal containing 65% forage and 35% concentrate, DM basis; H = Substrate and diet of donor animal containing 30% forage and 70% concentrate, DM basis; Oil = 20 mg of linseed oil and sunflower oil (1:1 v/v).

DISCUSSION

Rumen Fermentation

The effect of the percentage of concentrate studied in this experiment can be attributed to the simultaneous effects of the substrate, the inoculum, and the interaction between them. In the present study, rumen microorganisms of the inocula were exposed to substrates they were accustomed, as diets fed the animal donors were identical to substrates added to the syringes. Fermentations were more intense in the H syringes than in the L ones (higher total gas production, concentrations of soluble carbohydrates and total VFA), which can be explained by the higher energy and starch contents of the H substrate compared with the L substrate, as it was shown *in vitro* by Fuentes et al. (2009) and Wang et al. (2002) (for total VFA) with other substrates differing by their proportion of concentrate.

Differences in fermentations between the H and L syringes can be also explained by the differences between the inocula. As observed by Serment et al. (2012), fermentations in the H blanks were higher than in the L blanks, demonstrating differences in activity of the inocula. Higher microbial activity and higher fermentable organic matter content of the H inoculum compared with the L one can be hypothesized. Differences between the L and the H syringes were similar or slightly higher than the differences reported by Serment et al. (2012) for the same contents of syringes, which can be attributed to a well-known effect of the day of rumen juice sampling (Menke and Steingass, 1988).

As previously observed *in vivo* in dairy goats, with the same diets (Serment et al., 2011) and *in vitro* (Serment et al., 2012), the NH₃-N concentration and proportions of BCVFA were lower in the H syringes than in the L ones. The higher energy availability in the H syringes would allow higher microbial growth, which would capture more NH₃-N in the medium to sustain this growth, compared with phenomena occurred in the L syringes. The reduction of BCVFA possibly results from the reduction in catabolism of branched-chain amino-acid. In fact, isobutyrate and isovalerate are mainly originated from the catabolism of valine and leucine (Allison, 1969). Fuentes et al. (2009) observed *in vitro* a decrease of the NH₃-N concentration with an increase in BCVFA production due to the increase of the percentage of concentrate.

Compared with *in vivo* study with the same diets fed to dairy goats (Serment et al., 2011), *in vitro* profile in VFA in the H syringes turn more toward butyrate than propionate. pH was reduced by the percentage of concentrate due to the higher production of total VFA, as in Wang et al. (2002). However pH variations were not as wide-ranging as those observed *in vivo* (Serment et al., 2011). It is certainly due to the high quantity of bicarbonates and phosphates in the buffered mineral solution which allowed to maintain an acid-base environment suitable for fermentation processes (Mould et al., 2005). It can be also explained by the ratio between the substrate and the inoculum in the present study (6.6 g DM / L) which is largely lower than *in vivo* conditions (129 ± 1,1 g DM / kg of ruminal content, n = 344, Sauvart, personal communication).

In our study, effects of oil supplementation on fermentation were negligible at contrast of many *in vitro* and *in vivo* studies. In fact, numerous previous studies showed that fat

supplementation (oil or unsaturated FA) reduced ruminal fibre digestibility, associated with lower gas production, concentration of total VFA and A:P ratio (Jenkins, 1993; Zhang et al., 2008). Polyunsaturated FA are known to have a toxic effect on cellulolytic bacteria (Nagaraja et al., 1997). These microbial changes explain the shift of ruminal fermentation (lower A:P ratio) observed in the literature. In the present study, as no shift in rumen fermentation was observed, the impact of oil supplementation on microbial population seems to be low.

Higher total gas production and concentration of total VFA due to oil supplementation can be positively related to the higher concentration of soluble carbohydrates at 3 h which is difficult to explain, because lipids are not fermented in the rumen (Martin et al., 2010). Little effects of oil supplementation on fermentations can't be due to an insufficient stirring of oil because syringes were placed in the rotor which would allow an effective stirring of oil, substrate and inoculum.

Methane Production

In our study, the percentage of concentrate increased production of CH₄ and its proportion in total gases. Similar effects were observed in the *in vitro* study of Serment et al. (2012). This is probably due to several factors. First of all, higher fermentation occurred in the H syringes than in the L syringes which leads to higher gas production. Then pH observed in the syringes was certainly too high (pH > 6.5) to inhibit methanogenesis (Van Kessel and Russell, 1996). Finally, modifications of the fermentation profile from acetate to propionate were observed in the H syringes, however production of butyrate was also higher in these syringe compared with the L ones. As acetate, butyrate is known to release molecular H₂ in the rumen, possibly entering in the production of CH₄ (Janssen, 2010). It can be noticed that the proportion of CH₄ increased with time, suggesting that the slowly digestible fraction of feed (structural fibre) is associated with higher CH₄ production (Getachew et al., 2005). Furthermore, this study can help the development of mechanistic model dealing with rumen gas production (Serment and Sauvant, 2010).

In the present study, oil supplementation (10% of substrate DM) had no effect on CH₄ production even though molar proportion of CH₄ was reduced. The main mode of action of fat supplementation on the methanogenesis is a direct action on microbes implicated in the CH₄ production. Zhang et al. (2008) observed a reduction of methanogen number with supplementation of 3.5% and 7% of substrate DM of *cis*-9, *cis*-12 C18:2 or *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3 at 24 h during an *in vitro* incubation, whereas Mosoni et al. (2008) showed no effect on methanogen number with supplementation of extruded linseed before feeding. Protozoa (Doreau and Ferlay, 1995) and cellulolytic bacteria (see previous paragraph) numbers can be reduced. Other sinks of metabolic hydrogen can be favoured by fat supplementation and thus reduce the part of methanogenesis. Microbial changes favour a shift towards propionate production which is a sink of metabolic hydrogen (Lourenço et al., 2010). Zhang et al. (2008) observed such shift in VFA profile and a CH₄ reduction but it was not the case in the present study. Supplementation of unsaturated FA could potentially reduce the CH₄ production because BH of unsaturated FA is one of the sinks for metabolic hydrogen. However this process is very small (1%) compared with other sinks reduction of CO₂ to CH₄ (48%), VFA

synthesis (33%) and bacterial cell synthesis (12%) (Czerkawski, 1986). The responses of oil supplementation on methane production depend on the nature of the supplemented FA (medium or long-chain FA, degree of FA unsaturation), the availability of FA in the rumen (seed *vs.* oil), the level of supplementation and the feed composition of the diet (Boadi et al., 2004; Zhang et al., 2008; Martin et al., 2010). In the present study, sunflower and linseed oils had been chosen because of their high content in polyunsaturated long-chain FA. The level of oil supplementation had been calculated relatively to the substrate DM to reach a high value in comparison with other *in vivo* (Martin et al., 2010) and *in vitro* studies (Zhang et al., 2008; Li et al., 2010) which detected effects of fat supplementation (oil or unsaturated FA) on methane production. However, it would have been more preferable to calculate the supplementation in considering the high dilution of the substrate in the inoculum (7.5 g DM / L), rather than in considering DM of substrate. In the case of Li et al. (2010), they reduced by 69% CH₄ production by adding 3% of substrate DM of *cis*-9, *cis*-12 C18:2 with a dilution of substrate in inoculum equal to 17 g DM / L. In the present study, the dilution of oil supplementation in the inoculum certainly limited its action.

Fatty Acid Profile

The conversion of *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3 to C18:0 included mainly three intermediates: *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 C18:3, *trans*-11, *cis*-15 C18:2 and *trans*-11 C18:1 (Jenkins et al., 2008). The first intermediate (*cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 C18:3) was not detected in the present study, probably because it appeared too precociously. The conversion of *cis*-9, *cis*-12 C18:2 to C18:0 included mainly: *cis*-9, *trans*-11 C18:2 and *trans*-11 C18:1, in non-acidosis conditions (Jenkins et al., 2008). The *trans*-10, *cis*-12 C18:2 was not detected in the present study probably because pH was not sufficiently low and starch content of substrates not enough high. In their *in vitro* study with an inoculum from dairy cows and substrate richer in starch, Fuentes et al. (2009) detected this FA.

The BH process occurred over time, as the proportion of C18:0 still increased until 24 h of incubation. However, BH reactions mainly occurred during first hours of the incubation, as observed by Jouany et al. (2007). With oil supplementation, the two isomers *cis*-9, *trans*-11 C18:2 and *trans*-11, *cis*-15 C18:2 reached their maximum around 3 h of incubation, whereas *trans*-FA reached their maximum at 6 h. Without oil supplementation, no maximum was detected. It would have been useful to analyse FA profile on more incubation times before 6 h to have more precise kinetics.

The effect of percentage of concentrate and oil supplementation on the intermediates of biohydrogenation seems to be linked to the initial contents of their precursor in the substrates and oil. Increasing the percentage of concentrate increased the proportions of *trans* FA present in the syringe. Polyunsaturated FA were initially higher in the H syringes than the L syringes. The last step of hydrogenation of the *trans*-double bond seems to be saturated and *trans* FA would remain in the medium. Oil supplementation increased the proportions of *trans* FA due to the higher proportion of polyunsaturated FA in oil. However, this effect was not observed for *trans*-10 C18:1 in the H syringes. For those syringes, the production of *trans*-10 C18:1 seems to be saturated.

Few models of ruminal lipolysis and BH of unsaturated FA exist (Dijkstra et al., 2000; Harvatine and Allen, 2006; Ribeiro et al., 2007; Moate et al., 2008). One conclusion of the review of Jenkins et al. (2008), was that researchers don't often publish the data that facilitate the building or the development of models in this field. Thanks to our dynamic approach and the detail of BH intermediates, this present study can provide useful data to improve dynamic mechanistic modelling in this field.

CONCLUSIONS

The effects of the dietary percentage of concentrate and the supplementation of a mix of linseed oil and sunflower oil, on ruminal fermentations, gas production, and notably methane production, and FA profiles were studied with an *in vitro* device. The interaction between these factors was particularly significant for FA profile in first hours of the incubation. This work brings new information for building or improving dynamic and mechanistic models aimed at predicting rumen functioning, because it collected a large number of measurements measured simultaneously in a dynamic approach.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank J. Tessier and his team (INRA-AgroParisTech, UMR791 Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, Paris and Thiverval-Grignon, France) from the experimental farm, for the care of the goats and their technical assistance during sampling of rumen contents. J.-L. Le Pierres (INRA-AgroParisTech, UMR791) is gratefully acknowledged for his technical advices on the *in vitro* technique. We thank L. Péricard and F. Ternois (INRA-AgroParisTech, UMR791) for the analysis of the samples.

REFERENCES

- AFNOR. 1982. V18-109. Aliments des animaux. Détermination de la teneur en eau. Association française de normalisation, La Plaine Saint-Denis, France. 9 pp.
- AFNOR. 1997. V18-121. Aliments des animaux. Détermination enzymatique de la teneur totale en amidon. Association française de normalisation, La Plaine Saint-Denis, France. 9 pp.
- Allison, M. J. 1969. Biosynthesis of amino acids by ruminal microorganisms. *J. Anim. Sci.* 29:797-807.
- Andrade, P. V. D., and P. Schmidely. 2006. Influence of percentage of concentrate in combination with rolled canola seeds on performance, rumen fermentation and milk fatty acid composition in dairy goats. *Livest. Sci.* 104:77-90.
- Bas, P., V. Berthelot, E. Pottier, and J. Normand. 2007. Effect of level of linseed on fatty acid composition of muscles and adipose tissues of lambs with emphasis on trans fatty acids. *Meat Sci.* 77:678-688.
- Beam, T. M., T. C. Jenkins, P. J. Moate, R. A. Kohn, and D. L. Palmquist. 2000. Effects of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. *J. Dairy Sci.* 83:2564-2573.

- Beauchemin, K. A., T. A. McAllister, and S. M. McGinn. 2009. Dietary mitigation of enteric methane from cattle. Page 1-18 in CAB Reviews: Perspectives in Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Res. CABI, Wallingford, UK.
- Boadi, D., C. Benchaar, J. Chiquette, and D. Masse. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: update review. *Can. J. anim. Sci.* 84:319-335.
- Brown, M. E., and M. S. Boston. 1961. Ultra-microsinger determination using 2.9 dimethyl. 1. 10 phenanthroline hydrochloride (neocuproine). *Diabetes* 10:60-62.
- Czerkawski, J. W. 1986. An introduction to rumen studies. Pergamon Press, Oxford. 236 pp.
- Demeyer, D. I., and H. K. Henderickx. 1967. Methane production from glucose *in vitro* by mixed rumen bacteria. *Biochem. J.* 105:271-277.
- Dijkstra, J., W. J. Gerrits, A. Bannink, and J. France. 2000. Modelling lipid metabolism in the rumen. Page 25-36 in *Modelling Nutrient Utilization in Farm Animals*. J. P. McNamara, J. France, and D. E. Beever (Ed.), CAB international, London, UK.
- Doreau, M., and A. Ferlay. 1995. Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: a review. *Livest. Prod. Sci.* 43:97-110.
- Folch, J., M. Lees, and G. A. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. biol. Chem.* 226:497– 509.
- Fuentes, M. C., S. Calsamiglia, P. W. Cardozo, and B. Vlaeminck. 2009. Effect of pH and level of concentrate in the diet on the production of biohydrogenation intermediates in a dual-flow continuous culture. *J. Dairy Sci.* 92:4456-4466.
- Getachew, G., P. H. Robinson, E. J. DePeters, S. J. Taylor, D. D. Gisi, G. E. Higginbotham, and T. J. Riordan. 2005. Methane production from commercial dairy rations estimated using an *in vitro* gas technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124:391-402.
- Giger, S., P. Thivend, D. Sauvant, M. Dorléans, and P. Journaix. 1987. Etude de l'influence préalable de différents traitements amyolytiques sur la teneur en résidu NDF d'aliments du bétail. *Ann. Zootech.* 36:39-48.
- Harfoot, C. G., and G. P. Hazlewood. 1997. Lipid metabolism in the rumen. Pages 382-426 in *The rumen microbial ecosystem*. P. N. Hobson, and C. S. Stewart (Ed.), Blackie Academic & Professional, London.
- Harvatine, K. J., and M. S. Allen. 2006. Fat supplements affect fractional rates of ruminal fatty acid biohydrogenation and passage in dairy cows. *J. Nutr.* 136:677-685.
- ISO. 1978. ISO 5984. Animal Feedingstuffs. Determination of Crude Ash. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland. 6 pp.
- Janssen, P. H. 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Anim. Feed Sci. Technol.* 160:1-22.
- Jenkins, T. C. 1993. Lipid metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 76:3851-3863.
- Jenkins, T. C., R. J. Wallace, P. J. Moate, and E. E. Mosley. 2008. Board-Invited Review: recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J. Anim. Sci.* 86:397-412.

- Johnson, K. A., and D. E. Johnson. 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73:2483-2492.
- Jouany, J. P., B. Lassalas, M. Doreau, and F. Glasser. 2007. Dynamic features of the rumen metabolism of linoleic acid, linolenic acid and linseed oil measured *in vitro*. *Lipids* 42:351-360.
- Kristensen, N. B. 2000. Quantification of whole blood short-chain fatty acids by gas chromatographic determination of plasma 2-chloroethyl derivatives and correction for dilution space in erythrocytes. *Acta Agric. Scand. Sect. A. Anim. Sci.* 50:231-236.
- Latham, M. J., J. E. Storry, and M. E. Sharpe. 1972. Effect of low-roughage diets on the microflora and lipid metabolism in the rumen. *Appl. Microbiol.* 24:871-877.
- Li, X. Z., R. J. Long, C. G. Yan, S. H. Choi, G. L. Jin, and M. K. Song. 2010. Rumen microbial responses in fermentation characteristics and production of CLA and methane to linoleic acid in associated with malate or fumarate. *Anim. Feed Sci. Technol.* 155:132-139.
- Lourenço, M., E. Ramos-Morales, and R. J. Wallace. 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal*:1008-1023.
- Maaroufi, C., P. Chapoutot, D. Sauvant, and S. Giger-Reverdin. 2009. Fractionation of pea flour with pilot scale sieving. II. *In vitro* fermentation of pea seed fractions of different particle sizes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 154:135-150.
- Martin, C., D. P. Morgavi, and M. Doreau. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4:351-365.
- Menke, K. H., L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz, and W. Schneider. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. agric. Sci. Camb.* 93:217-222.
- Menke, K. H., and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Develop.* 28:7-55.
- Moate, P. J., R. C. Boston, T. C. Jenkins, and I. J. Lean. 2008. Kinetics of ruminal lipolysis of triacylglycerol and biohydrogenation of long-chain fatty acids: new insights from old data. *J. Dairy Sci.* 91:731-742.
- Mosoni, P., Y. Rochette, D. Graviou, D. P. Morgavi, E. Forano, A. Ferlay, Y. Chilliard, and C. Martin. 2008. Effect of increasing levels of extruded linseed in the diet of dairy cows on the number of protozoa, cellulolytic bacteria and methanogenic archaea. Page 84 in Proceedings of the 6th INRA-RRI Symposium on the gut microbiome. Clermont-Ferrand, France.
- Moss, A. R., J. P. Jouany, and J. Newbold. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootech.* 49:231-253.
- Mould, F. L., R. Morgan, K. E. Kliem, and E. Krystallidou. 2005. A review and simplification of the *in vitro* incubation medium. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124:155-172.

- Nagaraja, T. G., C. J. Newbold, C. J. Van Nevel, and D. I. Demeyer. 1997. Manipulation of ruminal fermentation. Pages 523-632 in *The rumen microbial ecosystem*. P. N. Hobson, and C. S. Stewart (Ed.), Chapman & Hall, London.
- Popova, M., D. P. Morgavi, M. Doreau, and C. Martin. 2011. Production de méthane et interactions microbiennes dans le rumen. *INRA Prod. Anim.* 24:447-460.
- Ribeiro, C. V., M. L. Eastridge, J. L. Firkins, N. R. St-Pierre, and D. L. Palmquist. 2007. Kinetics of fatty acid biohydrogenation *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 90:1405-1416.
- Robertson, J. B., and P. J. Van Soest. 1981. The detergent system of analysis and its application to human foods. Page 123-158 in *The analysis of dietary fiber in food*. W. P. T. James, and O. Theander (Ed.), Marcel Dekker, Inc., Basel, Switzerland.
- SAS Institute. 2000. User's Guide. Release 11.04. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Sauvant, D., S. Giger-Reverdin, A. Serment, and L. Broudiscou. 2011. Influences des régimes et de leur fermentation dans le rumen sur la production de méthane par les ruminants. *INRA Prod. Anim.* 24:433-446.
- Serment, A., and D. Sauvant. 2010. A mechanistic model of pH and gas exchanges in the rumen and its *in vitro* application. Page 148-157 in 7th International Workshop on Modelling Nutrient Digestion and Utilisation in Farm Animals, Paris, France, 10-12 September, 2009. D. Sauvant, J. Van Milgen, P. Faverdin, and N. Friggens (Ed.), Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.
- Serment, A., P. Schmidely, S. Giger-Reverdin, P. Chapoutot, and D. Sauvant. 2011. Effects of the percentage of concentrate on rumen fermentation, nutrient digestibility, plasma metabolites and milk composition in mid-lactation goats. *J. Dairy Sci.* 94:3960-3972.
- Serment, A., S. Giger-Reverdin, P. Schmidely, O. Dhumez, L. P. Broudiscou, and D. Sauvant. 2012. *In vitro* fermentation and methane production during incubation of total mixed rations differing by the percentages of concentrate in rumen fluids from goats fed these diets. *J. Sci. Food Agric.* In preparation.
- Sweeney, R. A., and P. R. Rexroad. 1987. Comparison of leco FP-228 'nitrogen determinator' with AOAC copper catalyst kjeldahl method for crude protein. *J. AOAC Int.* 70:1028-1030.
- Van Kessel, J. S., and J. B. Russell. 1996. The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 20:205-210.
- Van Nevel, C. J., and D. I. Demeyer. 1996. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents *in vitro*. *Reprod. Nutr. Develop.* 36:53-63.
- Van Soest, P. J., and R. H. Wine. 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *J. AOAC Int.* 50:50-55.
- Wang, J. H., M. K. Song, Y. S. Son, and M. B. Chang. 2002. Effect of concentrate level on the formation of conjugated linoleic acid and trans-octadecenoic acid by ruminal bacteria when incubated with oilseeds *in vitro*. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 15:687-694.
- Wheatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 38:971-977.

Zhang, C. M., Y. Q. Guo, Z. P. Yuan, Y. M. Wu, J. K. Wang, J. X. Liu, and W. Y. Zhu. 2008. Effect of octadeca carbon fatty acids on microbial fermentation, methanogenesis and microbial flora *in vitro*. Anim. Feed Sci. Technol. 146:259-269.

III. Complément : Partition du carbone et de l'hydrogène dans le rumen *in vitro* – approche stœchiométrique

Une partie de ce complément fait l'objet d'une communication au "8th INRA-Rowett Symposium on Gut Microbiology, Gut microbiota: friend or foe?", 17-20 Juin 2012 à Clermont-Ferrand, France

Serment, A., Giger-Reverdin, S., Sauvant S., 2012. Modelling C and H rumen stoichiometry from in vitro measurements. p 134 (abstract en Annexe 3 : Communication 5)

INTRODUCTION

L'étude des stœchiométries des réactions se déroulant dans le rumen est importante pour mieux comprendre la partition du carbone et de l'hydrogène (H₂) moléculaire dans le rumen. En effet, les constituants de la ration peuvent se répartir entre des produits « utiles » pour l'animal (AGV, biomasse bactérienne), et des produits « inutiles », voire polluants pour l'environnement (CH₄).

Les premières bases de ce genre d'études ont été posées par Wolin (1960), où les productions de CO₂ et de CH₄ étaient calculées à partir de la proportion molaire des différents AGV. Des études *in vitro* se sont intéressées à ces relations ou à leurs dérivées (Beuvink et Spoelstra, 1992 ; Blümmel et Ørskov, 1993 ; Opatpatanakit et al., 1994 ; Blümmel et al., 1999 ; Blümmel et al., 2003 ; Getachew et al., 2005) en testant différents types de substrats (fourrages, concentrés, rations).

Nous avons appliqué ces relations aux données des essais *in vitro* de ce chapitre.

MATERIELS ET METHODES

Le Tableau 1 résume les coefficients stœchiométriques qui ont été appliqués pour l'estimation de la production de gaz et d'ATP à partir de la production d'AGV des essais *in vitro*.

Tableau 1. Coefficients appliqués pour l'estimation de la production de gaz et d'ATP à partir de la production d'AGV (en mmol / mmol d'AGV produit).

	Production de gaz direct	Production de gaz indirect	Production de H ₂ moléculaire	Production de CH ₄ potentiel	Production de CO ₂	Production d'ATP
Acétate	1	1	2	0.5	1.5	2
Propionate	0	1	-1	-0.25	1.25	3
Butyrate	2	1	2	0.5	2.5	3
AGV mineurs	1	1	0	0	2	0
CH ₄	-	-	-	-	-	1

La production de gaz totaux théorique (en mmol de carbone par mmol d'AGV produit) correspond à la somme :

- de la production de gaz direct. Il s'agit du gaz produit lors des fermentations. Nous avons généralisé la relation proposée par Blümmel et al. (1999) qui avait l'inconvénient de prendre en compte uniquement l'isobutyrate en AGV mineurs.
- et de la production de gaz indirect. Il s'agit de la production de gaz liée à la réaction acido-basique entre la production d'AGV et les tampons présents dans le système. Nous avons pris en compte ici uniquement la réaction entre les bicarbonates du système et les AGV.



avec HA/ A⁻ : les formes acide et basique des AGV

Ainsi, nous avons calculé la production de gaz indirect en faisant l'hypothèse qu'une mole d'AGV neutralisée conduisait à la libération d'une mole de CO₂ (Mould et al., 2005), c'est-à-dire que le pH était à pH constant et égal à 7 :

$$\text{Production de gaz indirect} = 1 * \text{AGV totaux}$$

L'H₂ moléculaire est souvent associé à des molécules de transport comme le couple NADH₂ ⇌ NAD + H₂. Sa production correspond à la relation décrite dans le Tableau 1. La production de CH₄ potentielle correspond à 0.25 la production de H₂ moléculaire (Demeyer, 1991). Pour cette équation, nous avons choisi de ne prendre en compte que les AGV majeurs.

Enfin, la production d'ATP (mmol / mmol AGV) a été calculée à partir de la production d'AGV et de CH₄ (Isaacson et al., 1975). La croissance microbienne a été estimée en utilisant un Y_{ATP} moyen de 15 g of de croissance microbienne / mmol d'ATP.

Les calculs ont été appliqués à la période 0 – 3 h à l'ensemble des données (blanc, inoculum + substrat). Les données de l'**Article 4** ont été comparées à celles de l'**Article 5**.

RESULTATS ET DISCUSSION

Production de gaz totaux

La production des AGV a permis de calculer assez précisément la production de gaz totaux entre 0 et 3 h (Figure 1), le coefficient de la régression n'étant pas différent de 1. Cette figure semble ainsi valider les coefficients choisis pour la détermination de la production de gaz totaux (Tableau 1). Les données de l'**Article 5** se superposent à celles de l'**Article 4**. Il n'y a pas eu d'effet de la supplémentation en huile sur la production d'AGV et la production de gaz totaux. Blümmel et al. (1999) avaient montré une forte corrélation (R² = 95 %) entre la production de gaz totaux prédite par la production d'AGV et celle mesurée (pente de la régression égale à 1,01, non différente de 1) avec 55 matières premières différentes à 24 h d'incubation.

seringues contenant du substrat (exclusion des blancs), l'augmentation du pourcentage de concentrés a diminué la proportion de gaz indirect ($53,2$ vs. $51,9 \pm 0,44$ % des gaz totaux, inocula L et H, respectivement, $P < 0,001$). Ce résultat, différent de ce que décrit Getachew et al. (1998), est certainement lié à la production importante de butyrate qui permet à la fois la production de gaz directs et indirect (Tableau 1).

Nous avons choisi une hypothèse simple : une mole d'AGV neutralisée conduit à la libération d'une mole de CO_2 avec un pH théorique de 7,0. La solution tampon utilisée dans nos essais *in vitro* contenait initialement 2,3 mmol de bicarbonate et 0,2 mmol de phosphates. Une partie des AGV a pu réagir avec les phosphates, car ce type de tampon est très actif quand le pH est proche de 7,0. Contrairement à ce qui se passe avec les bicarbonates, la réaction avec les phosphates ne produit pas de gaz. Avec la même solution tampon que celle utilisée dans les études *in vitro* de cette thèse, Beuvink et Spoelstra (1992) ont estimé que 13 % des AGV avaient réagi avec les phosphates. Ainsi, il y a peut-être une surestimation de la production de gaz indirect avec l'hypothèse que nous avons choisie. D'autre part, les tampons n'ont pas été saturés par la production d'AGV.

Production de méthane et d'hydrogène

Selon les relations proposées par Wolin (1960), tout excès en H_2 moléculaire est transformé en CH_4 . La Figure 2 montre qu'il y a une relation curvilinéaire entre la production d' H_2 moléculaire prédite à partir de la production d'AGV, et la production de CH_4 mesurée. Quand l' H_2 moléculaire estimé est très disponible dans le milieu, la production de CH_4 mesurée semble saturée. Cela peut s'expliquer par l'existence d'autres puits d' H_2 moléculaire que le CH_4 (biohydrogénation des AG, fuite sous forme de gaz...). Cela indique que les coefficients choisis, traditionnellement utilisés dans la littérature, ne sont pas complètement appropriés pour prédire la production de CH_4 . Un tel plafonnement de la production de CH_4 a été montré *in vitro* par Navarro-Villa et al. (2011) et *in vivo* par Sauvant et al. (2011). La supplémentation en huile n'a pas eu d'effet sur la production de CH_4 . On peut remarquer sur la Figure 2, des plateaux successifs par chaque combinaison expérimentale.

La Figure 3 montre que la production d' H_2 gazeux, quoique très faible (moins de $1 / 1\,000^{\text{ème}}$ d' H_2 moléculaire théoriquement produit) augmente linéairement avec la production d' H_2 moléculaire prédite par la production d'AGV. Notons que la supplémentation en huile a réduit la production de H_2 gazeux ($P < 0,001$).

dans le milieu, la production de CH₄ serait saturée, suggérant une utilisation de cet H₂ moléculaire en excès par d'autres puits.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Beuvink, J. M. W., Spoelstra, S. F., 1992. Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms *in vitro*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 505–509.
- Blümmel, M., Ørskov, E. R., 1993. Comparison on *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 40, 109-119.
- Blümmel, M., Aiple, K. P., Steingass, H., Becker, K., 1999. A note on the stoichiometrical relationship of short chain fatty acid production and gas formation *in vitro* in feedstuffs of widely differing quality. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 81, 157-167.
- Blümmel, M., Karsli, A., Russell, J. R., 2003. Influence of diet on growth yields of rumen micro-organisms *in vitro* and *in vivo*: influence on growth yield of variable carbon fluxes to fermentation products. *Br. J. Nutr.*, 90, 625-634.
- Cone, J. W., 1998, Influence of protein fermentation on gas production profiles. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.*, 7, 36.
- Demeyer, D. I., 1991. Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and hindgut. In: Jouany, J.-P. (ed.), *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*, p 217-237. INRA Editions, Paris, France.
- Getachew, G., Blümmel, M., Makkar, H. P. S., Becker, K., 1998. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 72, 261-281.
- Getachew, G., Robinson, P. H., DePeters, E. J., Taylor, S. J., Gisi, D. D., Higginbotham, G. E., Riordan, T. J., 2005. Methane production from commercial dairy rations estimated using an *in vitro* gas technique. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 123-124, 391-402.
- Isaacson, H. R., Hinds, F. C., Bryant, M. P., Owens, F. N., 1975. Efficiency of energy utilization by mixed rumen bacteria in continuous culture. *J. Dairy Sci.*, 58, 1645-1659.
- Navarro-Villa A., O'Brien, Lopez S., Boland T. M., O'Kiely P. O., 2011. Modifications of a gas production technique for assessing *in vitro* rumen methane production from feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 166-167, 163-174.
- Opatpatanakit, Y., Kellaway, R. C., Lean, I. J., Annison, G., Kirby, A., 1994. Microbial fermentation of cereal grains *in vitro*. *Aust. J. agric. Res.*, 45, 1247 - 1263.
- Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., Serment, A., Broudiscou, L. P., 2011. Influences des régimes et de leur fermentation dans le rumen sur la production de méthane par les ruminants. *INRA Prod. Anim.*, 24, 433-446.
- Wolin, M., 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *J. Dairy Sci.*, 40, 1452-1459.

CHAPITRE 4 : Modélisation mécaniste

ARTICLE 6 : Modèle mécaniste physico-chimique de fermenteur *in vitro* gaz-test : pH et production de gaz

RESUME DE L'ARTICLE 6

Introduction :

Les modèles mécanistes actuels qui simulent le fonctionnement du rumen présentent encore des faiblesses notamment sur la détermination du pH et la prédiction de la production des gaz. En effet, ces variables sont souvent prédites par des équations empiriques et très peu d'études ont cherché à les modéliser d'une façon plus mécaniste (Pitt et al., 1996 ; Imamidoost et Cant, 2005 ; Offner et Sauvant, 2006).

Nous avons développé un sous-modèle mécaniste de fonctionnement de rumen décrivant de la façon la plus mécaniste possible les relations entre pH, bicarbonate, AGV et gaz. Nous avons choisi un système fermé de rumen, un système *in vitro* batch (Menke et al., 1979). Ce modèle est capable à la fois de simuler les phénomènes de digestion observés *in vitro* et de décrire de manière spécifique les lois physico-chimiques expliquant les dynamiques d'évolution du pH et de formation des gaz.

Construction du modèle :

Le système considéré est une seringue dans laquelle un aliment est incubé avec un mélange de jus de rumen et d'une solution tampon. Le modèle comprend 14 compartiments représentant les principaux constituants chimiques de l'aliment testé (protéines, glucides pariétaux, glucides non pariétaux, ...), les microorganismes (compartiment unique), les produits des dégradations et des fermentations (glucides solubles, AGV, NH₃-N, ...) et les bicarbonates de la solution tampon. Il décrit les phénomènes de dégradation et de fermentation de l'aliment par les microorganismes : dégradation des protéines en peptides et en NH₃, des glucides pariétaux et non-pariétaux en glucides solubles et en AGV, CO₂ et CH₄. La force motrice du modèle est la population microbienne dont l'énergie (sous la forme d'ATP) nécessaire à son entretien et à sa croissance provient de la fermentation des glucides en AGV et dont la lyse fournit du substrat azoté (peptides et NH₃-N) et des chaînes carbonées au milieu fermentaire.

Une partie spécifique du modèle décrit les réactions physico-chimiques existant entre les AGV, représentés par un couple acido-basique unique (pKa = 4,8), les bicarbonates de la solution tampon, le CO₂ et le CH₄. Les gaz ont deux origines possibles : une production directe par la fermentation des glucides solubles en AGV (8,5 μmol d'AGV pour 1 mg de glucides solubles dégradés, rapport de 1 entre les AGV et les gaz) et une production indirecte de CO₂ par la réaction acido-basique entre les AGV et les bicarbonates. Le pH peut être déduit par les pKa et le rapport des concentrations du couple forme acide / forme basique des AGV ou du couple bicarbonates / CO₂. Le CO₂ et le CH₄ sont produits en phase aqueuse, ce qui peut introduire un délai entre le moment de leur formation et leur apparition dans la phase gazeuse. Les phénomènes de diffusion (loi de Henry) entre ces deux phases ont été décrits :

quand la phase aqueuse est saturée en gaz, un flux net de gaz de la phase aqueuse vers la phase gazeuse apparaît jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint entre les deux phases.

Le modèle a été développé et ajusté avec le logiciel ModelMaker 3. L'intégration a été réalisée avec la méthode d'Euler, avec un pas de temps d'intégration de 1 minute. La durée de simulation était de 48 heures. La détermination d'une partie des paramètres du modèle a été réalisée sur la base de connaissances générales sur la digestion microbienne issues de la littérature. Les valeurs les plus spécifiques ont été ajustées à partir de données expérimentales de cinétiques (7 durées d'incubation) de fermentation *in vitro* de différentes fractions de pois (Maaroufi et al., 2009).

Le modèle simule les dynamiques de production de gaz, de pH, de concentrations en NH₃-N et en glucides solubles pendant 48 heures.

Résultats :

Les dynamiques de concentrations en NH₃-N et de production de gaz sont correctement simulées, avec des coefficients de régression respectivement de $1,06 \pm 0,020$ et $0,93 \pm 0,016$ entre les valeurs observées et prédites ($R^2 = 0,97$, ETR = 11,12 mg.L⁻¹, n = 7 et $R^2 = 0,99$, ETR = 1,2 ml, n = 7, respectivement).

L'ordre de grandeur du pH prédit par le modèle est respecté, mais la chute du pH simulée est plus forte que celle observée. Le coefficient de régression entre les valeurs observées et prédites est égal à $0,46 \pm 0,049$ ($R^2 = 0,94$; ETR = 0,023, n = 7). Une sous-estimation du pouvoir tampon du système pourrait être à l'origine de cette différence.

Discussion et Conclusion :

Malgré sa grande simplicité, le modèle proposé aboutit à des résultats satisfaisants. Des améliorations devront être apportées pour les dynamiques d'évolution du pH. Le modèle nécessite encore une validation externe sur des données de cinétiques d'AGV, NH₃-N, N microbien, pH et de production de gaz issues de la littérature. Les résultats des essais *in vitro* de cette thèse pourraient faire partie de ce nouveau jeu de données.

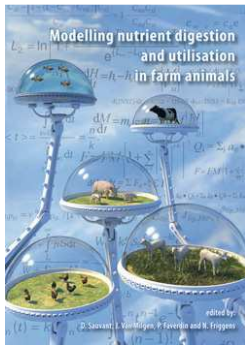
La partie physico-chimique de ce modèle devrait pouvoir être intégrée en tant que sous-modèle dans un modèle mécaniste de rumen *in vivo* détaillé.

A mechanistic model of pH and gas exchanges in the rumen and its *in vitro* application

A. Serment^{1,2} and D. Sauvant^{1,2}

¹INRA, UMR791 Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, 16 rue Claude Bernard, 75005 Paris, France, amelie.serment@agroparistech.fr

²AgroParisTech, UMR791 Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, 16 rue Claude Bernard, 75005 Paris, France



In: Sauvant, D., Van Milgen, J., Faverdin, P., Friggens, N. (Eds.), 7th International Workshop on Modelling Nutrient Digestion and Utilisation in Farm Animals, Paris, France, 10-12 September, 2009, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Netherlands, pp. 148-157.

ABSTRACT

Although rumen functioning is governed by both kinetic and thermodynamic laws, few mechanistic models have developed both aspects. However, variables such as pH and gas production are largely controlled by thermodynamics. This study proposes a mechanistic model, which focuses specifically on the mechanistic description of relations between pH, bicarbonate and gas production based on thermodynamic laws. The first version was developed in the context of an *in vitro* device. The model comprised 14 compartments. It simply described the processes of microbial degradation of proteins to peptides and ammonia (NH₃) and of fibre and non-fibre carbohydrates to soluble carbohydrates and then to volatile fatty acids (VFA), carbon dioxide (CO₂) and methane (CH₄). A specific sub-part of this model, composed of seven compartments, focuses on describing the dynamics of pH and gas production. The pH was determined from the chemical equilibrium between VFA represented by a weak acid and its associated base, and the bicarbonate and CO₂ couple. Gas produced in the system originated from CO₂ and CH₄ directly produced by the fermentation of soluble carbohydrates and from CO₂ produced by the acid-base reaction. As CO₂ and CH₄ were produced in the aqueous phase, there was *a priori* a delay between their production rate and their appearance in the gaseous phase. This process was described by Henry's law. The model was calibrated using experimental data of *in vitro* fermentation of pea seed fragments. The predicted pattern of concentrations of NH₃ and total gas production were realistic with regression coefficients of 1.06 ± 0.020 and 0.93 ± 0.016 between observed and predicted values, respectively ($R^2=0.97$, RMSE=11.12mg/l, n=7 and $R^2=0.99$, RMSE=1.2ml, n=7). The model provides the physicochemical basis which can be used in other fermentation models.

Keywords: modelling, gas test system, fermentation, buffer

INTRODUCTION

Reactions in the rumen are mainly controlled by kinetic and thermodynamic laws. Most of the existing mechanistic models of the rumen are based on a kinetic control (Kohn and Boston, 2000), while the role of thermodynamics has rarely been taken into account (Imamidoost and Cant, 2006; Kohn and Boston, 2000; Offner and Sauvant, 2006). However, variables such as the pH of ruminal fluid and gas production clearly depend on thermodynamics. In fact, the pH is the result of the equilibrium between the production of volatile fatty acids (VFA) and buffers through provided by the saliva. Gas production is partly a consequence of this equilibrium, depending also on the equilibrium between aqueous and gas phases in the rumen. Most of the published mechanistic models use an empirical approach to calculate rumen pH, which is a rather unsatisfactory compromise. Attempts to develop a mechanistic representation of pH based on thermodynamic laws have not been entirely successful to date (Offner and Sauvant, 2006) or the link with gas production has not been developed (Imamidoost and Cant, 2005).

This study proposes a simple mechanistic model, using a minimum of kinetic and thermodynamic laws. It focuses specifically on the mechanistic description of the relations between pH, different forms of bicarbonate, and gas. The model represented a system of an *in vitro* device where a feedstuff was incubated with an inoculum of rumen fluid and a buffer solution. Because of its high level of standardization and its use by several research teams, this study was based on the syringe gas test method (Menke *et al.*, 1979).

MODEL DESCRIPTION

System

The syringe was considered as a closed batch system within only an initial substrate supply and without outflow. The model describes the processes of degradation and fermentation of the feedstuff by the microbes of the inoculum. It comprises 14 compartments representing the main components of the feedstuff, a single population of microbes, fermentation products and bicarbonate in the buffer solution. The diagram of the model is summarized in Figure 1. Each compartment is defined by a dynamic differential equation. The flow from compartment 1 (C1) to compartment 2 (C2) is denoted by $F_{C1 \rightarrow C2}$. The diagram and the basic parameters of the model were defined from general knowledge about rumen digestion and from the literature.

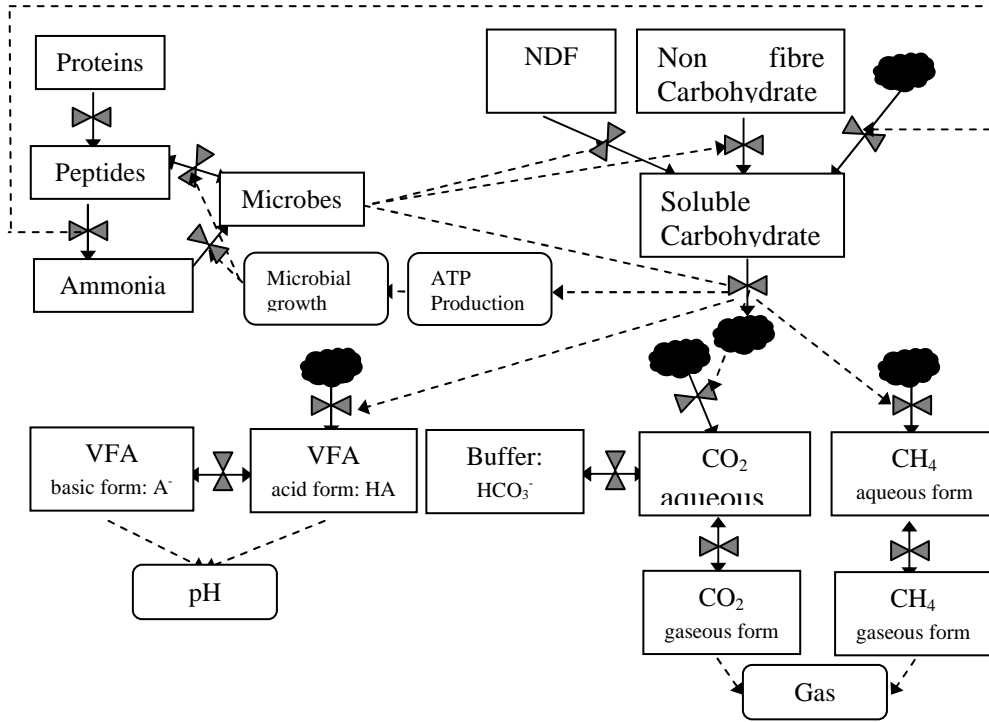


Figure 1. Simplified Forrester diagram of the physico-chemical model of in vitro gas test model.

Carbohydrate and nitrogen parts

The feedstuff part of the model was kept as simple as possible and the carbohydrate compartments (CHO , in mg) represented cell wall material (NDF) and non-fibre carbohydrates (NFC). They were degraded into soluble carbohydrates (SC), which were then fermented to produce VFA ($PVFA$, mmol/min), carbon dioxide (PCO_2 , mmol/min), methane (PCH_4 , mmol/min) and ATP ($PATP$, $\mu\text{molATP}/\text{min}$). The CHO degradation process was described by mass action laws depending on the mass of microbes ($MICR$) as suggested by Van Milgen *et al.* (1991):

$$dCHO/dt = -k_{CHO} \times CHO \times k_{MICR} \times MICR \quad (1)$$

where CHO is either NDF , NFC or SC , k_{CHO} the fractional rates of digestion or fermentation of CHO and k_{MICR} the coefficient of the influence of microbes.

Fermentation production rates were defined by Equations 2:

$$\begin{aligned} PATP &= k_{ATP} \times F_{SC} \\ PVFA &= k_{VFA} \times F_{SC} \\ PCO_2 &= (2/3) \times k_{VFA} \times F_{SC} \\ PCH_4 &= (1/3) \times k_{VFA} \times F_{SC} \end{aligned} \quad (2)$$

where F_{sc} is the degradation flow of SC , k_{ATP} the rate of ATP production equal to $25 \mu\text{mol ATP}/\text{mg}$ of degraded SC , and k_{VFA} the rate of VFA production equal to $8.5 \mu\text{mol total VFA}/\text{mg}$ of degraded SC .

Four compartments represented the nitrogen fractions (in mg N): proteins (*PRO*), peptides (*PEP*), ammonia (NH_3) and microbes (*MICR*). Flows of degradation of *PRO* to *PEP* and *PEP* to NH_3 followed mass action law. Degradation of *PEP* to NH_3 also yielded carbon chains entering the *SC* compartment.

The equilibrium between microbial growth and catabolism controlled the N flows between *MICR* and *PEP* and NH_3 . The *PATP* provided energy for microbial maintenance (m ; $\mu\text{molATP}/\text{min}$) and the remaining energy was used for microbial growth *GMICR* (mg of microbial N/min) (Lescoat et Sauvart, 1995):

$$m = k_m \times \text{MICR} \quad (3)$$

$$\text{GMICR} = Y_{\text{ATP}} \times (\text{PATP} - m) \quad (4)$$

where k_m is the coefficient of energy requirement for maintenance ($\mu\text{mol ATP}/\text{mg}$ of microbial N/min) and Y_{ATP} the microbial growth efficiency (mg of microbial N/ μmolATP).

The *GMICR* controlled $F_{\text{PEP} \rightarrow \text{MICR}}$ and $F_{\text{NH}_3 \rightarrow \text{MICR}}$ according Equations 5:

$$F_{\text{PEP} \rightarrow \text{MICR}} = (1 - P_{\text{NH}}) \times \text{GMICR}$$

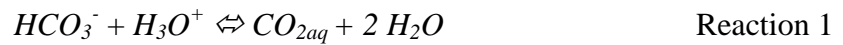
$$F_{\text{NH}_3 \rightarrow \text{MICR}} = P_{\text{NH}} \times \text{GMICR} \quad (5)$$

$$P_{\text{NH}} = \frac{NH_3}{\text{PEP} + NH_3}$$

The lysis of microbes into *PEP* was accounted for by using a fractional rate of microbial lysis k_{lys} , which varied inversely with the fractional microbial growth rate (France *et al.*, 1982).

Determination of pH

In this model, two acid-base couples were involved in describing the change in pH: the bicarbonate of the buffer solution and the aqueous form of carbon dioxide (CO_{2aq}/HCO_3^-) and the acid form of total VFA and its associated base (HA/A^-). Only the bicarbonate system was taken into account because it was often considered as the prevalent ruminal buffer (Counotte *et al.*, 1979). To not omit a non-negligible part of the buffer capacity, we hypothesized that phosphate system could be assimilated to bicarbonate system in considering an identical pKa. The weak acid (HA and CO_{2aq}) and its basis (A^- and HCO_3^-) of each couple are in equilibrium according the following two reactions:



The equilibrium constants of these reactions are equal to the inverse of the dissociation constant $Ka_{\text{bicarbonate}}$ for the couple CO_{2aq}/HCO_3^- and to Ka_{VFA} for the couple (HA/A^-):

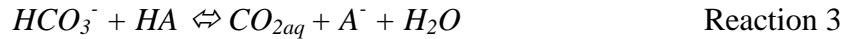
$$\frac{1}{Ka_{\text{bicarbonate}}} = \frac{[CO_{2aq}]}{[HCO_3^-] * [H_3O^+]} \quad (6)$$

$$Ka_{\text{VFA}} = \frac{[A^-] * [H_3O^+]}{[HA]} \quad (7)$$

where $pKa = -\log Ka$.

The $pK_{a_{bicarbonate}}$ was equal to 6.25 (Counotte *et al.*, 1979) and $pK_{a_{VFA}}$ was estimated at 4.8, the mean pKa values for acetate, propionate and butyrate equal respectively to 4.76, 4.87 and 4.82 (Kohn and Dunlap, 1998).

The ion H_3O^+ is the intermediate element between Reaction 1 and Reaction 2. When this ion was considered as a compartment, the model became instable because of the very small size of this compartment and the fractional production and usage rates. In fact, within the pH range in the rumen (between 5.5 and 7.5), the concentration of H_3O^+ is comprised between $10^{-7.5}$ and $10^{-5.5}$ mol/L. For simplification, this compartment was not maintained and its effect was represented by combining Reaction 1 and Reaction 2:



Basically, the dissociation of x mol of HA was buffered by x mol of HCO_3^- to give x mol of CO_{2aq} , x mol of A and x mol of H_2O (Kohn and Dunlap, 1998). The equilibrium state of this reaction was calculated by the ratio of $K_{a_{VFA}}/K_{a_{bicarbonate}}$ and was equal to $10^{1.45}$. The hypothesis in the model was that at each incubation time step, bicarbonate and VFA systems were at equilibrium state, thus:

$$\begin{aligned} \frac{K_{a_{VFA}}}{K_{a_{bicarbonate}}} &= \frac{[CO_{2aq}]_{t+dt} * [A^-]_{t+dt}}{[HCO_3^-]_{t+dt} * [HA]_{t+dt}} \\ &= \frac{([CO_{2aq}]_t + \frac{x}{Vol} + \frac{PCO_2}{Vol} - \frac{F_{CO_{2aq} \rightarrow CO_{2gas}}}{Vol} + \frac{F_{CO_{2gas} \rightarrow CO_{2aq}}}{Vol}) * ([A^-]_t + \frac{x}{Vol})}{([HCO_3^-]_t - \frac{x}{Vol}) * ([HA]_t - \frac{x}{Vol})} \end{aligned} \quad (8)$$

where [species] is the concentration of the chemical species, Vol the volume of fermentation juice in a syringe (30ml), and $F_{CO_{2aq} \rightarrow CO_{2gas}}$ and $F_{CO_{2gas} \rightarrow CO_{2aq}}$ the flows of CO_2 between the aqueous and gaseous phases, which are described later.

Equation 8 is a quadratic equation with x as unknown. This equation was evaluated and solved at each incubation time. Differential equations of the chemical species, which were involved in the acid-base equilibrium, are described in Table 1. Using the Henderson-Hasselbach equation made it possible to calculate pH:

$$pH = pK_{a_{VFA}} + \log ([A^-] / [HA]) \quad (9)$$

Gas

Gas produced in the syringe originated from CO_2 and CH_4 directly produced by the fermentation of SC (PCO_2 and PCH_4) and from CO_2 produced by the acid-base reaction between VFA and bicarbonate systems (Reaction 3; Blümmel *et al.*, 1997). As CO_2 and CH_4 are produced in the aqueous phase, there is *a priori* a delay between their production rate and the actual appearance in the gaseous phase. Therefore, it was necessary to describe gas diffusion between these phases. Four compartments (in mmol) were used to represent gases: CO_{2aq} and CH_{4aq} in the aqueous phase, and CO_{2gas} and CH_{4gas} in the gaseous phase. Cumulative gas (in ml) was calculated from the sum of CO_{2gas} and CH_{4gas} . The solubility of a gas in a liquid is proportional to the partial pressure of this gas in the gaseous phase. This phenomenon is called ‘‘Henry's law’’:

$$[gas_{aq}] = k_H \times P(gas) \quad (10)$$

where $[gas_{aq}]$ is the concentration of a chemical species in the aqueous phase (in mmol/l) and $P(gas)$ the partial pressure of the same species in the gaseous phase (in Pa). The constant, k_H (in mmol/l.Pa⁻¹) is called the Henry constant. It depends on the solvent, the species and the temperature.

According to Henry's law, molecules of CO_{2aq} or CH_{4aq} are in a permanent state of agitation. Some of them, which are near the exchange surface, can have an energy status sufficient to leave the aqueous phase and enter the gaseous phase. This event takes place at a constant rate. The "escape" flow is proportional to the concentration of CO_{2aq} and CH_{4aq} (Equation 11). In the same way, molecules of gas in the gaseous phase fall on the exchange surface. Part of this CO_{2gas} and CH_{4gas} bounces while a constant quantity enters the liquid phase. This "entrance" flow is proportional to the partial pressure of the gas in the gaseous phase (Equation 12):

$$F_{aq \rightarrow gas} = k_{aq \rightarrow gas} \times [gas_{aq}] \quad (11)$$

$$F_{gas \rightarrow aq} = k_{gas \rightarrow aq} \times P(gas) \quad (12)$$

where $F_{aq \rightarrow gas}$ and $F_{gas \rightarrow aq}$ are expressed in mmol/min, $k_{aq \rightarrow gas}$ and $k_{gas \rightarrow aq}$ in l/min are the coefficients of transfer between phases. At equilibrium, $F_{aq \rightarrow gas}$ and $F_{gas \rightarrow aq}$ are equal and the Henry constant is equal to the ratio of $k_{gas \rightarrow aq}$ and $k_{aq \rightarrow gas}$. Equation 12 then becomes:

$$F_{gas \rightarrow aq} = k_{aq \rightarrow gas} \times k_H \times P(gas) \quad (13)$$

Differential equations of the chemical species involved in the acid-base equilibrium and the aqueous-gaseous phase equilibrium are described in Table 1.

Table 1. Compartments of the model describing the change in pH and gas exchanges.

Symbol ¹	unit	Differential equation ²
HA Acid form of VFA	mmol	$\frac{dHA}{dt} = PVFA - x$
A^- Basic form of VFA	mmol	$\frac{dA^-}{dt} = +x$
HCO_3^- Bicarbonate	mmol	$\frac{dHCO_3^-}{dt} = -x$
CO_{2aq} Aqueous carbon dioxide	mmol	$\frac{dCO_{2aq}}{dt} = +x + PCO_2 + F_{CO_{2gas} \rightarrow CO_{2aq}} - F_{CO_{2aq} \rightarrow CO_{2gas}}$
CO_{2gas} Gaseous carbon dioxide	mmol	$\frac{dCO_{2gas}}{dt} = -F_{CO_{2gas} \rightarrow CO_{2aq}} + F_{CO_{2aq} \rightarrow CO_{2gas}}$
CH_{4aq} Aqueous methane	mmol	$\frac{dCH_{4aq}}{dt} = PCH_4 + F_{CH_{4gas} \rightarrow CH_{4aq}} - F_{CH_{4aq} \rightarrow CH_{4gas}}$
CH_{4gas} Gaseous methane	mmol	$\frac{dCH_{4gas}}{dt} = -F_{CH_{4gas} \rightarrow CH_{4aq}} + F_{CH_{4aq} \rightarrow CH_{4gas}}$

¹VFA: volatile fatty acids

² $F_{C1 \rightarrow C2}$ is the flow from compartment1 (C1) to compartment2 (C2). x is the flow exchanged at each time step in the acid-base reaction between VFA and bicarbonate systems.

NUMERICAL TECHNIQUES

The model was developed and adjusted with ModelMaker 3 software. The Euler integration method was used with an integration time step of 1 minute. The simulation time was 48 hours. Parameter optimisation was carried out with the Simplex method, repeated until the residual sum of squares reached a minimum value.

This model was calibrated with experimental data of fermentation in a syringe (fractional degradation rates and initial concentrations). In the first phase of model development, the tested feedstuffs were a whole pea seed and nine granulometric fractions of this pea seed. Those fractions were obtained by grinding pea seeds in a hammer mill and by fractioning the flour with a continuous dry sieving classifier. The dimensions of the mesh sieves were considered as identifiers of the fractions. The fractions F2.5 and F0.76 were the fractions retained on 2.5 and 0.76 mesh sieves. The pan fraction was the fraction retained on the pan of the sieve (Maaroufi *et al.*, 2009).

RESULTS AND DISCUSSION

Ammonia concentration

The model reflected fairly well the kinetics of ammonia concentration in the syringe (Figure 2). Output values of the model were compared with the mean of the experimental data that had been used for calibrating model (7 incubation times). The regression coefficient between observed and predicted values was 1.06 ± 0.020 , ($R^2=0.97$, RMSE=11.12 mg/l, n=7). Ammonia concentration increased with time. Moreover, between 6 and 12 hours of incubation, a transitory decrease was observed, which occurred when the relative degradation of substrate energy was higher than that of proteins and amino-acids. As a consequence, NH_3 was recaptured by the microbes. It was experimentally shown that this transient drop was more marked for the finest fractions of pea seed (F0.76 and pan fraction vs F2.5) (Maaroufi *et al.*, 2009). The model simulated this drop well even though its amplitude may require further investigation. After about 20 hours of incubation, NH_3 accumulation was due to the microbial lysis rate, which was greater than their growth rate. Cone *et al.* (1997) observed the same type of dynamics for ammonia.

Gas production and pH determination

The prediction of gas production was satisfactory compared with the experimental data, with a regression coefficient of 0.93 ± 0.016 between the values of the means of the observations and the predicted values ($R^2=0.99$, RMSE=1.2 ml, n=7). Simulated gas followed the behaviour of the *in vitro* gas profile (Figure 3) with a lag phase at the beginning of the incubation, an increase of production of gas and lastly saturation. During the lag time, a certain degree of instability was observed between compartments CO_{2gas} and CO_{2aq} , and CH_{4gas} and CH_{4aq} , which was due to rapid exchange of matter between these elements. The structure of the model simulated the delay between the production of gases and their

appearance in the gaseous phase fairly well: 46 min for CO_2 and 15 min for CH_4 . The delay was longer for CO_2 because of the existence of the buffer system and a greater Henry constant, which increased $F_{\text{CO}_2\text{gas} \rightarrow \text{CO}_2\text{aq}}$. A sensitivity analysis indicated that an increased initial quantity of buffer increased the production of gas.

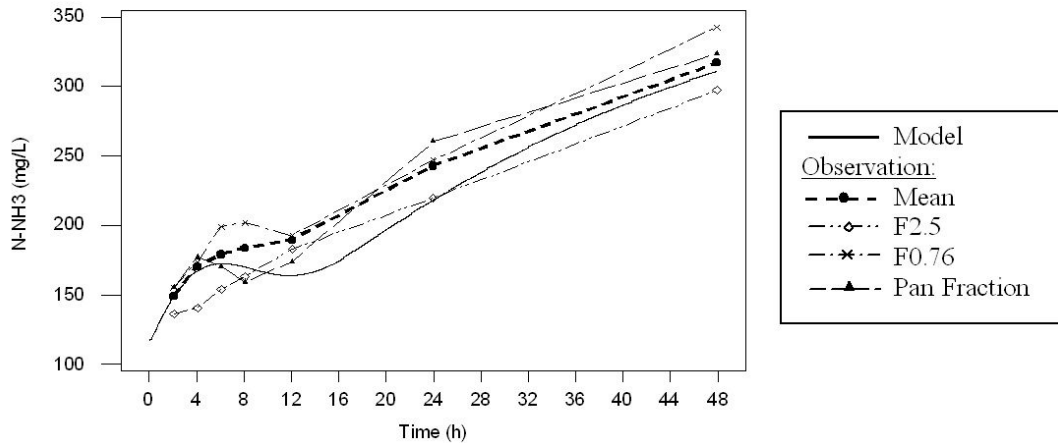


Figure 2. Dynamics of concentration of ammonia in a syringe: values predicted by the model and experimental observations (Maaroufi et al., 2009). The experimental observations corresponded to the fermentations of a whole pea seed and its granulometric fractions. “Mean” was the mean the observations. F2.5 and F0.76 were the fractions retained on 2.5 and 0.76 mesh sieves. The pan fraction was the fraction retained on the pan of the sieve.

The predicted values of pH were fairly realistic compared with the observed values (Figure 4). The pH values ranged from 6.2 to 7.2. At the beginning of the incubation, the production of VFA led to a rapid drop of pH followed by a slow decrease due to the reduction of available soluble carbohydrate. It was a progress compared to the model of Offner and Sauvant (2006) where the simulated pH did not follow a right trajectory. However, the change in pH was not completely satisfactory with a coefficient regression between observed and predicted values of only 0.46 ± 0.049 ($R^2=0.94$; $\text{RMSE}=0.023$, $n=7$). The predicted pH decrease was more important than observed.

At the beginning of the incubation, equilibrium between VFA and the bicarbonate system was disturbed for one hour by the instability previously described between the compartments $\text{CO}_{2\text{gas}}$ and $\text{CO}_{2\text{aq}}$. Further work should be carried out to better understand and model this phenomenon.

A sensitivity analysis of the initial quantity of buffer (Figure 4) showed better prediction results when the quantity of buffer increased (125 mmol/l instead of 87.8 mmol/l). Thus, buffer capacity of the model may have been under-estimated. Rumen juice of the inoculum certainly contained HCO_3^- and other buffer substances, which were not taken into account and not measured experimentally by Maaroufi et al. (2009).

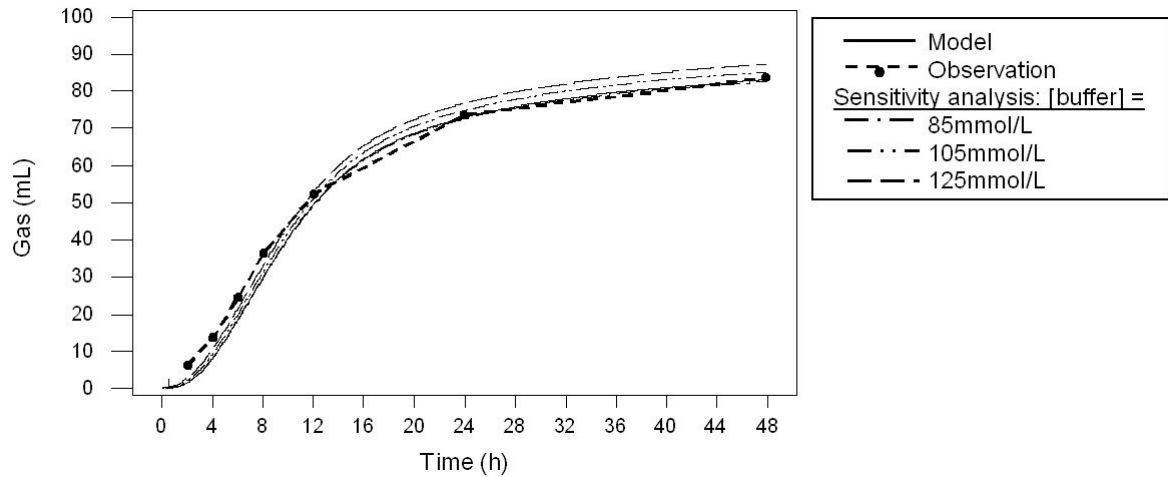


Figure 3. Dynamics of production of gas in a syringe: sensitivity analysis of the initial concentration of buffer. Comparison of values predicted by the model and experimental observations (Maaroufi et al., 2009). “Observation” corresponded to the mean values of fermentations of a whole pea seed and of its granulometric fractions.

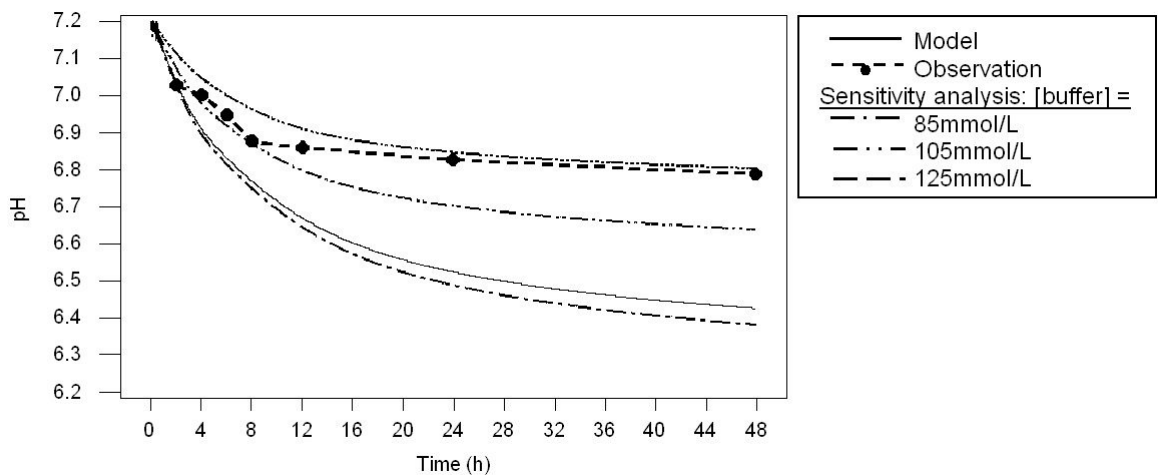


Figure 4. Dynamics of pH in a syringe: sensitivity analysis of the initial concentration of buffer. Comparison of values predicted by the model and experimental observations (Maaroufi et al., 2009). “Observation” corresponded to the mean values of fermentations of a whole pea seed and of its granulometric fractions.

In this model, as a first approach, we chose to add the phosphate ions to the bicarbonate system in considering an identical pKa. The insertion of the phosphate system into the model to calculate pH could be envisaged to increase the buffer capacity of the system because of its superior value of pKa (7.2). Chosen pKa values were those used most in the literature for rumen pH. It however consists of values at 273 K. Kohn and Dunlap (1998) proposed a value of 6.1 for $pK_{a_{bicarbonate}}$ at 310 K. By using Equation 14, new values of pKa can be calculated for the temperature in the syringe (312 K): 4.6 and 6.1 for respectively $pK_{a_{VFA}}$ and $pK_{a_{bicarbonate}}$.

$$\Delta G = -RT \ln Ka. \quad (14)$$

where ΔG is the Gibbs free energy of reaction in $\text{m.kg.s}^{-2}.\text{mol}^{-1}$, T the temperature of the reaction in K and R the gas constant ($8.314 \text{ m}^2.\text{kg.s}^{-2}.\text{K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$). The impact on the model would be limited because new values of pKa would not change the equilibrium constant of Reaction 3. Moreover, in an empirical evaluation of pH determination, Kohn and Dunlap (1998) waited 15 min to obtain stable equilibrium pH. In our model, we considered that equilibrium is reached at each minute. Further *in vitro* experiments are necessary to determine the time to reach equilibrium.

CONCLUSION AND FURTHER DEVELOPMENTS OF THE MODEL

At this stage of development, this model shows promising results. The pH is determined in a mechanistic way and with a total description contrasting with the corresponding part of the model of Immamidost and Cant (2005) and it is linked to the production of gas.

More external evaluations are expected on data of kinetics of VFA, NH_3 and N microbial concentrations, pH and gas from the *in vitro* literature. After that, an *in vivo* version can be foreseen. This approach of a mechanistic physicochemical model could be easily included as a submodel in a larger, mechanistic model of the rumen.

REFERENCES

- Blümmel, M., Makkar, H.P.S. and Becker, K., 1997. *In vitro* gas production: a technique revisited, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 77:24-34.
- Cone, J.W., van Gelder, A.H. and Driehuis, F., 1997. Description of gas production profiles with a three-phasic model, *Animal Feed Science and Technology* 66:31-45.
- Counotte, G.H.M., van't Klooster, A.T., van der Kuilen, J. and Prins, R.A., 1979. An analysis of the buffer system in the rumen of dairy cattle, *Journal of Animal Science* 49:1536-1544.
- France, J., Thornley, J.H.M. and Beever, D.E., 1982. A mathematical model of the rumen, *Journal of Agricultural Science* 99:343-353.
- Imamidoost, R. and Cant, J.P., 2005. Non-steady-state modeling of effects of timing and level of concentrate supplementation on ruminal pH and forage intake in high-producing, grazing ewes, *Journal of Animal Science* 83:1102-1115.
- Kohn, R.A. and Boston, R.C., 2000. The role of thermodynamics in controlling rumen metabolism. In: McNamara, J.P., France, J. and Beever, D.E. (eds.) *Modelling nutrient utilization in farm animals*, Cabi, Wallingford, UK, pp. 11-24.
- Kohn, R.A. and Dunlap, T.F., 1998. Calculation of the buffering capacity of bicarbonate in the rumen and *in vitro*, *Journal of Animal Science* 76:1702-1709.
- Lescoat, P. and Sauvant, D., 1995. Development of a mechanistic model for rumen digestion validated using the duodenal flux of amino acids, *Reproduction, Nutrition, Development* 35:45-70.
- Maaroufi, C., Chapoutot, P., Sauvant, D. and Giger-Reverdin, S., 2009. Fractionation of pea flour with pilot scale sieving. II. *In vitro* fermentation of pea seed fractions of different particle sizes, *Animal Feed Science and Technology* 154:135-150.
- Menke, K.H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D. and Schneider, W., 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*, *Journal of Agricultural Science* 93:217-222.
- Offner, A. and Sauvant, D., 2006. Thermodynamic modeling of ruminal fermentations, *Animal Research* 55:343-365.
- Van Milgen, J., Murphy, M.R. and Berger, L.L., 1991. A compartmental model to analyze ruminal digestion, *Journal of Dairy Science* 74:2515–2529.

CHAPITRE 5 : Discussion générale

L'objectif principal de la thèse était d'étudier comment un changement de régime (pourcentage de concentrés incorporés dans la ration, principalement) peut avoir un impact sur le fonctionnement ruminal et sur la biotransformation de certains substrats ou certaines molécules en termes de dynamique et / ou d'intensité : constituants de la ration (glucides, lipides, protéines), molécules individualisées « marqueurs » (acides gras, terpènes). Ce questionnement a été abordé au travers de trois approches en synergie : essai *in vivo* (**Articles 1, 2 et 3**), essais *in vitro* (**Articles 4 et 5**) et *in silico* par un modèle mécaniste de rumen (**Article 6**).

I. Prise en compte de différentes échelles d'organisation spatio-temporelle

Les 3 approches utilisées se sont focalisées principalement sur le système - objet d'étude : le rumen (**Figure 56**).

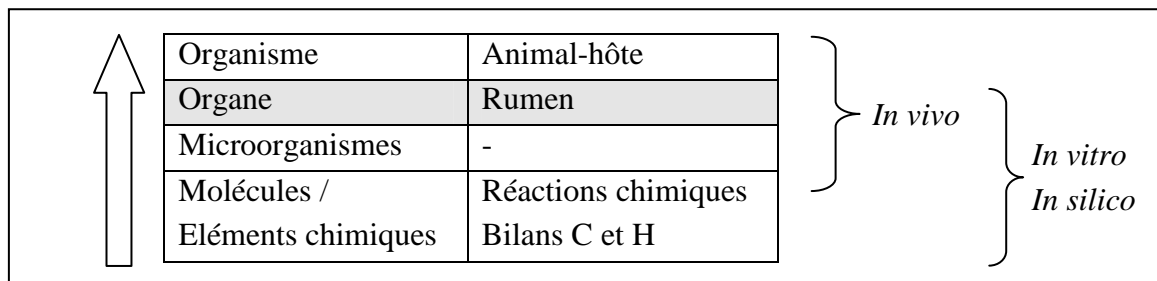


Figure 56 : Niveaux d'organisation étudiés dans la thèse.

Le concept de biotransformation ruminale a structuré notre démarche expérimentale (*in vivo*, *in vitro*). Nous avons cherché à la caractériser à travers l'étude des différentes réactions de biotransformations ruminales, étudiées individuellement et les unes par rapport aux autres (**Figure 57**) : dégradations, synthèses et conversions. Parmi les déterminants des réactions, nous nous sommes principalement concentrés sur des aspects biochimiques mesurables (thermodynamique, cinétique enzymatique). Les aspects microbiens ont été abordés indirectement à travers l'étude des indicateurs habituels du métabolisme microbien (AGV par exemple). Le rumen a été étudié expérimentalement, en privilégiant autant que possible un angle dynamique, après la distribution d'un repas pour l'essai *in vivo* et après le début de l'incubation pour les essais *in vitro*, avec des intervalles de temps de une à 3 heures.

Outre les mesures réalisées au niveau du rumen ou « en sortie » du rumen (bilans duodénaux), des mesures à l'échelle de l'animal ont été effectuées pour mieux appréhender la relation entre l'écosystème ruminal et l'animal-hôte (**Figure 56**) : comportement d'ingestion (intervalle de temps de 2 minutes), paramètres plasmatiques (de 30 minutes à 2 heures), performances zootechniques et qualité des produits (journée, semaine ou mois). Les cinétiques d'ingestion et les dynamiques de suivi des paramètres ruminiaux et plasmatiques ont été répétées sur plusieurs semaines pour étudier leur évolution dans le temps en parallèle des évolutions moyen-terme de l'ingestion, de la production et de la qualité du lait.

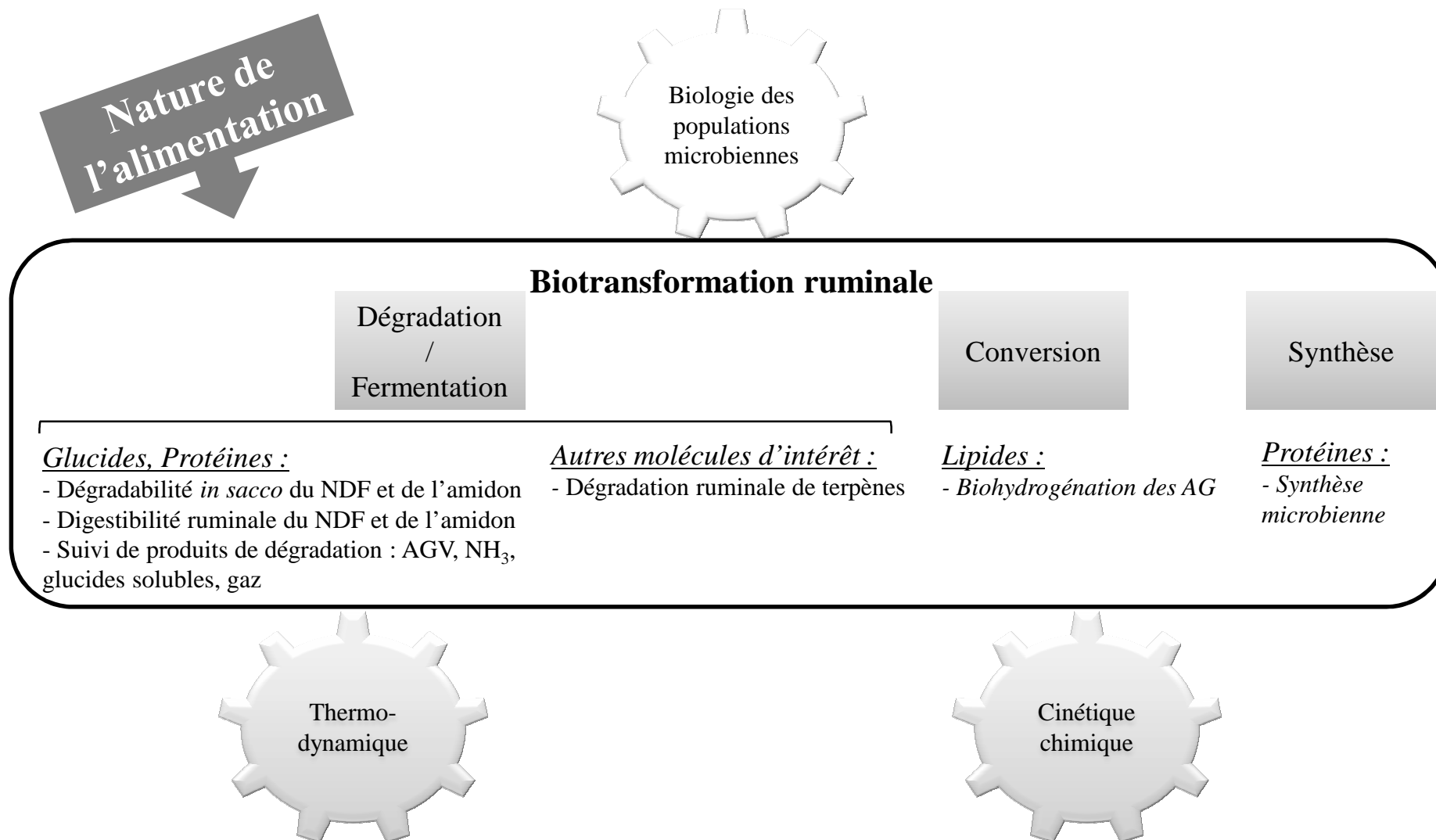


Figure 57 : Paramètres mesurés pour étudier la biotransformation ruminale.

L'expérimentation *in vitro* et le travail de modélisation ont permis également d'explorer des niveaux sous-jacents par rapport à ce qui a été réalisé *in vivo* : description des réactions physico-chimiques, bilans à l'échelle des éléments chimiques (carbone, hydrogène) (**Figure 56**). D'un point de vue pratique, ces différentes échelles rassemblées au niveau du modèle ont été représentées par des éléments de tailles très variables et ayant des turn-overs parfois très rapides pour les plus petits éléments. Cela, associé à quelques relations non-linéaires, génère des instabilités importantes du modèle, qui devient très sensible au changement de certaines valeurs de paramètres.

II. Effets du pourcentage de concentrés incorporés dans la ration sur les paramètres ruminiaux et les réactions de biotransformation ruminale

II.1. Essai *in vivo*

II.1.1 Paramètres physico-chimiques du rumen

Dans cette partie, la majorité des paramètres physico-chimiques du rumen mesurés pendant l'essai *in vivo* (**Article 1**) ont été comparés graphiquement à la base de données « chèvre-rumen » exploitée précédemment dans l'**Etude bibliographique**.

a) Paramètres physiques

Le pH ruminal a été significativement diminué par l'augmentation du pourcentage de concentrés dans la ration, ce qui est cohérent avec la base de données « chèvre-rumen » (pH mesuré à environ 4 heures après la distribution du repas) (**Figure 58**). Le pH ruminal de l'essai *in vivo* est plus faible par rapport à la plupart des autres études de la base de données, à l'exception des études de Desnoyers et al. (2008a) et Abijaoudé et al. (2000a).

Les données individuelles de pH mesurées lors des cinétiques sont largement liées aux concentrations ruminales en AGV totaux (**Figure 59**). La relation établie sur les données de l'essai *in vivo* est très proche de celle établie sur bovins par Tamminga et van Vuuren (1988). Cependant, ces auteurs n'ont pas précisé s'il s'agissait d'une régression à partir de données individuelles de pH mesurées avant la distribution du repas ou à différents temps de prélèvement, ou encore de pH moyens d'une cinétique de prélèvements. La pente de la relation établie à partir de la base de données Bovidig sur des pH moyens (lots de bovins) est moins forte que celle déterminée sur les données de l'essai *in vivo* (**Figure 59**). Cela pourrait être dû à une variation du pouvoir tampon dans le rumen au cours du temps. De plus, sur les données de l'essai *in vivo* (**Figure 59**), pour une même teneur en AGV, il existe un effet du régime sur le pH ($P < 0,001$) : pH plus élevé pour les animaux recevant le régime L et plus faible pour celles recevant le régime H. Cela suggère des capacités tampon du jus de rumen différentes selon le régime reçu, qui pourraient être dues à des différences de mastication et de recyclage salivaire des animaux.

Les valeurs de pH utilisées pour la **Figure 58** sont des moyennes par régime des mesures réalisées en semaines 4 et 10 à 4 h après la distribution du repas. Il faut noter que le

pH ruminal a évolué pendant la durée de l'essai, notamment pour les chèvres recevant le régime H. En effet, entre les semaines 4 et 10, le pH initial a été réduit de 7 % et l'amplitude de la chute de pH (différence entre pH initial et pH minimal au cours de la cinétique) a été réduite de 50 % chez les chèvres alimentées avec le régime H. Ces changements sont peut-être liés à une modification du comportement d'ingestion de ces animaux (voir partie III.1 de ce chapitre).

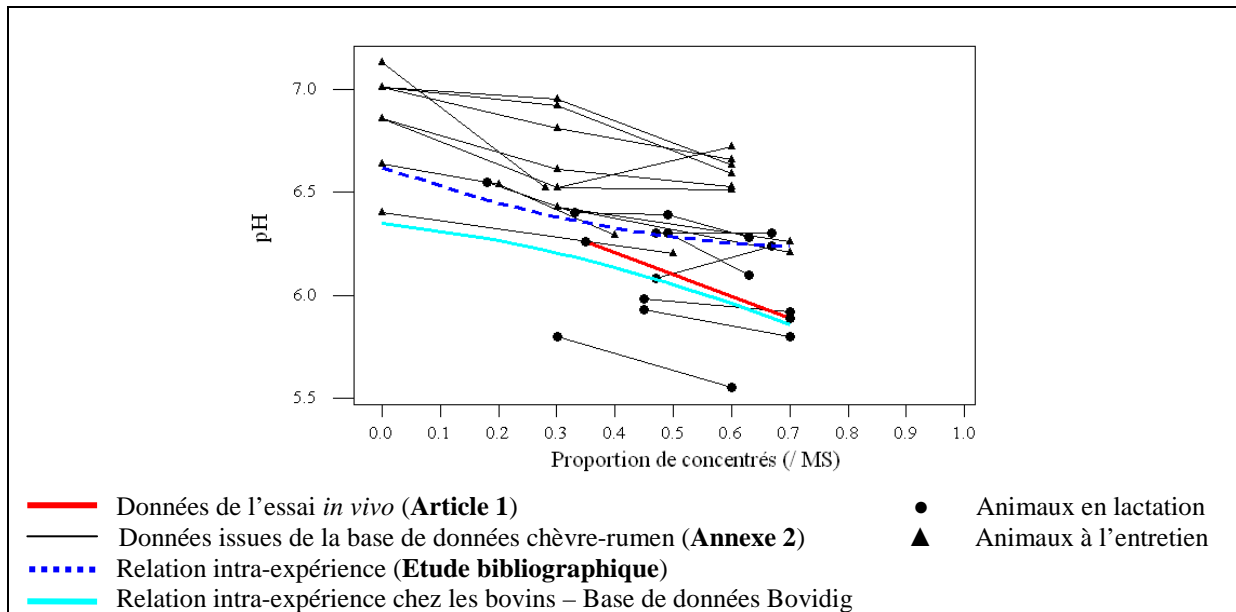


Figure 58 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur le pH ruminal chez la chèvre (≈ 4 h après la distribution du repas).

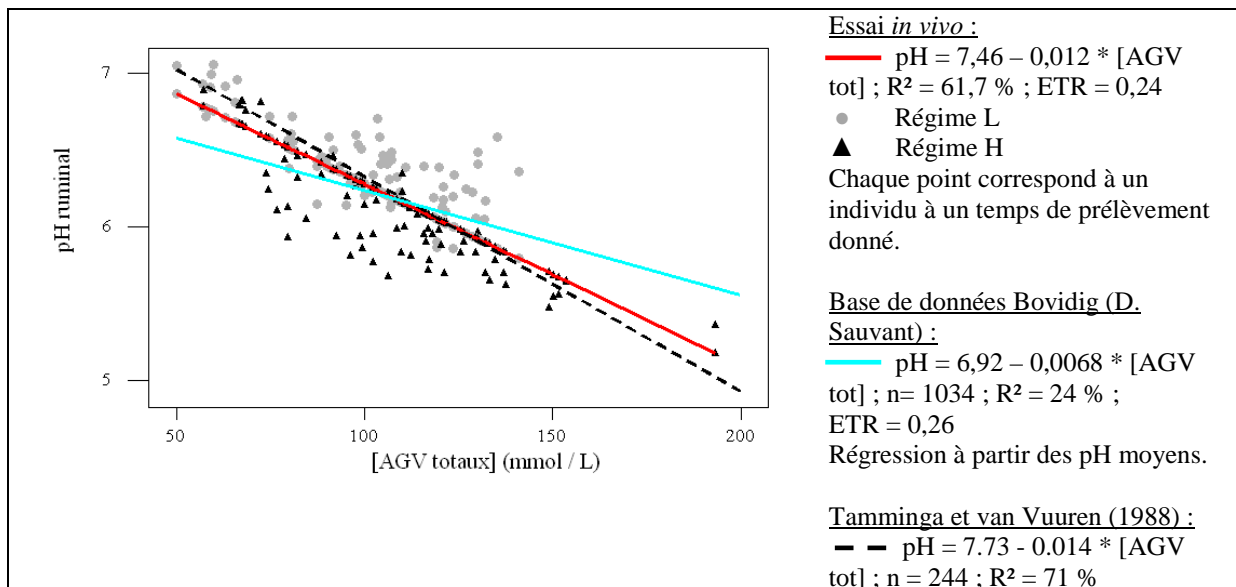


Figure 59 : Relation entre la concentration ruminale en AGV totaux et le pH ruminal (Article 1).

Le potentiel redox ruminal a été augmenté par l'accroissement du pourcentage de concentrés, comme cela a été observé par Marden (2007). La **Figure 60** montre la relation linéaire négative entre le potentiel redox et le pH. La corrélation entre ces deux paramètres a déjà été observée à plusieurs reprises (Marounek et al., 1982 ; Giger-Reverdin et al., 2006 ; Marden, 2007). Elle peut s'expliquer par le fait que la majeure partie des réactions biochimiques du rumen fait intervenir des couples redox avec des échanges de protons (Giger-Reverdin et al., 2006). La pente de la régression (-19) est plus faible que celles obtenues par Marden (2007) (-62 et -39). Notons que les pentes des régressions linéaires entre les chèvres recevant le régime L et celles recevant le régime H ne sont pas différentes.

La pression osmotique ruminale a été augmentée numériquement par l'augmentation du pourcentage de concentrés ($P = 0,09$). Rappelons que les résultats de la littérature sont hétérogènes pour ce paramètre physique : pas de modification chez Giger-Reverdin et al. (1997) et augmentation chez Bennink et al. (1978).

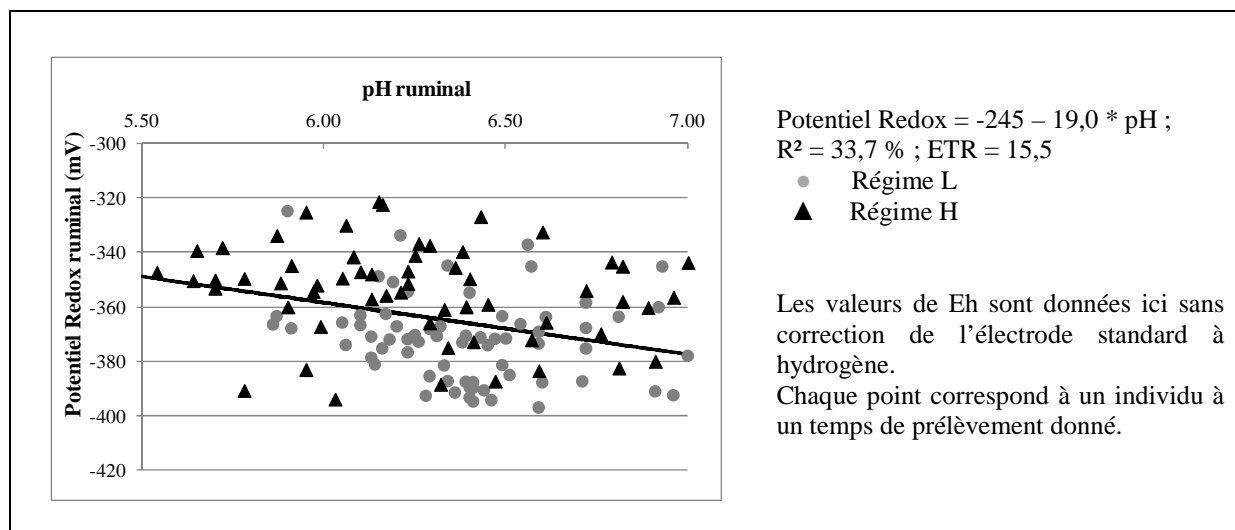


Figure 60 : Relation entre le pH et le potentiel d'oxydo-réduction dans le rumen (**Article 1**).

b) Produits de la dégradation et de la fermentation des constituants de la ration

L'augmentation du pourcentage de concentrés n'a pas eu d'effet sur la concentration ruminale en AGV totaux, ce qui est cohérent avec la base de données « chèvre-rumen » (**Figure 61a**). La proportion molaire en acétate a été diminuée par l'augmentation du pourcentage de concentrés, comme ce qui avait été montré avec la base de données « chèvre-rumen » (**Figure 61b**). Chez les caprins, la proportion molaire du propionate est biphasique (**Figure 61c**). L'augmentation du pourcentage de concentrés a augmenté la proportion molaire en propionate dans l'essai *in vivo* (**Figure 61c**), mais cette augmentation est plus prononcée que celle observée dans la base de données « chèvre-rumen » et semble similaire à la relation intra-expérience chez les bovins (base Bovidig). L'accroissement du pourcentage de concentrés n'a pas modifié la proportion molaire en butyrate (**Figure 61d**), alors que pour la base de données « chèvre-rumen », elle augmentait cette proportion. Dans l'essai *in vivo*, l'orientation fermentaire (butyrate non augmenté) est donc un peu différente par rapport à ce

qu'on peut trouver dans la littérature chez la chèvre laitière (à partir de la base de données « chèvre-rumen ») et se rapproche plus de ce qui est rencontré habituellement chez la vache laitière, lorsque le pourcentage de concentrés de la ration est augmenté (base Bovidig). On peut se poser la question de la portée générale des relations établies avec la base de données « chèvre-rumen » sur ces deux variables, car cette base de données rassemble essentiellement des rations avec des concentrés riches en amidon, alors que la matière première principale des concentrés de l'essai *in vivo* était la pulpe de betterave riche en fibres rapidement fermentescibles (27 % vs. 10 % MS des rations, pour les régimes H et L, respectivement), pouvant avoir un effet sur le profil fermentaire. L'effet de la présence de pulpe de betterave dans les rations sur le profil fermentaire est variable selon les auteurs. Voelker et Allen (2003a) ont montré que la présence de pulpe de betterave dans les concentrés pouvait induire une réduction de la proportion de propionate et une augmentation du butyrate chez la vache laitière, alors qu'O'Mara et al. (1997) n'ont pas observé d'effet. Les fermentations se sont orientées vers le propionate dans l'étude de Lettat et al. (2010), lors d'un apport massif de pulpe de betterave chez le mouton (acidose induite).

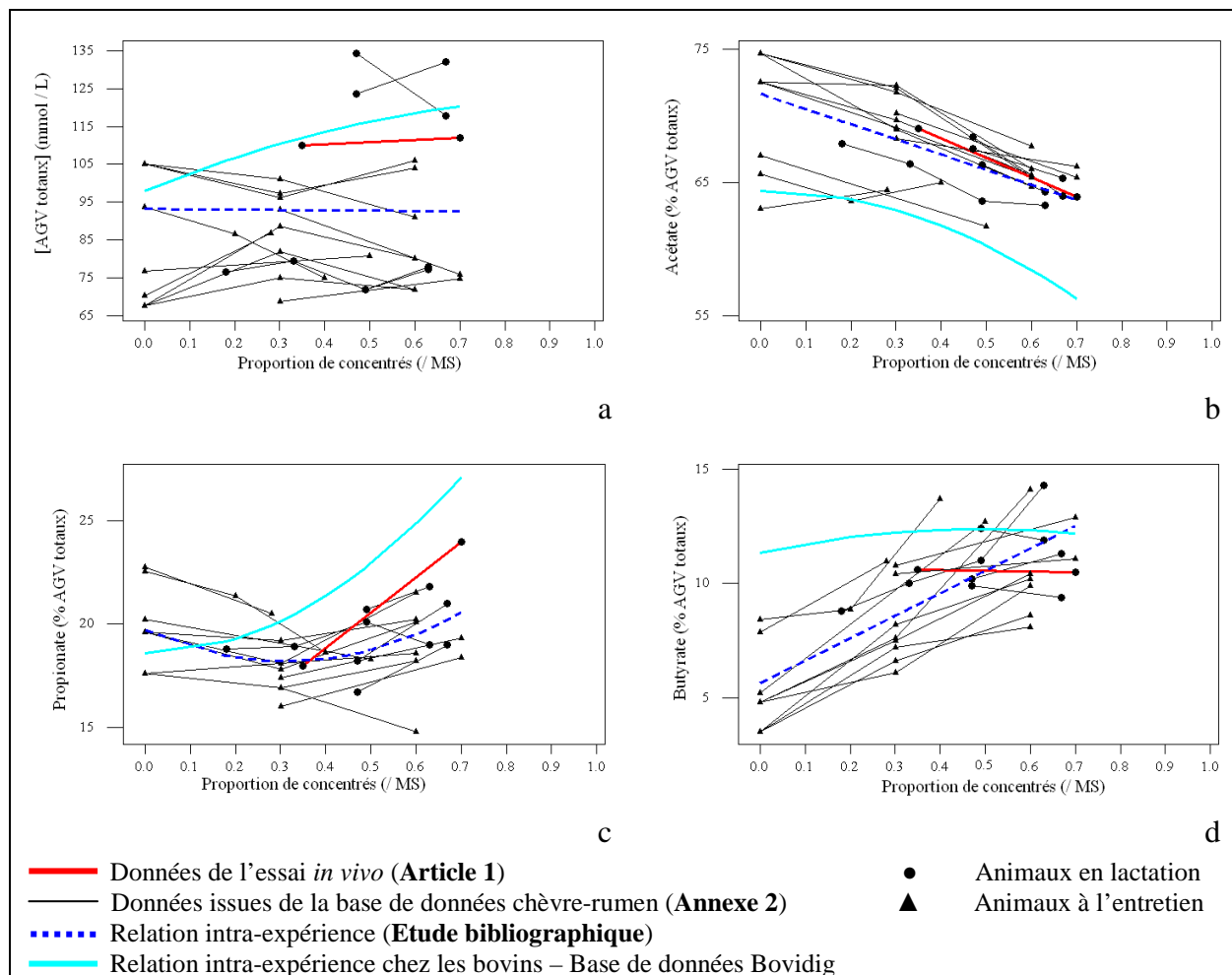


Figure 61 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur la concentration ruminale en AGV totaux (a), les proportions molaires en acétate (b), propionate (c) et butyrate (d) chez la chèvre (≈ 4 h après la distribution du repas).

Le pourcentage de concentrés a diminué la concentration ruminale de $\text{NH}_3\text{-N}$ (**Figure 62**). Abijaoudé et al. (2000a) ont également observé cette diminution avec des rations ayant des pourcentages de concentrés très proches de notre essai (70 vs. 45 % de concentrés) et des teneurs en protéines des régimes similaires aux nôtres (entre 15,4 et 17,9 g / 100 g MS). Cantalapiedra-Hijar et al. (2009) ont au contraire observé une augmentation de cette concentration avec des rations à 70 vs 30 % de concentrés, ayant des teneurs en protéines respectivement égales à 16,8 et 12,6 g / 100 g MS. Dans l'essai *in vivo*, les rations ont été formulées pour être iso-azotées (17 g / 100 g MS). La diminution de la concentration ruminale de $\text{NH}_3\text{-N}$ peut s'expliquer par un apport plus important de MOF avec le régime H qu'avec le régime L (60,9 vs. 53,4 g / 100 g MS, respectivement) avec un apport en azote similaire. La MOF favorise donc la croissance des microorganismes, qui, en conséquence, capteraient plus de $\text{NH}_3\text{-N}$ dans le milieu, faisant ainsi diminuer sa concentration. Nous avons cherché à quantifier ces phénomènes. La différence de quantité d'azote microbien ruminal entre les chèvres recevant les régimes L et H a été estimée à + 8,9 g N microbien / jour (calcul à partir de la MOF). La différence de quantité de $\text{NH}_3\text{-N}$ du milieu ruminal entre les chèvres recevant les régimes L et H a été estimée, quant à elle, à - 13,4 g $\text{NH}_3\text{-N}$ / jour (calculé en supposant un taux fractionnaire de renouvellement du NH_3 de 100 % / h et un volume de rumen de 10 L). Cela augmenterait en conséquence le flux de protéines microbiennes au niveau de l'intestin, ce qui est cohérent avec la valeur PDIE supérieur du régime H par rapport au régime L (114 vs. 104 g PDIE / kg MS, respectivement).

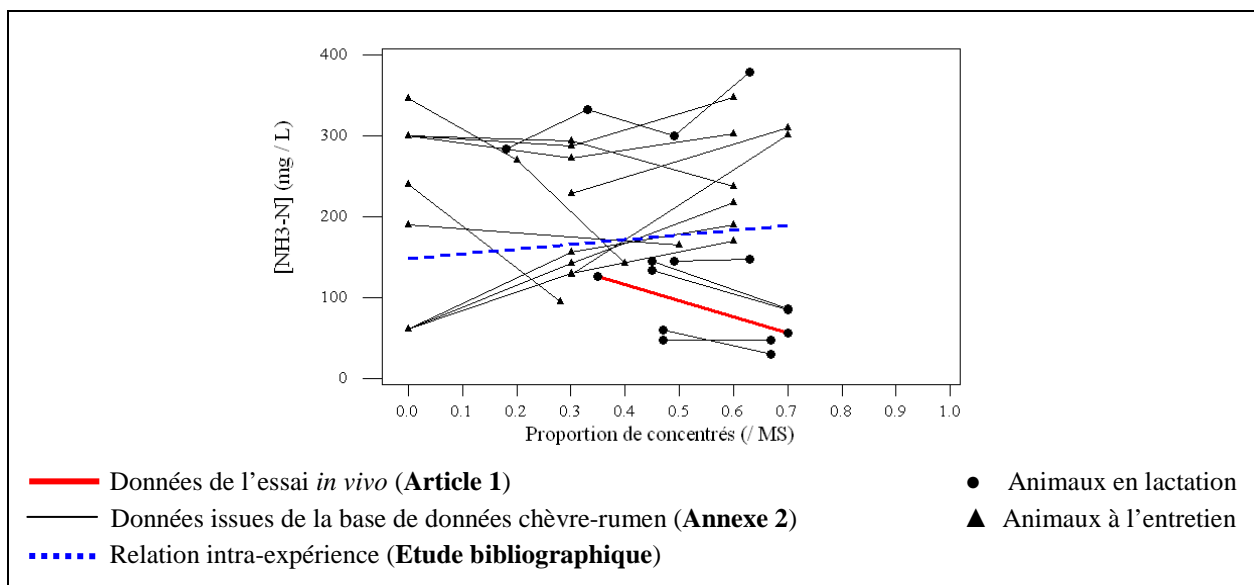


Figure 62 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur la concentration ruminale en ammoniac chez la chèvre (≈ 4 h après la distribution du repas).

II.1.2 Capacité ruminale de biotransformation de différents substrats

a) Capacité ruminale de dégradation des glucides (NDF et amidon)

La digestibilité ruminale du NDF a été numériquement augmentée par l'accroissement du pourcentage de concentrés (**Article 2**), alors qu'elle n'a pas été modifiée (McAllan et al., 1994 ; Cerrillo et al., 1999 ; Ueda, et al., 2003) ou a été augmentée (Kalsheur et al., 1997) chez la vache et la chèvre laitières. L'augmentation de la digestibilité ruminale du NDF observée dans l'essai *in vivo* est probablement liée à la forte teneur en pulpe de betterave du régime H par rapport au régime L. En effet, la présence de pulpe de betterave dans les rations peut augmenter la digestibilité ruminale du NDF (Huhtanen, 1988 ; Voelker et Allen, 2003b), car le NDF contenu dans les pulpes de betterave est digéré plus rapidement que celui contenu dans le fourrage (Bhatti et Firkins, 1995) et contrairement à l'amidon, la fermentation de la pectine n'inhibe pas la digestion de la cellulose (Voelker et Allen, 2003b). La dégradabilité *in sacco* du NDF avec pour substrat le foin de prairie a été, quant à elle, diminuée par l'augmentation du pourcentage de concentrés (**Article 1**), ce qui peut s'expliquer par une inhibition de l'activité des bactéries cellulolytiques due à la diminution du pH ruminal (Martin et al., 2001). Les deux résultats présentés ici ne sont pas forcément contradictoires car, dans un cas, nous avons étudié le foin de prairie, et dans l'autre, la ration complète.

La digestibilité ruminale de l'amidon n'a pas été modifiée par l'augmentation du pourcentage de concentrés, ce qui est cohérent avec les résultats de la méta-analyse d'Archimède et al. (1997). La dégradabilité *in sacco* de l'amidon avec pour substrat le maïs n'a pas non plus été modifiée par l'augmentation du pourcentage de concentrés. Notons que la teneur en amidon des rations était faible. Ainsi, il ne semble pas que la digestibilité ruminale de l'amidon soit un bon marqueur de l'activité de biotransformation ruminale, du moins lorsque les teneurs en amidon sont faibles.

b) *Capacité ruminale de dégradation de terpènes*

Dans l'essai *in vivo* (**Article 2**), nous avons ajouté directement dans le rumen des chèvres quatre monoterpènes (β -pinène, p-cymène, α -terpinéol et β - et γ -terpinéols), considérés comme marqueurs de l'activité de dégradation du système ruminal. Nous avons comparé les taux de dégradation ruminale apparente des terpènes obtenus dans l'essai *in vivo* aux résultats de 4 études (3 *in vitro* et une *in vivo*) réalisées dans l'UMR MoSAR (**Tableau 12**). A notre connaissance, l'effet du pourcentage de concentrés sur la dégradation *in vivo* des terpènes étudiés ici n'a jamais été rapporté dans la littérature. Dans l'étude *in vivo*, l'augmentation du pourcentage de concentrés a uniquement accru le taux de dégradation ruminale apparente de l' α -terpinéol. Les taux de dégradation du β -pinène de l'essai *in vivo* sont en accord avec ceux observés *in vivo* par Malecky et al. (2009a) et *in vitro* par Malecky et Broudiscou (2009) avec des teneurs en NDF similaires. Le taux de dégradation du p-cymène de l'essai *in vivo* est plus faible que celui observé *in vivo* par Malecky et al. (2009a), ce qui peut s'expliquer par une activité microbienne différente entre ces deux études. Il est par contre très proche du taux de dégradation obtenu *in vitro* par Malecky et al. (2012). Les taux de dégradation de l' α -terpinéol de l'essai *in vivo* sont plus élevés que ceux observés *in vitro* (Malecky et al., 2009b ; Malecky et al., 2012), ce qui peut s'expliquer par une absorption de ce terpène à travers la paroi ruminale du fait de sa forte solubilité. Enfin, à notre connaissance, il n'existe pas de données sur les taux de dégradation des β - et γ -terpinéols dans la littérature.

Pour conclure, les taux de dégradation apparente des terpènes utilisés dans l'essai *in vivo* ne discriminent pas les deux types de régimes. Par conséquent, ces molécules ne semblent pas être de bons marqueurs de l'activité de biotransformation du rumen et ne devrait pas être réutilisées dans ce but, lors de futures études dans des conditions expérimentales similaires.

Tableau 12 : Dégradation de terpènes en milieu ruminal.

	Malecky et Broudiscou (2009)	Malecky et al. (2009b)	Malecky et al. (2012)	Malecky et al. (2009a)	Article 2	
Type d'essai :	<i>In vitro</i>			<i>In vivo</i>		
Composition de la ration ou du substrat (g / 100 g MS) :					L	H
NDF	55	25		44,2	40,9	36,0
Taux de dégradation apparente :						
	(% apport initial)			(% ingéré)		
β -pinène	73,4	59,5		73,9	73,9	77,6
p-cymène		64,7	75,8	96,5	77,5	79,0
α -terpinéol		17,5	24,7		90,6	93,7
β et γ -terpinéol					95,6	94,2

c) *Capacité de biohydrogénation des acides gras*Bilan entre l'ingestion et les flux duodénaux d'AG totaux

Dans l'essai *in vivo*, les flux duodénaux d'AG totaux représentaient 167 et 118 % des AG ingérés pour les chèvres recevant les régimes L et H, respectivement. Dans la méta-analyse de Schmidely et al. (2008), les bilans étaient compris entre 84 et 94 %. Néanmoins, nos résultats y sont difficilement comparables, car, dans cette méta-analyse, les bilans ont été réalisés à partir d'études où les animaux recevaient des rations avec des teneurs en AG élevées (entre 5 et 12 g / 100 g MS). Dans certaines études (Kalscheur et al., 1997; Sackmann et al., 2003; Loor et al., 2004; Andrade, 2006) plus proches de nos conditions expérimentales (animaux alimentés avec des rations contenant moins de 5 g / 100 g MS d'AG) et dans lesquelles le principal facteur expérimental était le pourcentage de concentrés (**Tableau 13**), des valeurs élevées de bilan (jusqu'à 139 % pour Loor et al., 2004) sont rapportées, mais elles restent inférieures au bilan de 167 % trouvé chez les chèvres recevant le régime L.

D'autre part, nous avons comparé nos valeurs absolues de flux d'AG de l'étude *in vivo* avec la seule étude menée chez la chèvre laitière à notre connaissance (thèse de P. Andrade, 2006). Les valeurs obtenues dans l'essai *in vivo* pour les ingestions et les flux duodénaux d'AG totaux représentent quasiment le double de ce qu'avait obtenu Andrade (2006) (**Figure 63** et **Tableau 13**). Les deux études ont utilisé des méthodes d'analyse des AG différentes (**Article 2** et méthode de Loor et al., 2004). Des études complémentaires sont menées à l'heure actuelle pour comprendre la possible surestimation des teneurs en AG mesurées au niveau duodéal dans notre essai *in vivo*.

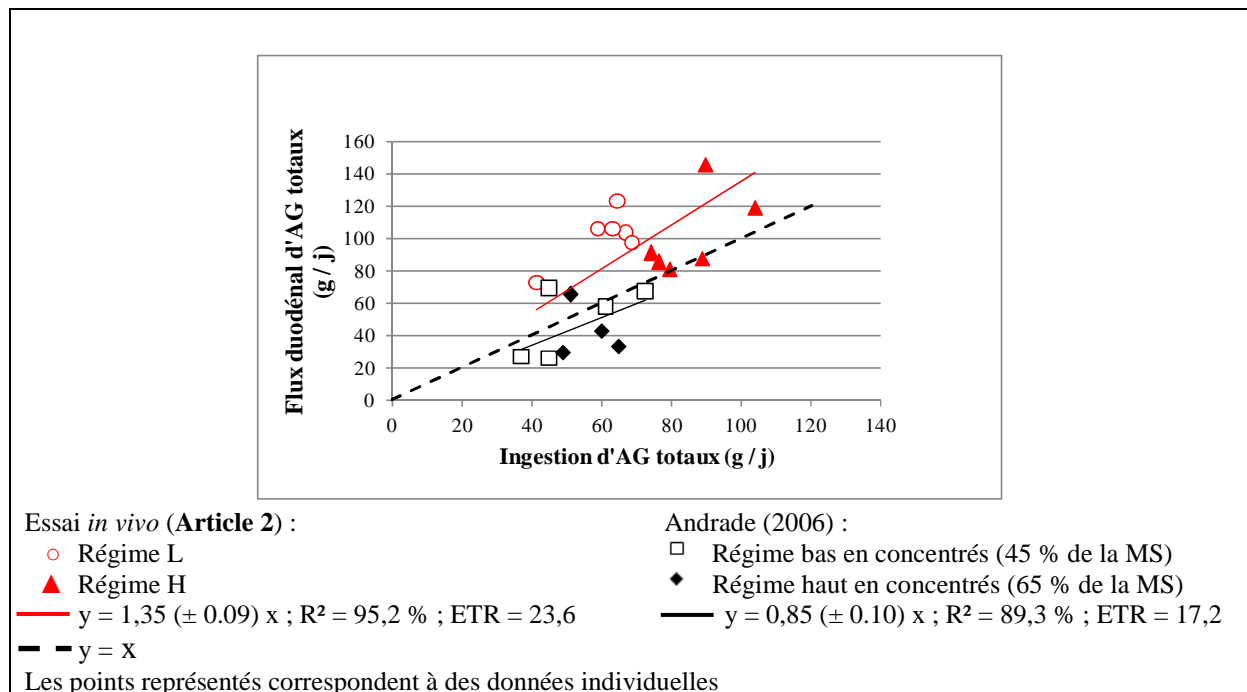


Figure 63 : Relation entre ingestion et flux duodénaux d'AG totaux chez la chèvre laitière (en g / j).

Biohydrogénation des acides oléique, linoléique et linoléique

Les taux de biohydrogénation des *cis*-9 C18:1, *cis*-9, *cis*-12 C18:2 et *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3 ont été calculés en corrigeant des teneurs en C18 ingérées et mesurées au niveau duodéal. Cela permet de s'affranchir partiellement des différences de récupération de la somme des C18 au niveau duodéal. Nous avons appliqué ces mêmes calculs aux études d'Andrade (2006), de Kalscheur et al. (1997), de Loor et al. (2004) et de Sackmann et al. (2003) (**Tableau 13**). Dans l'étude *in vivo*, l'augmentation du pourcentage de concentrés a augmenté la biohydrogénation des *cis*-9 C18:1 et *cis*-9, *cis*-12 C18:2, mais n'a pas eu d'effet sur la biohydrogénation du *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3. Une méta-analyse sur les données du **Tableau 13** (en excluant les données de l'essai *in vivo*) montre que l'augmentation du pourcentage de concentrés a diminué la biohydrogénation du *cis*-9, *cis*-12 C18:2 de -1,46 % pour 10 % de concentrés en plus et celle du *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3 de -1,59 % pour 10 % de concentrés en plus et n'a pas eu d'effet sur la biohydrogénation du *cis*-9 C18:1. Glasser et al. (2008) ont également observé que le pourcentage de concentrés avait plus d'effet sur les biohydrogénations des *cis*-9, *cis*-12 C18:2 et *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3 que sur celle du *cis*-9 C18:1. Ainsi, suivant le nombre de double-liaisons, la biohydrogénation est différente.

Il est généralement admis qu'un pH ruminal diminué par l'augmentation du pourcentage de concentrés réduit la lipolyse (Van Nevel et Demeyer, 1996) et la biohydrogénation (Van Nevel et Demeyer, 1996; Troegeler-Meynadier et al., 2003). Les niveaux de pH de l'essai *in vivo* étaient plus élevés que ceux des études chez la vache laitière (Kalscheur et al., 1997; Loor et al., 2004), et similaires à l'étude chez la chèvre laitière (Andrade et Schmidely, 2006) (**Tableau 13**). Notons que l'effet du pourcentage de concentrés sur le pH n'était pas significatif chez Loor et al. (2004) et Andrade et Schmidely (2006), alors qu'il l'était dans l'essai *in vivo*. Il est ainsi difficile de dégager des lois générales à partir de ces données, car les pH sont peu cohérents. La différence de résultats entre l'essai *in vivo* et la majorité des données de la littérature pourrait s'expliquer par la nature de la ration et le moyen choisi pour augmenter le pourcentage de concentrés : fort pourcentage de pulpe de betterave dans l'essai *in vivo* vs. ajout de céréales et donc d'amidon dans la majorité des autres publications. Au niveau microbien, les bactéries cellulolytiques, comme *Byturivibrio fibrisolvens*, sont considérées comme les plus actives dans les phénomènes de biohydrogénation (Harfoot et Hazlewood, 1997 ; Lourenço et al., 2010). Dans l'essai *in vivo*, les résultats de dégradabilité *in sacco* du NDF (foin de prairie), indiquent une activité cellulolytique plus faible avec le régime H qu'avec le régime L (voir partie II.1.2 a). Cependant, on peut faire l'hypothèse que la diminution de l'activité cellulolytique pourrait être plus importante avec des régimes riches en amidon, induisant ainsi une diminution de la biohydrogénation des AG polyinsaturés.

Tableau 13 : Comparaison de plusieurs études : ingestion et flux duodénaux d'AG totaux et de C18 totaux, taux de biohydrogénation des acides oléique, linoléique et linoléique.

		Article 2		Andrade (2006)		Kalscheur et al. (1997)		Loor et al. (2004)		Sackmann et al. (2003)		
Espèce		Chèvre laitière		Chèvre laitière		Vache laitière		Vache laitière		Taurillon en croissance		
Ration	Part de concentrés (% MS)	35	70	45	65	40	75	35	65	64	76	88
	Teneur en AG (g / 100 g MS)	2,33	2,81	1,6	1,8	3,77	4,01	1,6	1,9	4,1	4,5	4,8
	Teneur en amidon (g / 100 g MS)	4,38	9,70	15,2	24,4			11,1	23,9			
Ingestion	AG totaux (g / j)	60,5	85,4	52,1	56,0	789	954	306,4	394,6	269,5	328,8	330,8
	C18 totaux (g / j)	34,0	67,1	36,8	40,2	634	791	242,9	319,9			
Flux duodénaux	AG totaux (g / j)	101	101	49,5	42,7	916	1288	426,6	521,6	283,1	302,5	252,5
	C18 totaux	68,7	82,4	31,7	29,3	682	975	336,6	431,8			
Flux duodénaux / Ingestion	AG totaux (% ingestion)	167	118	95	76	116	135	139	132	105	92	76
Biohydrogénation ¹	<i>cis</i> -9 C18:1	66,4^b	73,6^a	63,0	45,7	46,1	44,0	69,2	69,6	76,5	76,1	70,8
	<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, C18:2	69,5^b	75,1^a	80,5	76,3	78,9	73,0	83,7	80,9	93,6	92,1	90,3
	<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 C18 :3	78,4	77,1	89,7	83,6	87,4	81,9	92,1	88,1	93,3	89,8	90,8
pH ruminal	Avant la distribution du repas	6,85²	6,82²	6,91 ³	6,97 ³	6,13	5,83					
	3 h après la distribution du repas			6,30 ³	6,30 ³							
	Moyenne	6,47²	6,12²					6,34 ⁴	6,31 ⁴			

^{a, b} lettres indiquées quand la différence est significative ($P < 0.05$)

¹ BH2 (%) = $100 - 100 * (\text{Flux duodéal du C18 testé} / \text{Flux duodénaux de C18 totaux}) / (\text{Ingestion du C18 testé} / \text{Ingestion de C18 totaux})$ d'après Wu et al. (1991)

² **Article 1**

³ Andrade et Schmidely (2006)

⁴ Moyenne des prélèvements à 0 et 1,5 h après la distribution du repas (Ueda et al., 2003)

II.2. Essais *in vitro*

II.2.1 Paramètres physico-chimiques du milieu fermentaire *in vitro* : comparaison avec l'*in vivo*

a) Associations « Substrat L + Inoculum L » et « Substrat H + Inoculum H »

Les associations « Substrat L + Inoculum L » et « Substrat H + Inoculum H », communes aux **Articles 4** et **5**, ont été comparées à l'essai *in vivo* (**Tableau 14**). Dans la colonne « essais *in vitro* » du **Tableau 14**, les effets du pourcentage de concentrés sur les jus de rumen des animaux-donneurs, à partir desquels les inocula ont été fabriqués (par mélange avec la solution tampon), ont été ajoutés. Notons que les résultats des deux essais *in vitro* ont été identiques avec les associations « Substrat L + Inoculum L » et « Substrat H + Inoculum H ».

Tableau 14 : Tableau comparatif des effets du pourcentage de concentrés sur les paramètres physico-chimiques ruminiaux dans les essais *in vitro* (**Articles 4 et 5**) et *in vivo* (**Article 1**).

	Essais <i>in vitro</i>				Essai <i>in vivo</i>	
	Jus de rumen L	Jus de rumen H	Substrat et Inoculum L	Substrat et Inoculum H	Régime L	Régime H
	Sens de variation		Sens de variation		Sens de variation	
pH	↘		↘		↘	
[NH ₃ -N]	↘		↘		↘	
[AGV totaux]	=		↗ ou =		=	
Proportion molaire en AGV :						
Acétate	↘		↘		↘	
Propionate	↗		↗ ou =		↗	
Butyrate	↗		↗		=	
Isobutyrate + Isovalérate	↘		↘ ou =		↘	
A / P	↘		↘		↘	

Les effets du pourcentage de concentrés dans les essais *in vitro* ont été très similaires à ceux observés *in vivo* en termes de sens de variation des réactions (**Tableau 14**). Le pH et la concentration en NH₃-N ont été dans les deux types d'essais diminués par l'augmentation du pourcentage de concentrés. Les résultats sur les profils en AGV sont très similaires entre les deux types d'essais. Il est à noter une petite différence sur la proportion en butyrate, car dans les essais *in vitro* la proportion de butyrate augmentait alors que dans l'essai *in vivo*, l'effet du pourcentage de concentrés n'était pas significatif. On peut expliquer, en partie, cette

différence par une différence au niveau du jus de rumen servant à la fabrication des inocula, pour lequel la proportion de butyrate était accrue par l'augmentation du pourcentage de concentrés.

Les différences observées entre les essais *in vitro* et *in vivo* peuvent être expliquées, la plupart du temps, par des aspects méthodologiques :

- Pour fabriquer l'inoculum dans l'essai *in vitro*, les prélèvements de contenu ruminal ont été filtrés, éliminant ainsi une partie de la flore microbienne, notamment celle attachée aux grosses particules ;
- Entre les deux types d'essais, l'amplitude de la chute de pH et la différence entre les deux régimes n'ont pas été du même ordre de grandeur : pour l'amplitude, 0,08 vs. 0,74 unités pH pour les essais *in vitro* et *in vivo* respectivement et pour la différence de pH entre les régimes 0,18 vs. 0,40 unités pH. Ces observations s'expliquent largement par l'ajout important de solution tampon dans les essais *in vitro* ;
- Les concentrations en substrats dans les seringues sont différentes des concentrations dans le rumen, ce qui explique des valeurs absolues de paramètres différentes entre les deux types d'essais ;
- Enfin, la différence majeure entre les deux types d'essais concerne le type de système considéré : fermé vs. ouvert pour l'*in vitro* et l'*in vivo* respectivement. En effet, dans le cas des essais *in vitro*, on observe des variations qui s'amplifient avec le temps, alors qu'*in vivo*, on observe une variation avec un retour à la valeur de base, du fait notamment de la sortie de contenu ruminal par l'orifice réticulo-omasal ou de l'absorption de nutriments à travers la paroi ruminale. Ainsi, les résultats *in vitro* s'éloignent de l'*in vivo* au fil du temps de l'incubation. Ces éléments peuvent expliquer les différences de variation observées pour la concentration en AGV totaux entre les essais *in vitro* et l'essai *in vivo*.

Ainsi, les intensités et les dynamiques de réactions observées *in vitro* sont difficilement représentatives de celles observées *in vivo*.

Dans la littérature, la comparaison *in vitro* / *in vivo* est généralement utilisée pour décrire les relations entre les profils *in vitro* de production de gaz et la digestibilité *in vivo* d'aliments ou entre ces profils et l'ingestion des animaux (Getachew et al., 1998). Peu d'auteurs se sont intéressés à la prédiction des fermentations *in vivo* d'aliments par les fermentations *in vitro* de ces mêmes aliments. Rymer et Givens (1998) ont montré une corrélation entre les AGV mesurées *in vitro* et ceux mesurés *in vivo* sur des animaux (proportion molaires en AGV). Ces auteurs avaient utilisé du jus de rumen, pour leur étude *in vitro*, qui avait été prélevé sur les animaux utilisés dans l'étude *in vivo*. Brown et al. (2002) n'ont par contre pas observé de telles relations, mais le jus de rumen provenait de moutons, alors que leur étude *in vivo* était réalisée sur des bovins en croissance. Les paramètres fermentaires des essais *in vivo* et *in vitro* pour les temps 0, 2-3 h, et 6 h ont été comparées. Même si cette comparaison repose sur peu de points (n = 6), les régressions linéaires ont été significatives pour le pH ($\text{pH}_{in\ vivo} = -18,7 + 3,69 \text{ pH}_{in\ vitro}$; $R^2 = 64,5\%$; $\text{ETR} = 0,25$), la proportion molaire en acétate ($\% \text{acétate}_{in\ vivo} = 22,9 + 0,70 * \% \text{acétate}_{in\ vitro}$; $R^2 = 66,9\%$;

ETR = 1,66) et en propionate ($\% \text{propionate}_{in vivo} = -23,2 + 2,21 * \% \text{propionate}_{in vitro}$; $R^2 = 73,5 \%$; ETR = 1,75).

Au vu de cette comparaison (**Tableau 14**), on peut conclure que le sens de variation de la majorité des paramètres mesurés *in vitro* lié à l'augmentation du pourcentage de concentrés, peut être extrapolé à l'*in vivo*. Par contre, les intensités et les dynamiques de réactions ne peuvent pas l'être très facilement.

b) Associations « Substrat L ou H + Inoculum L » ou « Substrat L ou H + Inoculum H »

Les essais *in vitro* ont été réalisés dans des conditions particulières par rapport aux essais classiquement rapportés dans la littérature. Les régimes des animaux-donneurs correspondaient aux rations testées et donc pour les associations « Substrat L + Inoculum L » et « Substrat H + Inoculum H », les inocula étaient « adaptés » à la ration qu'ils dégradait. Dans les études *in vitro* de la littérature, le régime du donneur est en général fixé et il y a un inoculum unique pour l'ensemble des substrats testés (quel que soit le type de substrat). Le régime donné aux animaux-donneurs est très dépendant de l'équipe de recherche considérée (Nagadi et al., 2000) : fourrage seul (Pell et Schofield, 1993 ; Blümmel et Becker, 1997 ; Getachew et al., 2005) ou mélange fourrages-concentrés avec des pourcentages de concentrés différents selon les équipes (Menke et Steingass, 1988 ; Calabro et al., 2008 ; Goiri et al., 2009).

Le **Tableau 15** résume le sens de variation des paramètres physico-chimiques lorsque les substrats L et H étaient associés, soit à l'inoculum L, soit à l'inoculum H (**Article 4**). Avec ces associations substrat + inoculum, les sens de variations sont beaucoup moins cohérents à ce qui a été observé *in vivo*. L'**Article 4** a permis de se rendre compte de l'importance de l'influence de l'inoculum par rapport au substrat. Notons que le rapport substrat / inoculum utilisé (6,6 g MS / L d'inoculum) est le rapport « officiel » de la méthode de Menke et al. (1979). Néanmoins, ce ratio est largement inférieur à ce qu'on trouve *in vivo* ($129 \pm 1,1$ g MS / kg de contenu ruminal, n= 344, d'après la base de données Bovidig, D. Sauvart, communication personnelle). Lorsque l'inoculum se trouve en présence d'un substrat auquel il n'est pas adapté, le sens de variation des fermentations est plus dépendant de l'inoculum que du substrat. On peut faire l'hypothèse que les populations microbiennes sont assez peu modifiées par le substrat en présence, car les réactions sont étudiées sur du très court terme (maximum 24 h), ce qui n'est pas suffisant pour que les populations s'adaptent.

Pour conclure, comme le montre le **Tableau 15**, selon la méthode *in vitro* utilisée (type d'inoculum), l'extrapolation des résultats *in vitro* trouvés dans la littérature vers l'*in vivo* n'est pas toujours valable.

Tableau 15 : Tableau comparatif des effets du pourcentage de concentrés sur les paramètres physico-chimiques ruminiaux dans les essais *in vitro* (association des substrats L et H avec soit l'inoculum L soit l'inoculum H) (**Article 4**) et *in vivo* (**Article 1**).

	Essais <i>in vitro</i>				Essai <i>in vivo</i>	
	Inoculum L		Inoculum H		Régime L	Régime H
	Substrat L	Substrat H	Substrat L	Substrat H		
	Sens de variation		Sens de variation		Sens de variation	
pH	=		=		↘	
[NH ₃ -N]	↘ ou =		↘ ou =		↘	
[AGV totaux]	=		↗ ou =		=	
Proportion molaire en AGV :						
Acétate	=		=		↘	
Propionate	↘ ou =		↘ ou =		↗	
Butyrate	↗ ou =		↗ ou =		=	
Isobutyrate + Isovalérate	↘ ou =		↘ ou =		↘	
A / P	=		=		↘	

II.2.2 Production de gaz

La technique *in vitro* « gaz-test » a été utilisée pour quantifier en cinétique la production de gaz et déterminer la composition des gaz produits, ce qui a permis d'augmenter le nombre de facteurs expérimentaux (pourcentage de concentrés, addition de lipides).

La production de gaz totaux et la production totale de CH₄ ont été accrues par l'augmentation du pourcentage de concentrés. Getachew et al. (2005) ont observé des résultats variables (augmentation et diminution) de production de gaz totaux avec des rations mixtes contenant des pourcentages de concentrés entre 53 à 66 % de la MS, avec la même technique *in vitro* (Menke et Steingass, 1988) et la production de CH₄ n'a pas été modifiée (Getachew et al., 2005). L'absence d'effet ou les effets inverses observés entre les résultats que nous avons obtenus (**Articles 4** et **5**) et ceux de Getachew et al. (2005) peuvent s'expliquer par des différences sur les plages de variations des pourcentages de concentrés. Dans les **Articles 4** et **5**, l'augmentation de la production de CH₄ peut s'expliquer par plusieurs raisons. D'une part, la chute de pH n'a probablement pas été suffisamment importante pour réduire la méthanogenèse (Van Kessel et Russell, 1996). D'autre part, d'après les relations stœchiométriques (**Complément**), la diminution de la production d'acétate (= réduction de la libération d'H₂ moléculaire) et l'augmentation de la production de propionate (= augmentation de la captation d'H₂ moléculaire) auraient dû limiter la production de CH₄. Néanmoins, on observe également une augmentation de la production de

butyrate qui libère du H₂ moléculaire dans le milieu, potentiellement disponible pour la méthanogenèse (Janssen, 2010).

La supplémentation en huile (mélange d'huiles de lin et de tournesol, 10 % de la MS du substrat, **Article 5**) n'a pas eu d'effet évident sur la production de CH₄, en cohérence avec l'absence d'effets sur les AGV. Seule la proportion molaire en CH₄ par rapport aux gaz totaux a été réduite. Il n'y a eu aucune interaction entre la supplémentation en lipides et le pourcentage de concentrés sur ces paramètres. Notons que la production d'H₂ gazeux a été réduite par la supplémentation en huile (entre 0 et 3 heures pour le régime H et entre 3 et 12 heures d'incubation). Les huiles de lin et de tournesol ont été choisies du fait de leur composition en AG polyinsaturés. D'autres études *in vitro* ont montré une réduction de la production de méthane quand des AG polyinsaturés étaient ajoutés au milieu (Zhang et al., 2008; Li et al., 2010). L'absence d'effet de l'essai *in vitro* décrit dans l'**Article 5**, est peut-être due à une dilution trop importante de l'huile par rapport au volume d'inoculum (7,5 g MS / L), alors que dans l'étude de Li et al. (2010), où une réduction de 69 % de la production de CH₄ a été observée, la dilution du *cis*-9, *cis*-12 C18:2 était égale à 17 g MS / L (3 % de la MS du substrat). La valeur de supplémentation choisie dans l'essai *in vitro* correspond à un apport de lipides relativement faible *in vivo* (7,5 g / L en supposant une chèvre ingérant 3 kg de MS avec une ration à 2,5 % d'AG et un volume ruminal de 10 L). Plusieurs méta-analyses, sur des données *in vivo*, ont montré une diminution de la production de CH₄ avec un apport de lipides dans les rations (Doreau et al., 2011) : diminution de 2,2 % (Giger-Reverdin et al., 2003), 1,7 % (Eugène et al., 2008), 5,6 % (Beauchemin et al., 2008) et 3,8 % (Martin et al., 2010) de la production de CH₄ par kg de MSI par point de lipides supplémentaires dans la ration.

II.3. Conclusion

La **Figure 64** résume l'effet du pourcentage de concentrés sur la biotransformation ruminale au vu des résultats des essais *in vivo* et *in vitro*.

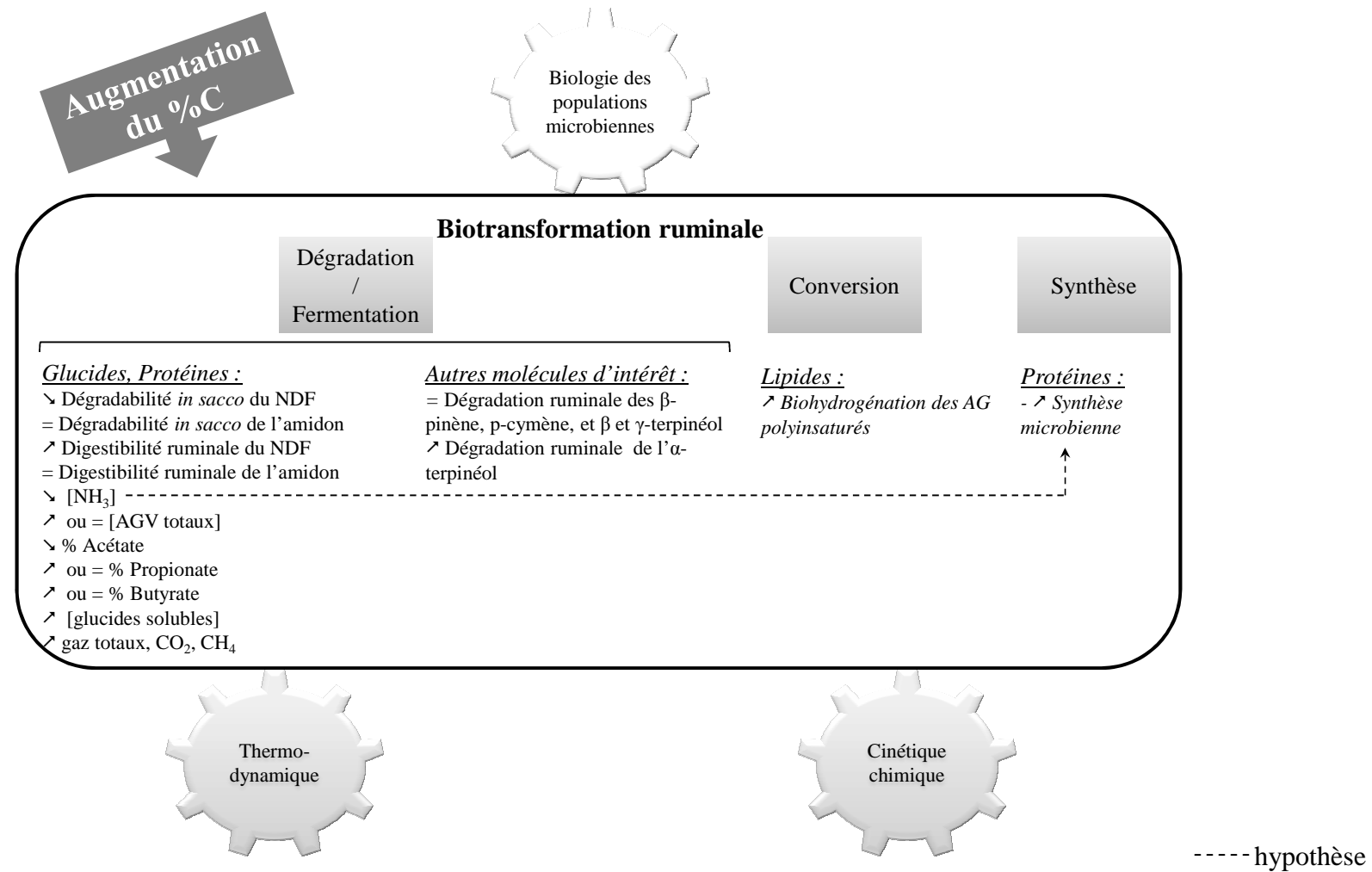


Figure 64 : Résumé de l'effet du pourcentage de concentrés sur la biotransformation ruminale.

III. Relation avec l'animal-hôte : comportement d'ingestion, performances animales et qualité des produits

III.1. Ingestion et comportement d'ingestion

Dans l'essai *in vivo*, l'augmentation du pourcentage de concentrés n'a pas influencé la MSI (**Figure 65**). Ces données ont été comparées graphiquement à celles de la base de données « chèvre-zootechinique » (**Etude bibliographique**). La relation intra-expérience entre la MSI et la proportion de concentrés incorporés dans la ration est curvilinéaire (**Figure 65**) : augmentation de l'ingestion (régulation physique) jusqu'à environ 50 % de concentrés, et limitation de l'ingestion (rétro-contrôle métabolique dominant) au-delà d'environ 50 % de concentrés. L'essai *in vivo* se situe « en équilibre » dans la zone de non-réponse au pourcentage de concentrés.

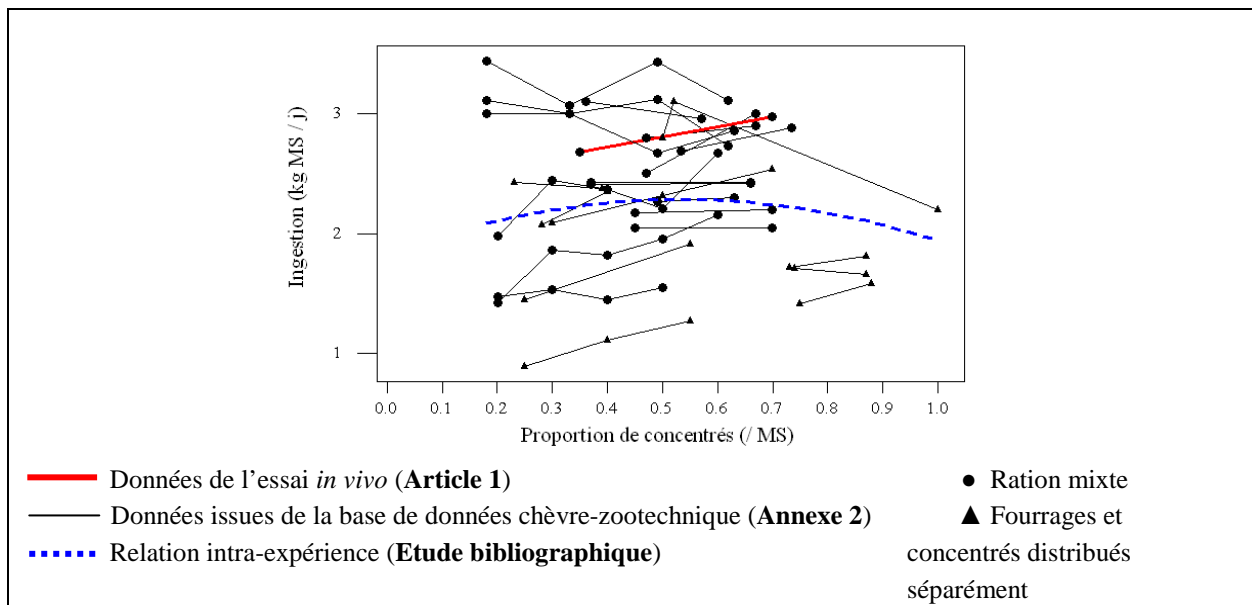


Figure 65 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur l'ingestion chez la chèvre laitière.

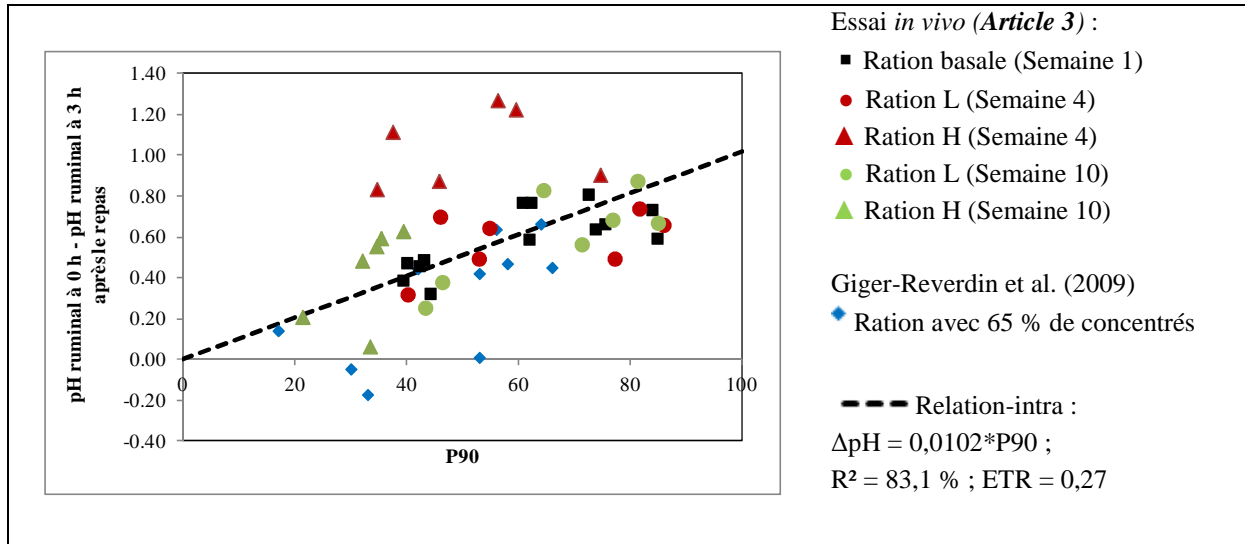
Le comportement d'ingestion des chèvres a été étudié en début et en fin de période de distribution des rations (semaines 4 et 10). L'augmentation du pourcentage de concentrés a eu très peu d'effet en début de période (réduction de la durée du premier repas), alors qu'en fin de période, les chèvres recevant le régime H semblent avoir fractionné leur ingestion en plusieurs repas par rapport aux chèvres recevant le régime L, ce qui est très cohérent avec l'étude d'Abijaoudé et al. (2000b). Cet essai a montré également que le comportement d'ingestion des animaux pouvait évoluer dans le temps de manière différente selon le régime considéré : les chèvres recevant le régime H, plus acidogène que le régime L, ont adapté leur comportement d'ingestion (diminution de la vitesse d'ingestion et de la MSI), alors que celle recevant le régime L, ont conservé le même comportement. Desnoyers et al. (2008b) ont

montré des résultats similaires chez des chèvres en acidose ou ayant été en acidose recevant un régime à 65 % de concentrés.

Une plus faible vitesse d'ingestion et le fractionnement des repas permettent, d'une part, des fermentations ruminales (production d'acides) plus étalées dans le temps, et d'autre part, une augmentation de la production de substances tampon due à une mastication et une salivation importantes. Ces éléments concourent à une limitation de la chute de pH. Cela expliquerait qu'entre les semaines 4 et 10, l'amplitude de la chute de pH ruminal ait été plus faible (voir partie II.1.1 a) de ce chapitre) chez les chèvres recevant le régime H. L'activité masticatoire n'ayant pas été mesurée dans l'essai *in vivo*, l'hypothèse d'une mastication plus importante n'a pas pu être validée, mais est grandement plausible.

Cet essai a permis également de confirmer la relation existant entre le pH ruminal et le comportement d'ingestion, précédemment montrée par Giger-Reverdin et al. (2009). La **Figure 66** décrit la relation entre la chute de pH entre 0 et 3 h après la distribution du repas et le paramètre P90. Pour déterminer cette relation, les données de l'essai *in vivo* (semaines 1, 4 et 10) et de l'étude de Giger-Reverdin et al. (2009) ont été rassemblées. La pente pour le régime H en semaine 4 semble différente de la pente générale, mais nous n'avons pas d'explication pour ce phénomène.

Pour conclure, les résultats observés sur le court terme (juste après l'habituation classique de 3 semaines à un régime) peuvent être différents des résultats observés sur le long terme (6 semaines après), à cause d'un comportement adaptatif (apprentissage ?) des animaux. Ainsi, même si ce n'est pas toujours réalisable du fait des coûts engendrés, réaliser des essais sur du long-terme est certainement plus adapté pour prendre en compte les comportements (et leurs éventuelles modifications) qui s'observent effectivement en élevage. De plus, les animaux ayant une vitesse d'ingestion rapide juste après la distribution du repas (P90 élevé) sont les animaux les plus susceptibles de présenter une chute de pH ruminal importante. En conséquence, si ces mangeurs « rapides » recevaient des régimes riches en concentrés, leur pH ruminal chuterait très fortement et ces animaux seraient plus sujets à l'acidose. Cela avait déjà été montré par Desnoyers et al. (2011) chez la chèvre laitière. D'un point de vue pratique, le comportement d'ingestion, et notamment un critère simple comme le paramètre P90, pourrait être utilisé pour prévenir l'incidence de l'acidose sub-clinique en élevage.



Remarque : le pH 3 h n'ayant pas été mesuré dans l'essai *in vivo*, la moyenne des valeurs de pH à 2 et 4 h a été utilisée.

Figure 66 : Relation entre la chute de pH ruminal entre 0 et 3 h après la distribution du repas et la proportion d'aliments ingérés 90 minutes (P90) après la distribution du repas chez la chèvre laitière.

III.2. Production laitière et qualité du lait

III.2.1 Production laitière

La PL a été significativement augmentée par l'accroissement du pourcentage de concentrés, en relation avec l'ingestion de MOD et d'énergie nette plus importante (+ 32 %) et, de ce fait, le bilan énergétique a été plus positif (0,43 vs. -0.06 ± 0.079 UFL / j) pour les chèvres recevant le régime H par rapport à celles recevant le régime L. Cette augmentation de la PL est cohérente avec la relation intra-expérience issue de la base de données « chèvre-zootechmique » (**Figure 67**).

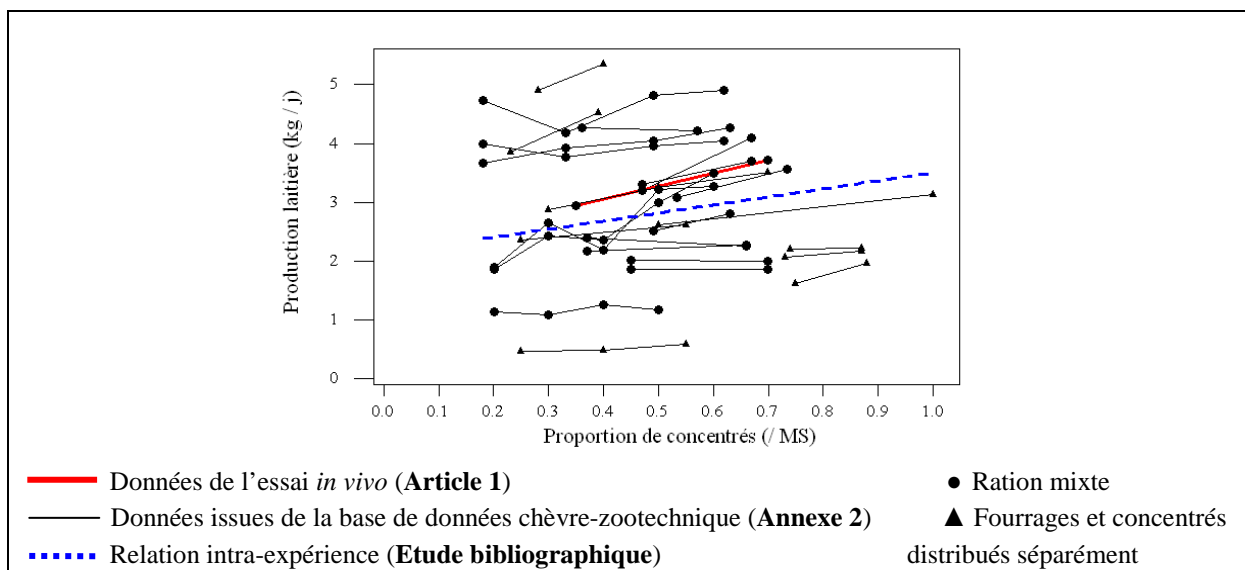


Figure 67 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur la production laitière chez la chèvre laitière.

III.2.2 TP et TB

La sécrétion de matières protéiques dans le lait a été significativement accrue par l'augmentation du pourcentage de concentrés, tandis que le TP n'a pas été modifié. Ces résultats sont assez cohérents avec les résultats issus de la base de données « chèvre-zootecnique » (**Figure 68a** et **Figure 68b**).

La plus forte sécrétion protéique dans le lait des chèvres recevant le régime H par rapport à celui des chèvres recevant le régime L pourrait être liée à une quantité d'énergie plus forte et à une synthèse de protéines microbiennes plus importante au niveau du rumen. Cette hypothèse est cohérente avec celle faite sur la concentration ruminale en $\text{NH}_3\text{-N}$ dans la partie II.1.1 de ce chapitre (captation de $\text{NH}_3\text{-N}$ plus forte avec le régime H qu'avec le L du fait de la croissance microbienne).

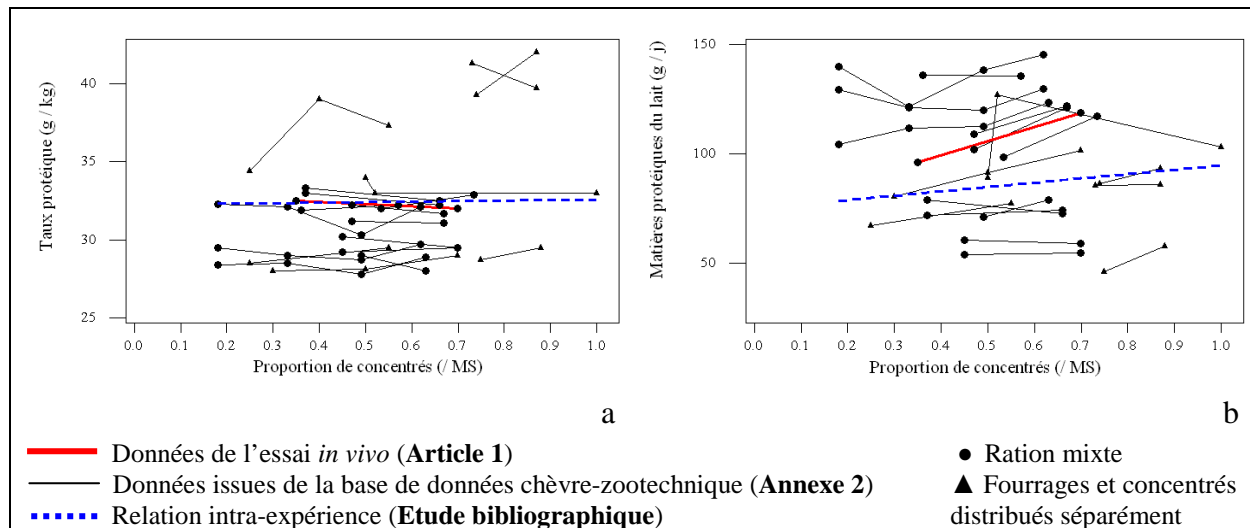


Figure 68 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur le taux protéique (a), et les matières protéiques du lait secrétées (b) chez la chèvre laitière.

Le TB a été significativement diminué et la quantité de MG sécrétée dans le lait non modifiée par l'augmentation du pourcentage de concentrés, ce qui est en accord avec les résultats de la base de données « chèvre-zootecnique » (**Figure 69a** et **Figure 69b**). La chute du TB est associée, dans cet essai, à une augmentation de la PL et à l'absence de variation de la quantité de MG sécrétée dans le lait, suggérant ainsi que la chute de TB serait majoritairement à relier à un effet de dilution de la MG dans le lait. Cet effet de dilution est à associer au niveau du lactose et des protéines, substances osmotiquement actives, pour lesquels il y a eu une augmentation de la sécrétion (g / j) et pas d'effet sur les taux (g / kg). L'absence de différence de la sécrétion de MG entre les deux régimes peut s'expliquer par l'absence du *trans*-10, *cis*-12 C18:2 et la faible augmentation du *trans*-10 C18:1 au niveau duodéal et dans le lait, connus pour être des inhibiteurs de la synthèse mammaire d'AG, même si la chèvre, comparativement à la vache, y est moins sensible (Shingfield et al., 2010).

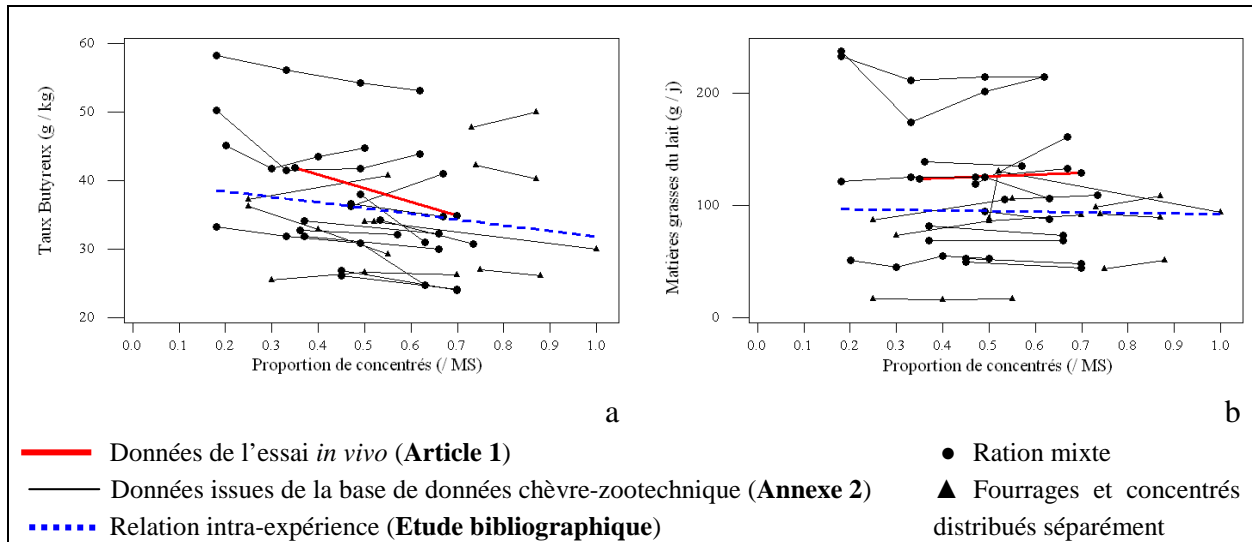


Figure 69 : Influence de la proportion de concentrés dans la ration sur le taux butyreux (a), et les matières grasses du lait sécrétées (b) chez la chèvre laitière.

III.2.3 Profil en AG du lait et relation avec les flux duodénaux d'AG

a) AG courts et moyens

Dans l'essai *in vivo*, la proportion en AG courts dans le lait n'a pas été modifiée (C4:0 et C6:0) ou a été augmentée (C8:0) par l'augmentation du pourcentage de concentrés incorporés dans la ration. Ce résultat est cohérent avec les données de la littérature chez les caprins (Calderon et al., 1984 ; LeDoux et al., 2002 ; Andrade et Schmidely, 2006 ; Schmidely et Andrade, 2011).

La proportion en AG moyens dans le lait est augmentée (C10:0, C12:0 et C14:0) ou diminuée (C16:0). Les données de la littérature (Calderon et al., 1984 ; LeDoux et al., 2002 ; Andrade et Schmidely, 2006 ; Schmidely et Andrade, 2011) ne sont pas concordantes quant aux variations des proportions de ces AG moyens chez la chèvre laitière dues au pourcentage de concentrés. Néanmoins, l'apport de sels de Ca d'huile de palme dans la ration L n'est pas sans conséquence sur la proportion de ces AG dans le lait du fait de la teneur en C16:0 de cette matière première. Les sels de Ca d'huile de palme sont également connus pour inhiber la synthèse mammaire des AG à chaînes moyennes (Chilliard et al., 1993 ; Teh et al., 1994).

b) AG avec 18 atomes de carbone

Nous avons étudié les relations entre les flux duodénaux d'AG avec 18 atomes de carbone (**Article 2**) et leur sécrétion dans le lait (**Article 1**) de l'essai *in vivo*.

C18 totaux

Le transfert des C18 totaux dans le lait à partir des flux duodénaux mesurés a été de l'ordre de 65 % dans l'essai *in vivo* (**Figure 70**). Cette relation passe par l'origine, probablement à cause d'une faible mobilisation des réserves corporelles (animaux en milieu de lactation). Nous avons comparé cette relation aux résultats de la thèse de P. Andrade (2006) (les seules données de flux duodénaux d'AG chez la chèvre laitière à notre disposition) et à la relation établie par Glasser et al. (2008a) par méta-analyse réalisée sur des données

chez la vache laitière. Andrade (2006) étudiait également l'effet du pourcentage de concentrés chez des chèvres laitières en milieu de lactation. Etant donnée leur faible plage de variation, la régression linéaire obtenue sur ces données est difficilement comparable à celle obtenue sur les nôtres. Le transfert des C18 totaux dans le lait à partir des flux duodénaux est de l'ordre de 85 % chez des vaches laitières alimentées avec des rations ayant une teneur en AG de moins de 30 g / kg MS (Glasser et al., 2008a) (**Figure 70**). Il est possible qu'une différence sur ce taux de transfert existe entre les espèces. Toutefois, notre possible surestimation des flux duodénaux pourrait également expliquer un taux de transfert différents entre vaches et chèvres laitières.

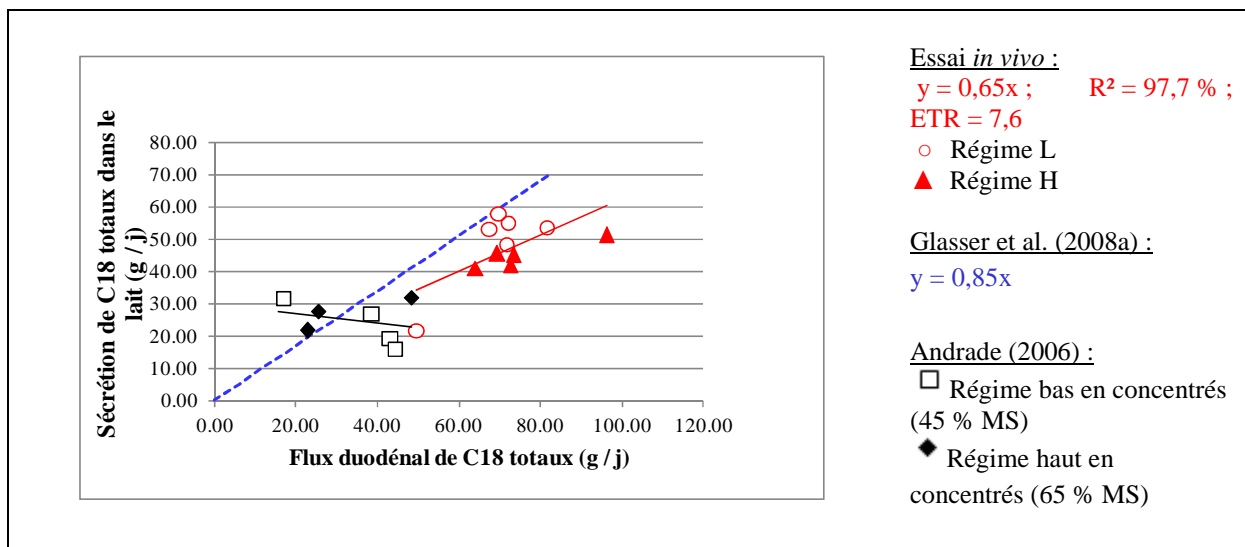


Figure 70 : Relation entre flux duodénaux de C18 totaux et leur sécrétion dans le lait (en g / j).

Acides linoléique et linoléinique

Les taux de transfert entre le flux duodéal (g / j) en *cis*-9, *cis*-12 C18:2 et *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3 et leur sécrétion dans le lait (g / j) étaient de 55 % (ETR = 0,57) et 46 % (ETR = 0,19), respectivement (ordonnées à l'origine nulles). L'effet du pourcentage de concentrés n'était pas significatif. Les relations pour le *cis*-9, *cis*-12 C18:2 (en % C18 totaux) sont en accord avec les données vaches laitières (pentes similaires) (**Figure 71a**), alors que ce n'est pas le cas pour le *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3 (et **Figure 71b**). Il existe peut-être un effet espèce sur le transfert de *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3 qui expliquerait le non-parallélisme de la « pentes chèvre » par rapport à la « pente vache » (**Figure 71b**), ce qui est en accord avec des comparaisons indirectes sur la réponse à l'apport de *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3 alimentaire entre chèvres et vaches (Chilliard et al., 2010).

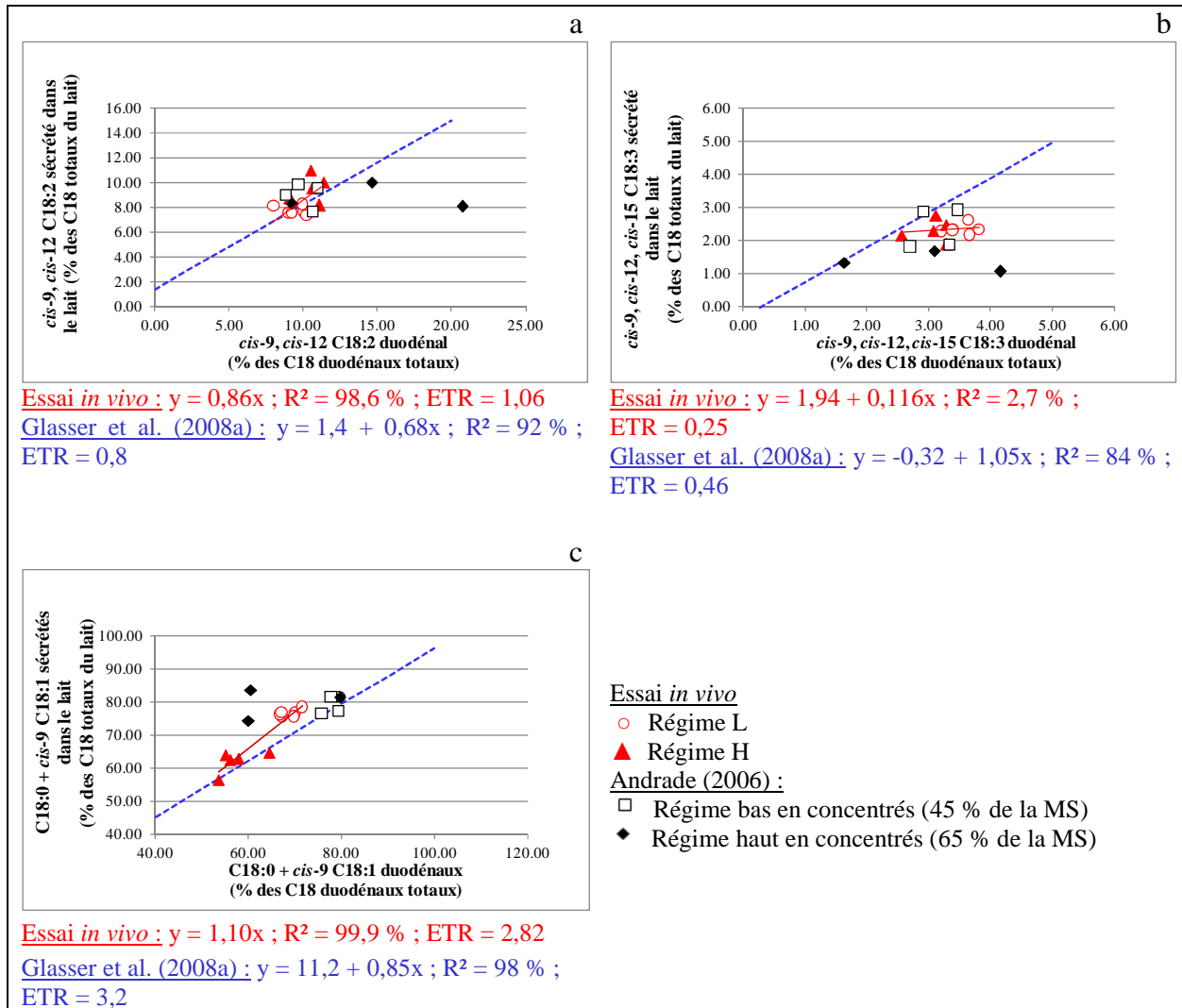


Figure 71 : Relation entre flux duodénaux d'acides gras (% de C18 duodénaux) et leur sécrétion dans le lait (en % de C18 sécrétés dans le lait) : cis-9, cis-12, cis-15 C18:3 (a) ; cis-9, cis-12 C18:2 (b), C18:0 et cis-9 C18:1 (c).

C18:0 et cis-9 C18:1

Le taux de transfert du couple C18:0 et cis-9 C18:1 (g / j) du duodénum vers le lait est de 72 % (ETR = 6,45 ; ordonnée à l'origine nulle). Il n'y a pas d'effet du régime sur cette relation. Ces deux AG ont été étudiés ensemble, car une part importante du cis-9 C18:1 du lait provient de la désaturation du C18:0 par la Δ^9 -désaturase au niveau de la glande mammaire. En effet, le C18:0 représentait environ 81 % du couple dans les flux duodénaux, alors qu'il ne représentait plus que 34 % dans le lait. Lorsqu'ils sont étudiés par rapport aux C18 totaux (**Figure 71c**), la régression chez la chèvre laitière est très proche de celle rencontrée chez la vache. La pente est de l'ordre de 1, ce qui signifie que la somme de ces AG du lait (%) est très proche de celle du duodénum.

C18:1 *trans* et isomères du C18:2

Le taux de transfert des AG *trans*-C18:1 totaux (g / j) entre le duodénum et le lait est de l'ordre de 43 % (ETR= 0,71 ; ordonnée à l'origine nulle). L'accroissement du pourcentage de concentrés a augmenté à la fois le flux duodénal et la sécrétion dans le lait de ces AG. Le pourcentage de concentrés a augmenté également la proportion en AG *trans* dans le lait, ce qui est en accord avec la littérature (Calderon et al., 1984 ; LeDoux et al., 2002 ; Andrade et Schmidely, 2006). Les taux de transfert (g / j) entre le duodénum et le lait pour le *trans*-10 C18:1 et le *cis*-9, *trans*-11 C18:2 associé au *trans*-11 C18:1 se situent entre 60 et 66 %. Lorsqu'ils sont étudiés par rapport aux C18 totaux (**Figure 72a** et **Figure 72b**), la régression chez la chèvre laitière est très proche de celle rencontrée chez la vache.

Le *cis*-9, *trans*-11 C18:2 est associé au *trans*-11 C18:1 (**Figure 72a**), car une partie du *trans*-11 C18:1 est désaturée par la Δ^9 -désaturase de la glande mammaire. Il est à noter que l'activité de la Δ^9 -désaturase n'est pas modifiée par le pourcentage de concentrés. En effet, les rapports *cis*-9 C18:1 / C18:0 (idem avec C14 et C16) et *cis*-9, *trans*-11 C18:2 / *trans*-11 C18:1, qui permet d'approximer cette activité, n'ont pas été modifiés par le pourcentage de concentrés.

Le *trans*-11 C18:1 est l'isomère *trans*-C18:1 majoritaire dans cette étude au niveau du duodénum et du lait et a été augmenté par le pourcentage de concentrés, ce qui est cohérent avec les profils en AG du lait rapportés chez la chèvre dans la littérature (LeDoux et al., 2002 ; Andrade et Schmidely, 2006 ; Schmidely et Andrade, 2011), tout en sachant que les rations utilisées dans ces différentes études avaient des teneurs modérées en amidon. Dans notre étude, l'augmentation du pourcentage de concentrés n'a pas induit de changement de la biohydrogénation ruminale des AG polyinsaturés vers la voie du *trans*-10, *cis*-12 C18:2 et *trans*-10 C18:1. Chez la vache laitière, la voie du *trans*-10 s'observe principalement avec des rations riches en amidon et / ou une supplémentation en huiles végétales ou de poisson (Bauman et Griinari, 2001 ; Shingfield et Griinari, 2007). Cette voie n'a probablement pas été observée dans notre étude du fait de la teneur très modérée en amidon des rations. De plus, il semble que cette voie soit plus faible chez la chèvre laitière que chez la vache. En effet, en combinant un régime avec une teneur en amidon de 23 % MS et de l'huile à 4,4 % MS, Ollier et al. (2009) n'ont pas détecté de *trans*-10, *cis*-12 C18:2 dans le lait et le *trans*-10 C18:1 représentait moins de 0,6 % des AG totaux. Il pourrait donc y avoir une différence de population microbienne ruminale entre la chèvre et la vache, et / ou une sensibilité différente des microorganismes à l'effet des régimes.

Pour conclure, même s'il est possible que nous ayons une légère surestimation des flux d'acides gras au niveau duodénal, notamment pour le régime L, les relations entre ces mêmes flux et les sécrétions d'AG du lait sont conformes aux résultats obtenus en méta-analyse sur vaches par Glasser et al. (2008a), à l'exception du *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3 qui pourrait constituer une particularité chèvre / vache. L'augmentation du pourcentage de concentrés n'a pas favorisé, lors des réactions de biohydrogénation ruminale, la voie du *trans*-10 pourtant souvent observée chez la vache laitière. Cela est peut-être dû à la faible teneur en amidon de nos régimes, et à une différence entre la chèvre et la vache au niveau microbien.

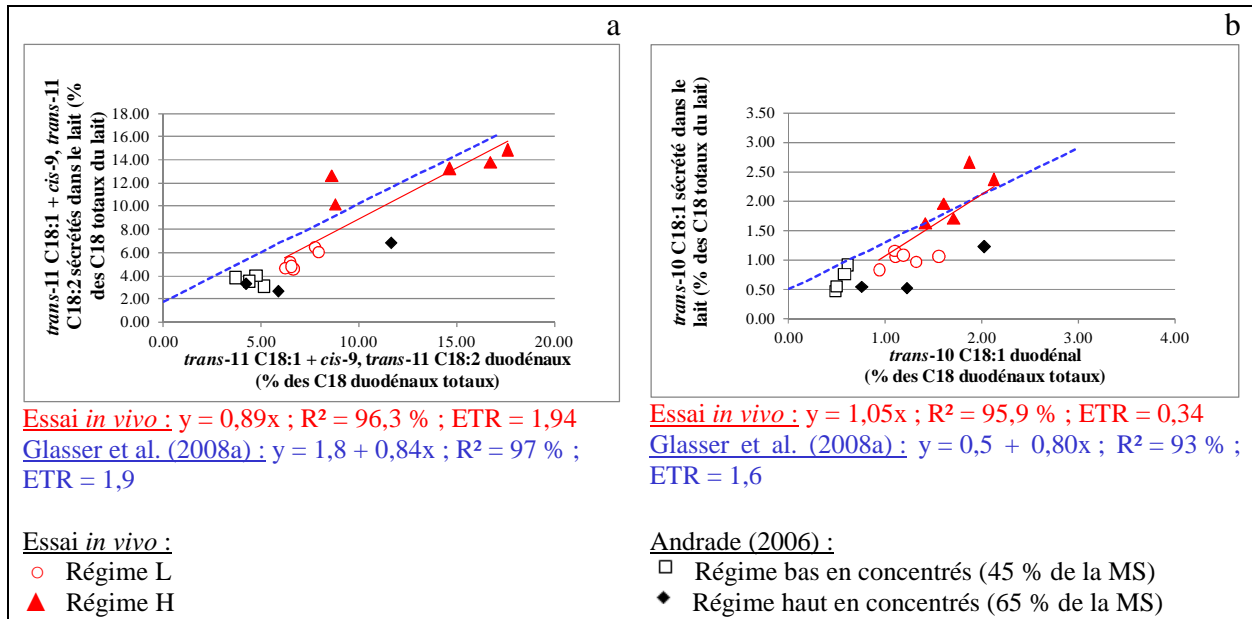


Figure 72 : Relation entre flux duodénaux de C18:1 *trans* (en % de C18 duodénaux) et leur sécrétion dans le lait (en % de C18 sécrétés dans le lait) : *trans-11 + cis-9, trans-11* (a), *trans 10* (b).

IV. Vers une définition de la capacité de biotransformation du rumen ?

La notion de biotransformation ruminale a structuré la démarche expérimentale. Les différentes réactions de biotransformation ont été étudiées séparément les unes des autres. Comme les métabolismes considérés ne sont pas indépendants, des liaisons entre les phénomènes sont apparues au moment de l'interprétation des résultats. L'agrégation de ces différents phénomènes pour définir les contours d'une « capacité de biotransformation » des différents types de rumen étudiés est par contre moins aisée. En effet, il est assez difficile de répondre à la question « quel est le type de rumen qui biotransforme le mieux ? », car suivant les molécules considérées, la réponse ne sera pas la même. Dans notre contexte expérimental, le « rumen L » biotransformerait mieux les constituants fibreux de la ration que le « rumen H », mais c'est l'inverse pour les AG, et pour les terpènes, il n'y a pas eu de différence, etc...

Traiter d'une capacité globale de biotransformation reviendrait à attribuer un coefficient à chacun des critères mesurés, selon le degré d'importance qu'on souhaite lui attribuer. Ce degré d'importance serait fortement conditionné par les objectifs à atteindre. Ces objectifs définiraient, en quelque sorte, un cahier des charges pour les critères ruminiaux et donc, pour la ration. Parmi les objectifs à atteindre, on peut citer la quantité et la qualité des produits, l'impact environnemental, ou la santé animale. Il faudrait également établir une hiérarchie des objectifs, car un critère amélioré pour répondre à un objectif donné peut dégrader d'autres critères qui pourraient être également intéressants. Par exemple, dans un objectif d'améliorer la qualité nutritionnelle du lait, et notamment sa teneur en AG, il faudrait diminuer la biohydrogénation ruminale des AG polyinsaturés, ce qui entraînerait une diminution de la

production de CH₄. Or, l'amélioration de ces critères serait défavorable à la dégradation des glucides, à la production d'AGV ruminiaux, et ainsi au métabolisme de l'animal et à sa production laitière. L'optimum choisi pour avoir une « bonne » capacité de biotransformation ruminale sera donc très subjectif et certainement différent suivant les acteurs de la filière. Le seul moyen non subjectif d'agréger ces phénomènes est leur représentation par la modélisation.

V. Approfondissement de la compréhension et la représentation de la thermodynamique du rumen et de la partition de carbone dans le rumen

V.1. Apport des essais *in vitro*

L'étude des stœchiométries des fermentations ruminales (**Article 4** et **Complément**) est un point-clé pour comprendre la partition du carbone (entre synthèse microbienne, AGV et gaz) et de l'H₂ moléculaire dans le rumen. Les essais *in vitro* sont très utiles pour effectuer ce type de bilans, car les productions d'AGV et de gaz sont plus facilement mesurées qu'en *in vivo*.

La production de gaz totaux et sa composition, ainsi que la production d'H₂ moléculaire ont été calculées à partir de la production d'AGV selon les relations classiques de la stœchiométrie. Notons qu'il existe quelques variantes de coefficients par rapport à ceux que nous avons utilisés. Nous avons notamment fait le choix de ne pas prendre en compte les AGV mineurs pour l'estimation de l'H₂ moléculaire. En effet, il ne semble pas y avoir de consensus sur le coefficient à appliquer aux AGV mineurs. Demeyer (1991) a proposé : « 2 iso valérate – 1 valérate », alors que Alemu et al. (2011) ont proposé « - 1 isobutyrate – 1 isovalérate ». Nous avons néanmoins testé ces 2 relations, sans trouver de différence avec un coefficient égal à 0, ce qui s'explique certainement par la très faible production des AGV mineurs par rapport aux autres AGV.

Les relations stœchiométriques utilisées dans l'**Article 4** et le **Complément** ont été en partie validées par la très bonne prédiction de la production de gaz totaux (pente non différente de 1), ce qu'avaient également observé Blümmel et al. (1999) avec 55 matières premières différentes à 24 h d'incubation. Les calculs réalisés ont montré l'importance de la contribution du gaz indirect (CO₂ issu de la réaction acido-basique entre les AGV produit et les bicarbonates du milieu) dans la production de gaz totaux (51,2 ± 2,60 % des gaz totaux). Blümmel et Orskov (1993) et Blümmel et al. (1999) avaient calculé une proportion de gaz indirect par rapport aux gaz totaux avec un ordre de grandeur similaire.

Nous avons observé une relation curvilinéaire entre la prédiction du CH₄ (estimation du H₂ moléculaire) et sa production réelle. Cette relation semble indiquer qu'une partie du H₂ moléculaire serait utilisée par d'autres puits que la production de CH₄ (biohydrogénation des AG, ...). Cela signifie que les coefficients choisis, traditionnellement utilisés dans la littérature, ne sont pas complètement appropriés pour prédire la production de CH₄. Un tel

plafonnement de la production de CH₄ a été montré *in vitro* par Navarro-Villa et al. (2011) et *in vivo* par Sauvart et al. (2011). De plus, lorsque l'H₂ moléculaire était très disponible dans le milieu la production d'H₂ sous forme gazeuse, même si ce flux est très faible, a été augmentée.

V.2. Apport du modèle *in vitro*

Dans l'**Etude bibliographique**, il a été montré qu'un certain nombre de faiblesses existe encore dans les modèles mécanistes du fonctionnement ruminal : détermination du pH, prédiction de la croissance microbienne et production de gaz. Parmi ces faiblesses, nous avons choisi de travailler plus particulièrement sur la détermination du pH et de la production de gaz (**Article 6**). Nous avons considéré le système « rumen » comme un système fermé de type fermenteur *in vitro* batch. Ce type de système permet de simplifier les conditions. Il y n'a pas d'« entrée » de nutriments ou de substances tampon et ni de « sortie » (absorption d'AGV et de NH₃-N, sortie de digesta, pas d'éructation de gaz, ...) à prendre en compte. De plus, la construction d'un tel modèle peut s'appuyer sur des études expérimentales au sein desquelles de nombreuses mesures ont été réalisées sur différents critères et notamment la production de gaz. Le système a été étudié en dynamique.

La détermination du pH du modèle mécaniste proposé repose sur l'équilibre de la réaction acido-basique se produisant entre les AGV produits (formes acide AH et basique A⁻) et le bicarbonate de la solution tampon (couple CO₂ / HCO₃⁻). Quand il y a production d'AGV (forme acide), les concentrations des autres espèces (A⁻, CO₂ et HCO₃⁻) varient en conséquence pour atteindre à nouveau l'équilibre. L'hypothèse qui a été retenue dans l'**Article 6**, est qu'à chaque pas de temps (la minute), ces espèces chimiques sont en équilibre. Cette approche est voisine de celle proposée par Imamidoost et Cant (2005). Néanmoins, ce qui est proposé dans l'**Article 6**, est décrit entièrement et peut être facilement transposable à d'autres modèles, alors que la façon dont procèdent Imamidoost et Cant (2005) (itération de Newton-Raphson) n'est pas assez documentée pour être utilisable directement par un lecteur. De plus, notre approche élimine la présence d'un compartiment « H₃O⁺ » qui ferait le lien entre les AGV et les bicarbonates. C'est ce qu'avait représenté Offner et Sauvart (2006) dans leur modèle thermodynamique de rumen. Mais, du fait de sa petite taille et de son turn-over rapide, la présence d'un tel compartiment était problématique, en termes d'instabilité du modèle.

Dans notre proposition, le pH est calculé toutes les minutes en fonction de la concentration des espèces à l'équilibre (application de l'équation d'Henderson et d'Hasselbach soit au couple AH / A⁻ soit au couple CO₂ / HCO₃⁻). Dans la littérature, le pH est très souvent déterminé par des équations empiriques (**Etude bibliographique**), à l'exception d'Imamidoost et Cant (2005) et d'Offner et Sauvart (2006). Le modèle simule une diminution du pH avec le temps observée expérimentalement par Maaroufi et al. (2009), ce qui est un progrès par rapport à ce qu'avaient obtenu Offner et Sauvart (2006). Néanmoins, cette chute est beaucoup plus importante que celle observée expérimentalement (Maaroufi et

al., 2009). Une analyse de sensibilité sur la concentration initiale en bicarbonate a montré qu'en augmentant cette concentration de 47 %, le pH se rapprochait des valeurs observées.

Il faut noter que la concentration de bicarbonate initiale choisie dans le modèle, avait été calculée en ajoutant la quantité de phosphates de la solution tampon à la quantité de bicarbonates, pour prendre en compte tous les tampons du milieu. Parmi les voies d'amélioration du modèle, il pourrait être envisagé d'ajouter une partie « phosphates » à la partie « bicarbonates ». En effet, les phosphates, lorsqu'ils réagissent avec les AGV ne produisent pas de gaz. En confondant les phosphates avec les bicarbonates, la production théorique de CO₂ est certainement augmentée. L'ajout d'une partie « phosphates » serait facilité par des études expérimentales supplémentaires ou à rechercher dans la littérature avec des solutions tampons contenant ou non des phosphates.

Le sous-système « pH » du modèle a été relié à la production de gaz. La production de gaz a eu deux origines : directe et indirecte. Cette distinction de l'origine des gaz est importante à considérer dans un système *in vitro* batch, car plus de 50 % des gaz produits correspondraient au gaz indirect (**Complément**). La production de gaz a été modélisée de façon plus mécaniste par Offner et Sauvant (2006), en s'appuyant sur les relations de stoechiométrie de formation des AGV (acétate, butyrate). Imamidoost et Cant (2005) n'ont, par contre, pas modélisé la production de gaz. La détermination de la production de gaz directs de l'**Article 6** nécessiterait un approfondissement, car elle reste assez empirique avec l'application d'un taux de production de gaz empirique et une partition entre le CO₂ et CH₄ fixée *a priori* et non dépendante du temps. Notons que le ratio entre CO₂ et CH₄ mesuré dans les **Articles 4** et **5** évolue dans le temps, ce qui montre que la dernière hypothèse est invalidée. Le modèle présenté a été calibré à partir de données qui ne comprenaient ni le profil en AGV, ni la composition des gaz (Maaroufi et al., 2009). En conséquence, il était assez difficile de proposer un développement plus mécaniste du modèle que celui présenté. Néanmoins, les données des **Articles 4** et **5** offrent des perspectives très intéressantes, car tous les éléments manquants (profil en AGV et composition en gaz) ont été mesurés. Ainsi un travail sur la détermination du profil en AGV et la partition entre le CO₂ et le CH₄ serait à envisager dans une prochaine version du modèle. Cependant, ce type de travail risque d'être difficile, car la prédiction mécaniste du profil en AGV est un des points de faiblesse souvent rencontré dans les modèles de rumen (**Etude bibliographique**).

Le modèle présente le transfert des gaz produits en milieu aqueux vers la phase gazeuse, aspect, à notre connaissance, jamais rencontré dans la littérature. Le transfert, exprimé à travers l'application de la loi de Henry, permet de traduire un temps de latence dans la production de gaz (« lag phase »). Cependant, celui-ci ne dépend sans doute pas que de ce phénomène, mais aussi d'une phase d'adaptation des microbes par exemple.

Le modèle proposé est un modèle d'étude de la détermination du pH et des gaz. Sa vocation n'était pas de représenter l'ensemble des réactions de biotransformation ruminale. La partie physico-chimique s'appuie sur une partie « biologique » qui résume simplement les flux d'azote entre les protéines, les peptides, le NH₃-N et la croissance microbienne, ainsi que

les flux de carbone entre les constituants du substrat (fibres et glucides non fibreux), les glucides solubles et les AGV totaux. Les relations entre flux d'azote et de carbone sont gérées grâce à un compartiment « production d'énergie » (ATP qui permet la croissance microbienne). Cette partie « biologique » est très simplifiée par rapport aux modèles de rumen existants (**Etude bibliographique**), mais son but était de servir de support à la partie physico-chimique. Il n'en reste pas moins que cette partie simplifiée permet de simuler correctement des variations observées expérimentalement, en particulier le phénomène d'épaule observé dans la cinétique de la concentration en $\text{NH}_3\text{-N}$ lorsque l'azote devient limitant par rapport à l'énergie disponible.

En conclusion, cette partie « physico-chimique » du modèle proposé présente des résultats prometteurs. Des améliorations ou des développements sont envisagés (profil en AGV, phosphates, partition plus mécaniste entre le CO_2 et le CH_4). Cette approche pourrait être assez aisément intégrée dans les modèles mécanistes de rumen *in vivo* de plus grande envergure déjà existants.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de ce travail était d'étudier comment des facteurs alimentaires (pourcentage de concentrés de la ration, supplémentation en huile) pouvaient induire des modifications du fonctionnement du rumen et, ainsi, certaines des biotransformations s'y déroulant.

In vivo, une caractérisation assez complète des animaux a été réalisée sur différents paramètres (ruminiaux, plasmatiques, zootechniques, comportementaux et portant sur la qualité des produits) mesurés simultanément sur des échelles de temps rapprochés (dynamiques postprandiales) ou de plus long terme (plusieurs semaines). Avoir une telle diversité de mesures issues d'une même expérimentation reste assez rare dans la littérature, surtout chez la chèvre laitière, et constitue une première approche de phénotypage des animaux. De plus, cela a permis de confirmer des hypothèses ou de trouver des explications à certains faits observés : conséquences de phénomènes ruminiaux sur l'animal-hôte et inversement.

- A notre connaissance, il n'existe pas de mesures publiées de flux duodénaux d'AG dans la littérature chez les caprins. Ces mesures nous ont permis d'expliquer largement la composition en AG du lait. En outre, la comparaison entre les chèvres et les vaches laitières des taux de transfert apparent des AG duodénaux dans la matière grasse du lait a montré une forte similarité entre les deux espèces, à l'exception du *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3.
- De plus, l'augmentation du pourcentage de concentrés a accru la teneur en *trans*-11 C18:1 dans les contenus duodénaux. Cependant, contrairement à ce qui est souvent rapporté chez la vache laitière, l'augmentation du pourcentage de concentrés n'a pas favorisé la voie du *trans*-10. Cela est peut être lié à la faible teneur en amidon de nos régimes. Néanmoins, ces résultats et ceux de la littérature semblent indiquer une différence chèvre / vache qui pourrait être attribuée à des différences au niveau ruminal en termes de relation animal-microbiote, de types de populations microbiennes et / ou de sensibilité de ces populations au régime. De nouvelles expérimentations pourraient être envisagées pour pouvoir examiner cette différence. Par exemple, des essais *in vitro* pourraient être conçus, pour « screener » différents types de régimes avec des teneurs en amidon différentes, supplémentés ou non par des AG polyinsaturés, en comparant des jus de rumen provenant de vaches et de chèvres laitières.
- La plus forte sécrétion protéique dans le lait, observée avec l'accroissement du pourcentage de concentrés, pourrait être liée à une synthèse protéique microbienne augmentée grâce à l'accroissement d'énergie disponible de la ration (MOF) et une captation plus importante de NH₃-N dans le milieu ruminal, suggérée par la plus faible concentration ruminale en NH₃-N observée aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*.
- Le suivi des animaux sur du long terme (6 semaines) a permis d'identifier certaines adaptations de comportements d'ingestion des animaux (diminution de la vitesse d'ingestion, fractionnement des repas) liées à leur régime (avec un régime riche en concentrés), et cela, certainement indépendamment de l'avancée en stade de lactation,

traduisant peut-être un rétro-contrôle des phénomènes ruminiaux (concentrations en AGV, pression osmotique) sur l'ingestion. Ces adaptations de la dynamique d'entrée des substrats ont eu pour conséquences des modifications des phénomènes digestifs ruminiaux, et notamment au niveau de la chute postprandiale de pH. Les expérimentations où les mesures sont réalisées sur du court terme, juste après la période d'habituation au régime expérimental ou après des challenges nutritionnels, ne permettent pas d'identifier ce type d'adaptation du comportement, qui s'expriment pourtant sur le terrain.

La forte variabilité du comportement d'ingestion observée avec des animaux alimentés avec un régime identique suggère, pour de prochains travaux expérimentaux, la nécessité d'en tenir compte lors de l'allotement des animaux, en équilibrant des animaux ingérant rapidement et lentement au sein des lots. En effet, la non prise en compte du comportement d'ingestion au moment de l'allotement pourrait biaiser les résultats, du fait de son influence sur les paramètres fermentaires. De plus, du fait de la relation linéaire entre la vitesse d'ingestion et la chute de pH ruminal, les animaux mangeant rapidement sont les animaux les plus enclins à présenter des épisodes d'acidose s'ils reçoivent des rations riches en concentrés. Une prise en compte des vitesses individuelles d'ingestion pourrait permettre de limiter l'occurrence de l'acidose en élevage, comme cela a été suggéré dans des précédentes études.

La comparaison des résultats *in vivo* / *in vitro* a montré que les intensités et les dynamiques de réactions mesurées *in vitro* étaient difficilement extrapolables à l'*in vivo*. Les sens de variation des réactions *in vitro* étaient par contre en cohérence avec ceux observés *in vivo*. Les études *in vitro* ont été réalisées avec des inocula issus d'animaux qui étaient habitués aux régimes, ce qui est assez original par rapport à la littérature et a permis d'extrapoler le sens des réactions entre l'*in vitro* et l'*in vivo*.

Les données issues de ces études ont permis de s'intéresser aux relations qui régissent la partition des chaînes carbonées entre les AGV, la biomasse et les gaz, en sachant que ces trois voies n'ont pas la même signification agronomique. Elles ont servi également à s'intéresser au métabolisme de l'hydrogène. Il a notamment été montré que la production de CH₄ mesurée semblait saturée quand l'H₂ moléculaire était très disponible dans le milieu, suggérant une utilisation de cette molécule par d'autres puits d'H₂ moléculaires que le CH₄ (biohydrogénation des AG même si mineure, acétogénèse ?). Ainsi les coefficients stœchiométriques classiquement utilisés dans la littérature ne sont pas complètement validés par les calculs sur les résultats de nos essais.

Les biotransformations ruminales sont pilotées par 3 forces motrices majeures : les lois de la thermodynamique, celles des cinétiques, et celles des dynamiques de populations microbiennes. Nous nous sommes concentrés sur les aspects biochimiques mesurables (thermodynamique, cinétique enzymatique). Les aspects microbiens n'ont été abordés qu'au travers des résultantes de leur métabolisme. De nombreuses hypothèses ont été faites pour expliquer les différences observées entre les rumens étudiés, sans pouvoir être vérifiées : type de populations en présence, croissance des microorganismes... De plus, outre le

comportement de l'animal-hôte, l'écosystème microbien et son fonctionnement pourraient être une source de variabilité individuelle importante. La génomique appliquée à l'écosystème microbien dans son ensemble (métagénomique) se développe depuis plusieurs années et offre des perspectives intéressantes pour avoir une vision globale du fonctionnement de l'écosystème ruminal. Il y a néanmoins de nombreux progrès à faire dans ce domaine pour obtenir des informations utilisables. A plus court terme, ces techniques pourront permettre d'avoir une vision partielle de certaines voies métaboliques et une meilleure connaissance des groupes de microbes impliqués dans certaines fonctions ou voies métaboliques.

La modélisation mécaniste a constitué la troisième approche utilisée dans ce travail de thèse. Le modèle proposé est un modèle de fermenteur *in vitro* batch dans lequel nous avons choisi de nous focaliser plus particulièrement sur la détermination du pH et de la production de gaz, point de faiblesse de tous les modèles de rumen publiés. De nombreuses perspectives sont à envisager pour améliorer ce modèle : ajout d'une partie simulant les réactions avec les phosphates, détermination du profil en AGV et de la partition entre CO₂ et CH₄. Les essais *in vitro* réalisés au cours de cette thèse fournissent un ensemble de données très complet qui pourra aider à donner de la cohérence à ce développement. De plus, les acquis déjà réalisés peuvent être ajoutés à des modèles mécanistes de rumen existants.

Le concept de biotransformation ruminale a structuré notre démarche. L'agrégation des différentes réactions étudiées individuellement au niveau expérimental (dégradation, synthèse et conversion de molécules) pourrait permettre de définir les contours d'un concept systémique autour de la « capacité de biotransformation » des rumens étudiés. Cette définition devrait passer par l'établissement d'une hiérarchie des paramètres mesurés en fonction de leur apport pour répondre à des objectifs pratiques (production, qualité des produits, impact environnemental, santé animale), qui seraient également à hiérarchiser. L'optimum choisi pour avoir une « bonne » capacité de biotransformation ruminale sera donc très subjectif et certainement différent suivant les acteurs de la filière. Cette voie semble donc difficile à mettre en place. La modélisation paraît être le meilleur moyen pour associer et intégrer les biotransformations observées lors d'expérimentations et cela indépendamment des objectifs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(hors articles)

- Abe, M., Shibui, H., Iriki, T., Kumeno, F., 1973. Relation between diet and protozoal population in the rumen. *Br. J. Nutr.*, 29, 197-202.
- Abijaoudé, J. A., Morand-Fehr, P., Tessier, J., Schmidely, P., Sauvant, D., 2000a. Influence of forage:concentrate ratio and type of starch in the diet on feeding behaviour, dietary preferences, digestion, metabolism and performance of dairy goats in mid lactation. *Anim. Sci.*, 71, 359-368.
- Abijaoudé, J. A., Morand-Fehr, P., Tessier, J., Schmidely, P., Sauvant, D., 2000b. Diet effect on the daily feeding behaviour, frequency and characteristics of meals in dairy goats. *Livest. Prod. Sci.*, 64, 29-37.
- Adesogan, A. T., Krueger, N. K., Kim, S. C., 2005. A novel, wireless, automated system for measuring fermentation gas production kinetics of feeds and its application to feed characterization. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 123-124, 211-223.
- Agence française de sécurité sanitaire des aliments, 2000. Rapport du groupe de travail « alimentation animale et sécurité sanitaire des aliments ». 177 p., AFSSA, Maisons-Alfort, France.
- Agreste, 2011. Graphagri France, Productions animales, http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf_Gaf11p138-156.pdf. Consulté le 15 mars 2012.
- Aguerre, M. J., Wattiaux, M. A., Powell, J. M., Broderick, G. A., Arndt, C., 2011. Effect of forage-to-concentrate ratio in dairy cow diets on emission of methane, carbon dioxide, and ammonia, lactation performance, and manure excretion. *J. Dairy Sci.*, 94, 3081-3093.
- Alemu, A. W., Dijkstra, J., Bannink, A., France, J., Kebreab, E., 2011. Rumen stoichiometric models and their contribution and challenges in predicting enteric methane production. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 166-167, 761-778.
- Allen, M. S., 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 83, 1598-1624.
- Allison, M. J., 1969. Biosynthesis of amino acids by ruminal microorganisms. *J. Anim. Sci.*, 29, 797-807.
- AlZahal, O., Kebreab, E., France, J., McBride, B. W., 2007. A mathematical approach to predicting biological values from ruminal pH measurements. *J. Dairy Sci.*, 90, 3777-3785.
- Andrade, P. V. D., Giger-Reverdin, S., Sauvant, D., 2002. Relation entre deux paramètres (pH et potentiel redox) caractérisant l'état du rumen. Effet de la nature de la ration. *Renc. Rech. Rum.*, 9, 332.
- Andrade, P. V. D., 2006. Influence du pourcentage de concentré et de l'apport lipidique sur les flux duodénaux de lipides et sur la composition de la matière grasse laitière en réponse à l'infusion de t10,c12-CLA chez la chèvre laitière. Thèse de doctorat, Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris, France.
- Andrade, P. V. D., Schmidely, P., 2006. Influence of percentage of concentrate in combination with rolled canola seeds on performance, rumen fermentation and milk fatty acid composition in dairy goats. *Livestock Science*, 104, 77-90.
- Archimède, H., Sauvant, D., Hervieu, J., Ternois, F., Poncet, C., 1996. Effects of the nature of roughage and concentrate and their proportion on ruminal characteristics of non lactating goats, consequences on digestive interactions. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 58, 267-282.
- Archimède, H., Sauvant, D., Schmidely, P., 1997. Quantitative review of ruminal and total tract digestion of mixed diet organic matter and carbohydrates. *Reprod. Nutr. Develop.*, 37, 173-189.

- Argyle, J. L., Baldwin, R. L., 1988. Modeling of rumen water kinetics and effects of rumen pH changes. *J. Dairy Sci.*, 71, 1178-1188.
- Aufrère, J., Demarquilly, C., 1989. Predicting organic matter digestibility of forage by two pepsin-cellulase methods., Proceedings of the XVIth International Grassland Congress, p 877-878, Nice, France.
- Babcock Institute, 2011. <http://babcock.wisc.edu/node/126>. Wisconsin University, USA. Consulté le 30 mars 2012.
- Bailey, C. B., Balch, C. C., 1961. Saliva secretion and its relation to feeding in cattle, 2. The composition and rate of secretion of mixed saliva in the cow during rest. *Br. J. Nutr.*, 15, 383-401.
- Baldwin, R. L., Lucas, H. L., Carbrera, R., 1970. Energetic relationships in the formation and utilization of fermentation end-products. In: Phillipson, A. T. et al. (eds.), *Physiology of digestion and metabolism in the ruminant*, p 319-334. Oriel Press, Newcastle-upon-Tyne, UK.
- Baldwin, R. L., Koong, L. J., Ulyatt, M. J., 1977. A dynamic model of ruminant digestion for evaluation of factors affecting nutritive value. *Agric. Syst.*, 2, 255-288.
- Baldwin, R. L., Thornley, J. H. M., Beaver, D. E., 1987. Metabolism of the lactating cow. II. Digestive elements of a mechanistic model. *J. Dairy Res.*, 54, 107-131.
- Bannink, A., de Visser, H., 1997. Comparison of mechanistic rumen models on mathematical formulation of extramicrobial and microbial processes. *J. Dairy Sci.*, 80, 1296-1314.
- Bannink, A., de Visser, H., van Vuuren, A. M., 1997. Comparison and evaluation of mechanistic rumen models. *Br. J. Nutr.*, 78, 563-581.
- Bannink, A., Dijkstra, J., Mills, J. A. N., Kebreab, E., France, J., 2005. Nutritional strategies to reduce enteric methane formation in dairy cows. In: Kuczynski, T., Dämmgen, U., Webb, J., Myczko, A. (eds.), *Emissions from European agriculture*, p 367-376. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.
- Bannink, A., Kogut, J., Dijkstra, J., France, J., Kebreab, E., van Vuuren, A. M., Tamminga, S., 2006. Estimation of the stoichiometry of volatile fatty acid production in the rumen of lactating cows. *J. Theor. Biol.*, 238, 36-51.
- Bannink, A., 2007. Modelling volatile fatty acid dynamics and rumen function in lactating cows. PhD Dissertation, Wageningen University, Wageningen, the Netherlands.
- Barry, T. N., Thompson, A., Armstrong, D. G., 1977. Rumen fermentation studies on two contrasting diets. 1. Some characteristics of the *in vivo* fermentation, with special reference to the composition of the gas phase, oxidation/reduction state and volatile fatty acid proportions. *J. Agric. Sci. Camb.*, 89, 183-195.
- Bartley, E. E., Davidovich, A. D., Barr, G. W., Griffel, G. W., Dayton, A. D., Deyoe, C. W., Bechtle, R. M., 1976. Ammonia toxicity in cattle. I. Rumen and blood changes associated with toxicity and treatment methods. *J. Anim. Sci.*, 43, 835-841.
- Bauer, M. L., Herold, D. W., Britton, R. A., Stock, R. A., Klopfenstein, T. J., Yates, D. A., 1995. Efficacy of laidlomycin propionate to reduce ruminal acidosis in cattle. *J. Anim. Sci.*, 73, 3445-3454.
- Bauman, D. E., Griinari, J. M., 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livestock Production Science*, 70, 15-29.
- Bauman, D. E., Harvatine, K. J., Lock, A. L., 2011. Nutrigenomics, rumen-derived bioactive fatty acids, and the regulation of milk fat synthesis. *Annu. Rev. Nutr.*, 31, 299-319.
- Baumont, R., 1988. Cinétique d'ingestion lors du grand repas chez le mouton : influence du temps d'accès au foin et de son ingestibilité. *Reprod. Nutr. Develop.*, 28, 183-184.
- Beam, T. M., Jenkins, T. C., Moate, P. J., Kohn, R. A., Palmquist, D. L., 2000. Effects of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. *J. Dairy Sci.*, 83, 2564-2573.

- Beauchemin, K. A., Yang, W. Z., Morgavi, D. P., Ghorbani, G. R., Kautz, W., Leedle, J. A. Z., 2003. Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical acidosis in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.*, 81, 1628-1640.
- Beauchemin, K. A., Kreuzer, M., O'Mara, F., McAllister, T. A., 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Aust. J. Exp. Agric.*, 48, 21-27.
- Beauchemin, K. A., McAllister, T. A., McGinn, S. M., 2009. Dietary mitigation of enteric methane from cattle, *CAB Reviews: Perspectives in Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Res.* No. 4, p 1-18. CABI, Wallingford, UK.
- Benchaar, C., Rivest, J., Pomar, C., Chiquette, J., 1998. Prediction of methane production from dairy cows using existing mechanistic models and regression equations. *J. Anim. Sci.*, 76, 617-627.
- Bennink, M. R., Tyler, T. R., Ward, G. M., Johnson, D. E., 1978. Ionic milieu of bovine and ovine rumen as affected by diet. *J. Dairy Sci.*, 61, 315-323.
- Bergen, W. G., 1972. Rumen osmolality as a factor in feed intake control of sheep. *J. Anim. Sci.*, 34, 1054-1060.
- Bergman, E. N., 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol. Rev.*, 70, 567-590.
- Bernard, L., Leroux, C., Chilliard, Y., 2008. Expression and nutritional regulation of lipogenic genes in the ruminant lactating mammary gland. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 606, 67-108.
- Beuvink, J. M. W., Spoelstra, S. F., 1992. Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms *in vitro*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 505-509.
- Beuvink, J. M. W., Spoelstra, S. F., Hogendorp, R. J., 1992. An automated method for measuring time-course of gas production of feedstuff incubated with buffered rumen fluid. *Neth. J. Agric. Sci.*, 40, 401-407.
- Bhatti, S. A., Firkins, J. L., 1995. Kinetics of hydration and functional specific gravity of fibrous feed by-products. *J. Anim. Sci.*, 73, 1449-1458.
- Blanchart, G., Durand, M., Barry, J.-L., Bouillet-Oudot, M., Jouany, J.-P., 1989. Intérêts et limites des fermenteurs à flux semi-continu, de type Rusitec dans l'étude des fermentations du rumen. *Ann. Zootech.*, 38, 285-314.
- Blümmel, M., Ørskov, E. R., 1993. Comparison on *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 40, 109-119.
- Blümmel, M., Becker, K., 1997. The degradability characteristics of fifty-four roughages and roughage neutral-detergent fibres as described by *in vitro* gas production and their relationship to voluntary feed intake. *Br. J. Nutr.*, 77, 757-768.
- Blümmel, M., Aiple, K. P., Steingass, H., Becker, K., 1999. A note on the stoichiometrical relationship of short chain fatty acid production and gas formation *in vitro* in feedstuffs of widely differing quality. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 81, 157-167.
- Blümmel, M., Karsli, A., Russell, J. R., 2003. Influence of diet on growth yields of rumen micro-organisms *in vitro* and *in vivo*: influence on growth yield of variable carbon fluxes to fermentation products. *Br. J. Nutr.*, 90, 625-634.
- Bobe, G., Young, J. W., Beitz, D. C., 2004. Pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 87, 3105-3124.
- Bouvier, J. C., 1977. Etude descriptive des cinétiques des échanges gazeux du mouton. Influence de la nature de la ration, du niveau d'alimentation et des phénomènes digestifs. Thèse de doctorat, Clermont II, cités par Vermorel (1995).

- Broberg, A. G., 1958. Measurement of redox potential in rumen contents. IV. *In vivo* measurements. Nord. Vet. Med., 10, 263-268.
- Brossard, L., Martin, C., Chauveyras-Durand, F., Michalet-Doreau, B., 2004. Protozoa involved in butyric rather than lactic fermentative pattern during latent acidosis in sheep. Reprod. Nutr. Develop., 44, 195-206.
- Brossard, L., Chauveyras-Durand, F., Michalet-Doreau, B., Martin, C., 2006. Dose effect of live yeasts on rumen microbial communities and fermentations during butyric latent acidosis in sheep: new type of interaction. Anim. Sci., 82, 829-836.
- Broudiscou, L. P., Papon, Y., Fabre, M., Broudiscou, A. F., 1997. Maintenance of rumen protozoa populations in a dual outflow continuous fermenter. J. Sci. Food Agric., 75, 273-280.
- Brown, V. E., Rymer, C., Agnew, R. E., Givens, D. I., 2002. Relationship between *in vitro* gas production profiles of forages and *in vivo* rumen fermentation patterns in beef steers fed those forages. Anim. Feed Sci. Technol., 98, 13-24.
- Calabro, S., Moniello, G., Piccolo, V., Bovera, F., Infascelli, F., Tudisco, R., Cutrignelli, M. I., 2008. Rumen fermentation and degradability in buffalo and cattle using the *in vitro* gas production technique. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr., 92, 356-362.
- Calderon, I., Peters, E. J. d., Smith, N. E., Franke, A. A., 1984. Composition of goat's milk: changes within milking and effects of a high concentrate diet. J. Dairy Sci., 67, 1905-1911.
- Cantalapiedra-Hijar, G., Yanez-Ruiz, D. R., Martin-Garcia, A. I., Molina-Alcaide, E., 2009. Effects of forage:concentrate ratio and forage type on apparent digestibility, ruminal fermentation, and microbial growth in goats. J. Anim. Sci., 87, 622-631.
- Carter, R. R., Grovum, W. L., 1990. A review of the physiological significance of hypertonic body fluids on feed intake and ruminal function : salivation, motility and microbes. J. Anim. Sci., 68, 2811-2832.
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F., Kjelleberg, S., 2007. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. Appl. Environ. Microbiol., 73, 278-288.
- Cerrillo, M. A., Russell, J. R., Crump, M. H., 1999. The effects of hay maturity and forage to concentrate ratio on digestion kinetics in goats. Small Ruminant Res., 32, 51-60.
- Chapoutot, P., Dorléans, M., Sauvart, D., 2010. Etude des cinétiques de dégradation dans le rumen des constituants pariétaux des aliments concentrés et coproduits agroindustriels. INRA Prod. Anim., 23, 285-304
- Chilliard, Y., Doreau, M., Gagliostro, G., Elmeddah, Y., 1993. Addition de lipides protégés (encapsulés ou savons de calcium) à la ration de vaches laitières. Effets sur les performances et la composition du lait. INRA Prod. Anim., 6, 139-150.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Doreau, M., 2001. Contrôle de la qualité nutritionnelle des matières grasses du lait par l'alimentation des vaches laitières : acides gras *trans*, polyinsaturés, acide linoléique conjugué. INRA Prod. Anim., 14, 323-335.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. Reprod. Nutr. Develop., 44, 467-492.
- Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., Doreau, M., 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. Eur. J. Lipid Sci. Tech., 109, 828-855.
- Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., Martin, B., Martin, C., Enjalbert, F., Schmidely, P., 2010. Que peut-on attendre des pratiques d'élevage pour améliorer la qualité nutritionnelle des matières grasses du lait bovin et caprin ? Oléagineux, Corps Gras, Lipides, 17, 22-29.

- Church, D. C., 1976. Digestive physiology and nutrition of ruminants. Digestive physiology. 2nd Ed. O. et B. Books, Corvallis, Oregon (USA).
- Clarke, R. T. J., 1977. The gut and its micro-organisms. In: Clarke, R. T. J., Bauchop, T. (eds.), Microbial ecology of the gut, p 36-71. Academy Press, New York, New York (USA).
- Coles, L. T., Moughan, P. J., Darragh, A. J., 2005. *In vitro* digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. Anim. Feed Sci. Technol., 123-124, 421-444.
- Colman, E., Fokkink, W. B., Craninx, M., Newbold, J. R., Baets, B. d., Fievez, V., 2010. Effect of induction of subacute ruminal acidosis on milk fat profile and rumen parameters. J. Dairy Sci., 93, 4759-4773.
- Colonna, P., Buléon, A., Leloup, V., Thibault, J.-F., Renard, C., Lahaye, M., Viroben, G., 1995. Constituants des céréales, des graines, des fruits et de leurs sous-produits. In: Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M. (eds.), Nutrition des ruminants domestiques, p 83-121. INRA Editions, Paris, France.
- Colucci, P. E., MacLeod, G. K., Grovum, W. L., McMillan, I., Barney, D. J., 1990. Digesta kinetics in sheep and cattle fed diets with different forage to concentrate ratios at high and low intakes. J. Dairy Sci., 73, 2143-2156.
- Cone, J. W., van Gelder, A. H., Veerman, E. T., van Vurren, A. M., 1994. *In vitro* estimation of rumen fermentable organic matter with rumen fluid and a cell free preparation of rumen fluid. Neth. J. Agric. Sci., 42, 343.
- Cone, J. W., van Gelder, A. H., Visscher, G. J. W., Oudshoorn, L., 1996. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. Anim. Feed Sci. Technol., 61, 113-128.
- Cone, J. W., van Gelder, A. H., Bachmann, H., 2002. Influence of inoculum source on gas production profiles. Anim. Feed Sci. Technol., 99, 221-231.
- Corbett, J. L., Greenhalgh, J. F. D., Florence, E., 1959. Distribution of chromium sesquioxide and polyethylenglycol in the reticulo-rumen of cattle. Br. J. Nutr., 13, 337-345.
- Czerkawski, J. W., Breckenridge, G., 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). Br. J. Nutr., 38, 371-384.
- Czerkawski, J. W., 1986. An Introduction to Rumen Studies. Pergamon Press, Oxford, UK.
- Czerkawski, J. W., Cheng, K.-J., 1988. Compartmentation in the rumen, The Rumen Microbial Ecosystem, p 361-385. Hobson, P. N., New York, New York (USA).
- Danfaer, A., 1990. A dynamic model of nutrition, digestion and metabolism in lactating dairy cows. Ph.D. Thesis, Denmark.
- De Smet, S., Demeyer, D. I., Van Nevel, C. J., 1992. Effect of defaunation and hay:concentrate ratio on fermentation, fibre digestion and passage in the rumen of sheep. Anim. Feed Sci. Technol., 37, 333-344.
- Dehority, B. A., 2003. Rumen microbiology. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Demeyer, D., Fievez, V., 2000. Ruminants et environnement : la méthanogenèse. Ann. Zootech., 49, 95-112.
- Demeyer, D. I., Henderickx, H. K., 1967. Methane production from glucose *in vitro* by mixed rumen bacteria. Biochem. J., 105, 271-277.
- Demeyer, D. I., 1991. Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and hindgut. In: Jouany, J.-P. (ed.), Rumen microbial metabolism and ruminant digestion, p 217-237. INRA Editions, Paris, France.

- Desnoyers, M., Duvaux-Ponter, C., Rigalma, K., Roussel, S., Martin, O., Giger-Reverdin, S., 2008a. Effect of concentrate percentage on ruminal pH and time-budget in dairy goats. *Animal*, 2, 1802-1808.
- Desnoyers, M., Giger-Reverdin, S., Duvaux-Ponter, C., Lebarbier, E., Sauvant, D., 2008b. Modélisation des épisodes d'acidose sub-clinique et du comportement alimentaire associé : application à la chèvre laitière. *Renc. Rech. Rum.*, 15, 339.
- Desnoyers, M., Giger-Reverdin, S., Sauvant, D., Duvaux-Ponter, C., 2011. The use of a multivariate analysis to study between-goat variability in feeding behavior and associated rumen pH patterns. *J. Dairy Sci.*, 94, 842-852.
- DeVries, T. J., Beauchemin, K. A., von Keyserlingk, M. A. G., 2007. Dietary forage concentration affects the feed sorting behavior of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 90, 5572-5579.
- DeVries, T. J., Beauchemin, K. A., Dohme, F., Schwartzkopf-Genswein, K. S., 2009. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: feeding, ruminating, and lying behavior. *J. Dairy Sci.*, 92, 5067-5078.
- Dijkstra, J., Neal, H. D. S. C., Beever, D. E., France, J., 1992. Simulation of nutrient digestion, absorption and outflow in the rumen: model description. *J. Nutr.*, 122, 2239-2256.
- Dijkstra, J., Boer, H., Van Bruchem, J., Bruining, M., Tamminga, S., 1993. Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH and rumen liquid volume. *Br. J. Nutr.*, 69, 385-396.
- Dijkstra, J., 1994. Simulation of the dynamics of protozoa in the rumen. *Br. J. Nutr.*, 72, 679-699.
- Dijkstra, J., France, J., 1996. A comparative evaluation of models of whole rumen function. *Ann. Zootech.*, 45, suppl. 1, 175-192.
- Dijkstra, J., Gerrits, W. J., Bannink, A., France, J., 2000. Modelling lipid metabolism in the rumen. In: McNamara, J. P., France, J., Beever, D. E. (eds.), *Modelling Nutrient Utilization in Farm Animals*, p 25-36. CAB International, London, UK.
- Doreau, M., Chilliard, Y., 1997. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. *Br. J. Nutr.*, 78, 515-535.
- Doreau, M., 2008. Apports et limites des techniques alternatives à la chirurgie expérimentale du tractus digestif des herbivores. *Bull. Acad. Vet. France*, 161, 425-433.
- Doreau, M., Martin, C., Eugène, M., Popova, M., Morgavi, D. P., 2011. Leviers d'action pour réduire la production de méthane entérique par les ruminants. *INRA Prod. Anim.*, 24, 461-474.
- Dragomir, C., Sauvant, D., Peyraud, J. L., Giger-Reverdin, S., Michalet-Doreau, B., 2008. Meta-analysis of 0 to 8 h post-prandial evolution of ruminal pH. *Animal*, 2, 1437-1448.
- Dronne, Y., 2003. Avenir du secteur de l'alimentation animale en relation avec les filières végétales. *INRA Prod. Anim.*, 16, 333-340.
- Duffield, T., Plaizier, J. C., Fairfield, A., Bagg, R., Vessie, G., Dick, P., Wilson, J., Aramini, J., McBride, B., 2004. Comparison of techniques for measurement of rumen pH in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 87, 59-66.
- Durand, M., Dumay, C., Beaumatin, P., Morel, M. T., 1988. Use of the Rumen Simulation Technique (RUSITEC) to compare microbial digestion of various byproducts. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 21, 197-204.
- Edwards, J. E., Huws, S. A., Kim, E., Kingston-Smith, A. H., 2007. Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 62, 323-335.

- Ellis, J. L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Archibeque, S., France, J., Bannink, A., 2010. Prediction of methane production in beef cattle within a mechanistic digestion model. In: Sauvant, D., Van Milgen, J., Faverdin, P., Friggens, N. (eds.), 7th International Workshop on Modelling Nutrient Digestion and Utilisation in Farm Animals, Paris, France, 10-12 September, 2009, p 181-188.
- Enemark, J. M. D., 2009. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): a review. *Vet. J.*, 176, 32-43.
- Eugène, M., Archimède, H., Sauvant, D., 2004. Quantitative meta-analysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in ruminants. *Livest. Prod. Sci.*, 85, 81-97.
- Eugène, M., Massé, D., Chiquette, J., Benchaar, C., 2008. Meta-analysis on the effects of lipid supplementation on methane production of lactating dairy cows. *Can. J. agric. Sci.*, 88, 331-337.
- Faichney, G. J., 1975. The use of markers to partition digestion within the gastro-intestinal tract of ruminants. In: McDonald, I. W., Warner, A. C. I. (eds.), *Digestion and metabolism in the ruminant*, p 277-291. University of New England Publishing Unit, Armidale, NSW, Australia.
- Faichney, G. J., 1995. Transit des digesta dans le tube digestif des ruminants. In: Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M. (eds.), *Nutrition des ruminants domestiques*, p 431-464. INRA Editions, Paris, France.
- FAO, 2012. FAO stat. <http://faostat.fao.org/default.aspx> Consulté le 15 mars 2012.
- Faverdin, P., 1985. Régulation de l'ingestion des vaches laitières en début de lactation. PhD Thesis, Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris, France.
- Focant, M., 1984. Comportement alimentaire, rumination, fermentations réticulo-ruminales et acides gras volatils plasmatiques, comparés chez la chèvre et le mouton ; influence du régime. *Reprod. Nutr. Develop.*, 24, 239-250.
- Focant, M., 1986. Contribution à l'étude du comportement alimentaire des petits ruminants : rôle des acides gras volatils. Thèse de doctorat, Université Catholique de Louvain, Louvain, Belgique.
- Fonty, G., Jouany, J.-P., Forano, E., Gouet, P., 1995. L'écosystème microbien du réticulo-rumen. In: Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M. (eds.), *Nutrition des ruminants domestiques*, p 299-347. INRA Editions, Paris, France.
- France, J., Thornley, J. H. M., 1984. *Mathematical models in agriculture*. Butterworth & Co, London, UK.
- France, J., Dijkstra, J., Dhanoa, M. S., Lopez, S., Bannink, A., 2000. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: derivation of models and other mathematical considerations. *Br. J. Nutr.*, 83, 143-150.
- Franzolin, R., Dehority, B. A., 1996. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. *J. Anim. Sci.*, 74, 2803-2809.
- Friggens, N. C., Oldham, J. D., Dewhurst, R. J., Horgan, G., 1998. Proportions of volatile fatty acids in relation to the chemical composition of feeds based on grass silage. *J. Dairy Sci.*, 81, 1331-1344.
- Garcia-Gonzalez, R., Lopez, S., Fernandez, M., Bodas, R., Gonzalez, J. S., 2008. Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal methane production *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 147, 36-52.
- Gerson, T., John, A., King, A. S. D., 1985. The effects of dietary starch and fibre on the *in vitro* rates of lipolysis and hydrogenation by sheep rumen digesta. *J. Agric. Sci. Camb.*, 101, 27-30.

- Getachew, G., Blümmel, M., Makkar, H. P. S., Becker, K., 1998. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. Anim. Feed Sci. Technol., 72, 261-281.
- Getachew, G., Robinson, P. H., DePeters, E. J., Taylor, S. J., Gisi, D. D., Higginbotham, G. E., Riordan, T. J., 2005. Methane production from commercial dairy rations estimated using an *in vitro* gas technique. Anim. Feed Sci. Technol., 123-124, 391-402.
- Giger-Reverdin, S., Munoz, L. S., Sauvant, D., Leboute, E. M., Chapoutot, P., 1993. Influences du degré d'harmonie des cinétiques de dégradation des fractions glucidiques et azotées des aliments concentrés sur les fermentations en Rusitec. Ann. Zootech., 42, 148-149.
- Giger-Reverdin, S., Abijaoudé, J. A., Prado, I. N., Tessier, J., Morand-Fehr, P., 1997. Effect of diet composition on the kinetics of osmotic pressure in the rumen of dairy goats. Options Méditerranéennes, Série A, 34, 143-147.
- Giger-Reverdin, S., Sauvant, D., Vermorel, M., Jouany, J. P., 2000. Modélisation empirique des facteurs de variation des rejets de méthane par les ruminants. Renc. Rech. Rum., 7, 187-190.
- Giger-Reverdin, S., Duvaux-Ponter, C., Sauvant, D., Martin, O., Nunes do Prado, I., Muller, R., 2002. Intrinsic buffering capacity of feedstuffs. Anim. Feed Sci. Technol., 96, 83-102.
- Giger-Reverdin, S., Morand-Fehr, P., Tran, G., 2003. Literature survey of the influence of dietary fat composition on methane production in dairy cattle. Livest. Prod. Sci., 82, 73-79.
- Giger-Reverdin, S., Duvaux-Ponter, C., Rigalma, K., Sauvant, D., 2006. Variabilité du potentiel redox du contenu ruminal de chèvres laitières en liaison avec le comportement masticatoire. Renc. Rech. Rum., 13, 138.
- Giger-Reverdin, S., Duvaux-Ponter, C., Sauvant, D., 2009. Relationships between feed intake variability and rumen pH in mid-lactating goats fed an acidogenic diets. In: Chilliard, Y. et al. (eds.), Proceedings of the XIth International Symposium on Ruminant Physiology, 6 - 9 September 2009, p 792–793, Clermont-Ferrand, France.
- Giger-Reverdin, S., Lebarbier, E., Duvaux-Ponter, C., Desnoyers, M., 2012. A new segmentation-clustering method to analyse feeding behaviour of ruminants from within-day cumulative intake patterns. Comput. Electron. Agric., DOI: 10.1016/j.compag.2012.02.007.
- Glasser, F., Ferlay, A., Doreau, M., Schmidely, P., Sauvant, D., Chilliard, Y., 2008a. Long-chain fatty acid metabolism in dairy cows: a meta-analysis of milk fatty acid yield in relation to duodenal flows and *de novo* synthesis. J. Dairy Sci., 91, 2771-2785.
- Glasser, F., Schmidely, P., Sauvant, D., Doreau, M., 2008b. Digestion of fatty acids in ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors: 2. C18 fatty acids. Animal, 2, 691-704.
- Goiri, I., Garcia-Rodriguez, A., Oregui, L. M., 2009. Effect of chitosans on *in vitro* rumen digestion and fermentation of maize silage. Anim. Feed Sci. Technol., 148, 276-287.
- Gonçalves, A. L., Lana, R. d. P., Rodrigues, M. T., Vieira, R. A. M., Queiroz, A. C., Henrique, D. S., 2001. Padrão nictemeral do pH ruminal e comportamento alimentar de cabras leiteiras alimentadas com dietas contendo diferentes relações volumoso:concentrado. Rev. Bras. Zootecn., 30, 1886-1892.
- Gosselink, J. M. J., Dulphy, J. P., Poncet, C., Jailler, M., Tamminga, S., Cone, J. W., 2004. Prediction of forage digestibility in ruminants using *in situ* and *in vitro* techniques. Anim. Feed Sci. Technol., 115, 227-246.
- Grenet, E., Breton, A., Barry, P., Fonty, G., 1989. Rumen anaerobic fungi and plant substrate colonization as affected by diet composition. Anim. Feed Sci. Technol., 26, 55-70.

- Grubb, J. A., Dehority, B. A., 1975. Effects of an abrupt change in ration from all roughage to high concentrate upon rumen microbial numbers in sheep. *Appl. Microbiol.*, 30, 404-412.
- Guilloteau, P., Le Huëron-Luron, J. P., Malbert, C.-H., Toullec, M., 1995. Les sécrétions digestives et leur régulation. In: Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M. (eds.), *Nutrition des ruminants domestiques*. p 489-526. INRA Editions, Paris, France.
- Harfoot, C. G., Hazlewood, G. P., 1988. Lipid metabolism in the rumen. In: Hobson, P. N. (ed.), *The rumen microbial ecosystem*, p 285-322. Elsevier Applied Science, London, UK.
- Harfoot, C. G., Hazlewood, G. P., 1997. Lipid metabolism in the rumen. In: Hobson, P. N., Stewart, C. S. (eds.), *The rumen microbial ecosystem*, p 382-426. Blackie Academic & Professional, London, UK.
- Harmon, D. L., Richards, C. J., 1997. Considerations for gastrointestinal cannulations in ruminants. *J. Anim. Sci.*, 75, 2248-2255.
- Harvatine, K. J., Boisclair, Y. R., Bauman, D. E., 2009. Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. *Animal*, 3, 40-54.
- Hoover, W. H., Crooker, B. A., Sniffen, C. J., 1976. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. *J. Anim. Sci.*, 43, 528-535.
- Huhtanen, P., 1988. The effects of barley, unmolassed sugar-beet pulp and molasses supplements on organic matter, nitrogen and fibre digestion in the rumen of cattle given a silage diet. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 20, 259-278.
- Hungate, R. E., 1966. *The rumen and its microbes*. Academic Press, New York and London.
- Imamidoost, R., Cant, J. P., 2005. Non-steady-state modeling of effects of timing and level of concentrate supplementation on ruminal pH and forage intake in high-producing, grazing ewes. *J. Anim. Sci.*, 83, 1102-1115.
- INRA-AFZ, 2004. *Tables de composition et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevage*. INRA Editions, Paris, France.
- Isaacson, H. R., Hinds, F. C., Bryant, M. P., Owens, F. N., 1975. Efficiency of energy utilization by mixed rumen bacteria in continuous culture. *J. Dairy Sci.*, 58, 1645-1659.
- Jacques, K., Harmon, D. L., Croom, W. J., Jr., Hagler, W. M., Jr., 1989. Estimating salivary flow and ruminal water balance of intake, diet, feeding pattern, and slaframine. *J. Dairy Sci.*, 72, 443-452.
- Janssen, P. H., 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 160, 1-22.
- Jarrige, R., 1978. Digestion. In: Jarrige, R. (ed.), *Alimentation des ruminants*, p 23-45. INRA Editions, Versailles, France.
- Jarrige, R., Journet, M., Vérité, R., 1978. Azote. In: Jarrige, R. (ed.), *Alimentation des ruminants*, p 89-128. INRA Editions, Versailles, France.
- Jarrige, R., Grenet, E., Demarquilly, C., Beste, J.-M., 1995. Les constituants de l'appareil végétatif des plantes fourragères. In: Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M. (eds.), *Nutrition des ruminants domestiques*, p 25-81. INRA Editions, Paris, France.
- Jenkins, T. C., 1993. Lipid metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.*, 76, 3851-3863.
- Jenkins, T. C., Wallace, R. J., Moate, P. J., Mosley, E. E., 2008. Board-Invited Review: recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J. Anim. Sci.*, 86, 397-412.

- Jerred, M. J., Carroll, D. J., Combs, D. K., Grummer, R. R., 1990. Effects of fat supplementation and immature alfalfa to concentrate ratio on performance of dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 73, 2842-2854.
- Johnson, T. R., Combs, D. K., 1992. Effects of inert rumen bulk on dry matter intake in early and midlactation cows fed diets differing in forage content. *J. Dairy Sci.*, 75, 508-519.
- Jouany, J. P., Thivend, P., 1972. Evolution post-prandiale de la composition glucidique des corps microbiens du rumen en fonction de la nature des glucides du régime. I. Les protozoaires. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, 12, 679-683.
- Jouany, J. P., Broudiscou, L. P., Prins, R. A., Komisarczuk-Bony, S., 1995. Métabolisme et nutrition de la population microbienne du rumen. In: Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M. (eds.), *Nutrition des ruminants domestiques*, p 349-381. INRA Editions, Paris, France.
- Jouany, J.-P., 1994. Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. *INRA Prod. Anim.*, 7, 207-225.
- Journet, M., Huntington, G., Peyraux, J.-L., 1995. Le bilan des produits terminaux de la digestion. In: Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M. (eds.), *Nutrition de ruminants domestiques*, p 671-720. INRA Editions, Paris, France.
- Jussiau, R., Montmeas, L., Papet, A., 2006. Amélioration génétique des animaux d'élevage : Bases scientifiques, sélection et croisements. Educagri Editions, Dijon, France.
- Julien, C., Marden, J. P., Bonnefont, C., Moncoulon, R., Auclair, E., Monteils, V., Bayourthe, C., 2010. Effects of varying proportions of concentrates on ruminal-reducing power and bacterial community structure in dry dairy cows fed hay-based diets. *Animal*, 4, 1641-1646.
- Kalscheur, K. F., Teter, B. B., Piperova, S., Erdman, R. A., 1997. Effect of dietary forage concentration and buffer addition on duodenal flow of trans-C18:1 fatty acids and milk fat production in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 80, 2104-2114.
- Kawas, J. R., Lopes, J., Danelon, D. L., Lu, C. D., 1991. Influence of forage-to-concentrate ratios on intake, digestibility, chewing and milk production of dairy goats. *Small Ruminant Res.*, 4, 11-18.
- Kebreab, E., Mills, J. A. N., Crompton, L. A., Bannink, A., Dijkstra, J., Gerrits, W. J. J., France, J., 2004. An integrated mathematical model to evaluate nutrient partition in dairy cattle between the animal and its environment. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 112, 131-154.
- Kebreab, E., Dijkstra, J., Bannink, A., France, J., 2009. Recent advances in modeling nutrient utilization in ruminants. *J. Anim. Sci.*, 87, E111-E122.
- Khorasani, G. R., Okine, E. K., Kennelly, J. J., 2001. Effects of forage source and amount of concentrate on rumen and intestinal digestion of nutrients in late-lactation cows. *J. Dairy Sci.*, 84, 1156-1165.
- Kirchgesner, M., Muller, H. L., Schwarz, F. J., 1982. Experimental studies on the feeding frequency of dairy cows. In: Ekern, A., Sundstol, F. (eds.), *Energy metabolism of farm animals: proceedings of the 9th Symposium held at Lillehammer, Norway, September 1982 No. 29*, p 30-39. EAAP Publication, Norway.
- Kleen, J. L., Hooijer, G., Rehage, J., Noordhuizen, J. P., 2004. Rumenocentesis (rumen puncture): a viable instrument in herd health diagnosis. *Deut. Tierarztl. Woch.*, 111, 458-462.
- Kohn, R. A., Boston, R. C., Ferguson, J. D., Chalupa, W., 1995. The integration and comparison of dairy cows models. In: Danfaer, A., Lescoat, P. (eds.), *Proceedings of the IVth international workshop on modelling nutrient utilisation in farm animals*, p 117-128, Foulum, Denmark.

- Kohn, R. A., Dunlap, T. F., 1998. Calculation of the buffering capacity of bicarbonate in the rumen and *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 76, 1702-1709.
- Kohn, R. A., Boston, R. C., 2000. The role of thermodynamics in controlling rumen metabolism. In: McNamara, J. P., France, J., Beever, D. E. (eds.), *Modelling nutrient utilization in farm animals*, p 11-24. CAB International, Wallingford, UK.
- Koike, S., Pan, J., Kobayashi, Y., Tanaka, K., 2003. Kinetics of *in sacco* fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. *J. Dairy Sci.*, 86, 1429-1435.
- Krehbiel, C. R., Stock, R. A., Shain, D. H., Richards, C. J., Ham, G. A., McCoy, R. A., Klopfenstein, T. J., Britton, R. A., Huffman, R. P., 1995. Effect of level and type of fat on subacute acidosis in cattle fed dry-rolled corn finishing diets. *J. Anim. Sci.*, 73, 2438-2446.
- Latham, M. J., Sharpe, M. E., Sutton, J. D., 1971. The microbial flora of the rumen of cows fed hay and high cereal rations and its relationship to the rumen fermentation. *J. appl. Bacteriol.*, 34, 425-434.
- Latham, M. J., Storry, J. E., Sharpe, M. E., 1972. Effect of low-roughage diets on the microflora and lipid metabolism in the rumen. *Appl. Microbiol.*, 24, 871-877.
- LeDoux, M., Rouzeau, A., Bas, P., Sauvant, D., 2002. Occurrence of *trans*-C18:1 fatty acid isomers in goat milk: Effect of two dietary regimens. *J. Dairy Sci.*, 85, 190-197.
- Lescoat, P., Sauvant, D., 1994. Influence de la proportion de concentré dans la ration sur le profil ruminal des AGV. *Ann. Zootech.*, 43, Suppl 1, 28s-29s.
- Lescoat, P., Sauvant, D., 1995. Development of a mechanistic model for rumen digestion validated using the duodenal flux of amino acids. *Reprod. Nutr. Develop.*, 35, 45-70.
- Lettat, A., Nozière, P., Silberberg, M., Morgavi, D. P., Berger, C., Martin, C., 2010. Experimental feed induction of ruminal lactic, propionic, or butyric acidosis in sheep. *J. Anim. Sci.*, 88, 3041-3046.
- Li, X. Z., Long, R. J., Yan, C. G., Choi, S. H., Jin, G. L., Song, M. K., 2010. Rumen microbial responses in fermentation characteristics and production of CLA and methane to linoleic acid in associated with malate or fumarate. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 155, 132-139.
- Loor, J. J., Ueda, K., Ferlay, A., Chilliard, Y., Doreau, M., 2004. Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids in response to dietary forage:concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 87, 2472-2485.
- Loor, J. J., Ferlay, A., Ollier, A., Doreau, M., Chilliard, Y., 2005. Relationship among *trans* and conjugated fatty acids and bovine milk fat yield due to dietary concentrate and linseed oil. *J. Dairy Sci.*, 88, 726-740.
- Lopez, S., Carro, M. D., Gonzales, J. S., Ovejero, F. J., 1998. Comparison of different *in vitro* and *in situ* methods to estimate the extent and rate of degradation of hays in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 73, 99-113.
- Lourenço, M., Ramos-Morales, E., Wallace, R. J., 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal*, 4, 1008-1023.
- Lu, C. D., 1993. Implication of feeding isoenergetic diets containing animal fat on milk composition of alpine does during early lactation. *J. Dairy Sci.*, 76, 1137-1147.
- Maaroufi, C., Chapoutot, P., Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., 2009. Fractionation of pea flour with pilot scale sieving. II. *In vitro* fermentation of pea seed fractions of different particle sizes. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 154, 135-150.
- Mackie, R. I., Gilchrist, F. M. C., Robberts, A. M., Hannah, P. E., Schwartz, H. M., 1978. Microbiological and chemical changes in the rumen during the stepwise adaptation of sheep to high concentrate diets. *J. Agric. Sci. Camb.*, 90, 241-254.

- Madsen, J., 1985. The basis for the proposed Nordic protein evaluation system. The AAT-PBV system. *Acta Agric. Scand.*, 25, 9-20.
- Malecky, M., Broudiscou, L. P., 2009. Disappearance of nine monoterpenes exposed *in vitro* to the rumen microflora of dairy goats: Effects of inoculum source, redox potential, and vancomycin. *J. Anim. Sci.*, 87, 1366-1373.
- Malecky, M., Broudiscou, L. P., Schmidely, P., 2009a. Effects of two levels of monoterpene blend on rumen fermentation, terpene and nutrient flows in the duodenum and milk production in dairy goats. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 154, 24-35.
- Malecky, M., Fedele, V., Broudiscou, L. P., 2009b. *In vitro* degradation by mixed rumen bacteria of 17 mono- and sesquiterpenes typical of winter and spring diets of goats on Basilicata rangelands (southern Italy). *J. Sci. Food Agric.*, 89, 531-536.
- Malecky, M., Albarello, H., Broudiscou, L. P., 2012. Degradation of terpenes and terpenoids from Mediterranean rangelands by mixed rumen bacteria *in vitro*. *Animal*, 6, 612-616.
- Marden, J. P., Bayourthe, C., Enjalbert, F., Moncoulon, R., 2005. A new device for measuring kinetics of ruminal pH and redox potential in dairy cow. *J. Dairy Sci.*, 88, 277-281.
- Marden, J. P., 2007. Contribution à l'étude du mode d'action de la levure *Saccharomyces cerevisiae* Sc 47 chez le ruminant : approche thermodynamique chez la vache laitière. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Toulouse, Toulouse, France.
- Marounek, M., Bartos, S., Kalachnyuk, G. I., 1982. Dynamics of the redox potential and rH of the rumen fluid of goats. *Physiol. bohemoslov.*, 31, 369-374.
- Martin, C., Djouvinov, D., Kristensen, N. B., Huhtanen, P., 1999. Influence du niveau d'alimentation sur la vitesse de production des acides gras volatils dans le rumen. *Renc. Rech. Rum.*, 6, 109.
- Martin, C., Millet, L., Fonty, G., Michalet-Doreau, B., 2001. Cereal supplementation modified the fibrolytic activity but not the structure of the cellulolytic bacterial community associated with rumen solid digesta. *Reprod. Nutr. Develop.*, 41, 413-424.
- Martin, C., Brossard, L., Doreau, M., 2006. Mécanismes d'apparition de l'acidose ruminale latente et conséquences physiopathologiques et zootechniques. *INRA Prod. Anim.*, 19, 93-108.
- Martin, C., Morgavi, D. P., Doreau, M., 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal*, 4, 351-365.
- Massart-Leëen, A. M., Roets, E., Peeters, G., Verbeke, R., 1983. Propionate for fatty acid synthesis by the mammary gland of the lactating goat. *J. Dairy Sci.*, 66, 1445-1454.
- Mathieu, F., Jouany, J. P., Senaud, J., Bohatier, J., Bertin, G., Mercier, M., 1996. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep; protozoal and probiotic interactions. *Reprod. Nutr. Develop.*, 36, 271-287.
- Mauricio, R. M., Mould, F. L., Dhanoa, M. S., Owen, E., Channa, K. S., Theodorou, M. K., 1999. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 79, 321-330.
- McAllan, A. B., Sutton, J. D., Beever, D. E., Napper, D. J., 1994. Rumen fermentation characteristics and duodenal nutrient flow in lactating cows receiving two types of grass silage with two levels of concentrates. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 46, 277-294.
- McAllister, T. A., Bae, H. D., Jones, G. A., Cheng, K.-J., 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J. Anim. Sci.*, 72, 3004-3018.
- Mele, M., Buccioni, A., Petacchi, F., Serra, A., Banni, S., Antongiovanni, M., Secchiari, P., 2005. Effect of forage/concentrate ratio and soybean oil supplementation on milk yield, and composition from Sarda ewes. *Anim. Res.*, 55, 273-285.

- Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., Schneider, W., 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agric. Sci. Camb.*, 93, 217-222.
- Menke, K. H., Steingass, H., 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Develop.*, 28, 7-55.
- Mertens, D. R., 2005. Rate and extent of digestion. In: Dijkstra, J., Forbes, J. M., France, J. (eds.), *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*, 2nd edition, p 13-47. CAB International, Wallington, UK.
- Michalet-Doreau, B., Vérité, R., Chapoutot, P., 1987. Méthodologie de mesure de la dégradabilité *in sacco* de l'azote des aliments dans le rumen. *Bull. Tech. Cent. Rech. Zootech. Vét. Theix* 69, 5-7.
- Michalet-Doreau, B., Sauvant, D., 1989. Influence de la nature du concentré, céréales ou pulpe de betterave, sur la digestion chez les ruminants. *INRA Prod. Anim.*, 2, 235-244.
- Michalet-Doreau, B., Aufrère, J., 1990. Nouvelles méthodes d'estimation de la valeur alimentaire des fourrages I- Dégradabilité *in sacco*. *Fourrages*, 122, 189-201.
- Michalet-Doreau, B., Ould-Bah, M. Y., 1992. *In vitro* and *in sacco* methods for the estimation of dietary nitrogen degradability in the rumen: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 40, 57-86.
- Michalet-Doreau, B., Nozière, P., 1999. Intérêts et limites de l'utilisation de la technique des sachets pour l'étude de la digestion ruminale. *INRA Prod. Anim.*, 12, 195-206.
- Mills, J. A. N., Dijkstra, J., Bannink, A., Cammell, S. B., Kebreab, E., France, J., 2001. A mechanistic model of whole-tract digestion and methanogenesis in the lactating dairy cow: model development, evaluation, and application. *J. Anim. Sci.*, 79, 1584-1597.
- Minato, H., Mitsumori, M., Cheng, K.-J., 1993. Attachment of microorganisms to solid substrate in the rumen. In: Shimada, K. et al. (eds.), *Genetics, Biochemistry and Ecology of Lignoellulose Degradation*, p 139-145 (cité par Koike et al. (2003)). Uni Publishers, Co. Ltd., Tokyo, Japan.
- Miron, J., Ben-Ghedalia, D., Morrison, M., 2001. Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *J. Dairy Sci.*, 84, 1294-1309.
- Moate, P. J., Boston, R. C., Jenkins, T. C., Lean, I. J., 2008. Kinetics of ruminal lipolysis of triacylglycerol and biohydrogénation of long-chain fatty acids: new insights from old data. *J. Dairy Sci.*, 91, 731-742.
- Montgomery, M. J., Baumgardt, B. R., 1965a. Regulation of food intake in ruminants. 2. Rations varying in energy concentration and physical form. *J. Dairy Sci.*, 48, 1623-1628.
- Montgomery, M. J., Baumgardt, B. R., 1965b. Regulation of food intake in ruminants. 1. Pelleted rations varying in energy concentration. *J. Dairy Sci.*, 48, 569-574.
- Morgavi, D. P., Forano, E., Martin, C., Newbold, C. J., 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, 4, 1024-1036.
- Morvay, Y., Bannink, A., France, J., Kebreab, E., Dijkstra, J., 2011. Evaluation of models to predict the stoichiometry of volatile fatty acid profiles in rumen fluid of lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 94, 3063-3080.
- Moss, A. R., Jouany, J. P., Newbold, J., 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootech.*, 49, 231-253.
- Mould, F. L., Ørskov, E. R., 1983. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis *in sacco*, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 10, 1-14.

- Mould, F. L., 1988. Associative effects of feeds. In: Ørskov, E. R. (ed.), Feed Science, World Animal Science No. 4, p 279-292. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Mould, F. L., Morgan, R., Kliem, K. E., Krystallidou, E., 2005. A review and simplification of the *in vitro* incubation medium. Anim. Feed Sci. Technol., 123-124, 155-172.
- Murphy, M. R., Baldwin, R. L., Koong, L. J., 1982. Estimation of stoichiometric parameters for rumen fermentation of roughage and concentrate diets. J. Anim. Sci., 55, 411-421.
- Murray, R. M., Bryant, A. M., Leng, R. A., 1976. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. Br. J. Nutr., 36, 1-14.
- Nagadi, S., Herrero, M., Jessop, N. S., 2000. The influence of diet of the donor animal on the initial bacterial concentration of ruminal fluid and *in vitro* gas production degradability parameters. Anim. Feed Sci. Technol., 87, 231-239.
- Newbold, J. R., Rust, S. R., 1992. Effect of asynchronous nitrogen and energy supply on growth of ruminal bacteria in batch culture. J. Anim. Sci., 70, 538-546.
- Nocek, J. E., Tamminga, S., 1991. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. J. Dairy Sci., 74, 3598-3629.
- Nozière, P., Ortigues-Marty, I., Loncke, C., Sauvant, D., 2010. Carbohydrate quantitative digestion and absorption in ruminants: from feed starch and fibre to nutrients available for tissues. Animal, 4, 1057-1074.
- Nozière, P., Glasser, F., Sauvant, D., 2011. *In vivo* production and molar percentages of volatile fatty acids in the rumen: a quantitative review by an empirical approach. Animal, 5, 403-414.
- Offner, A., 2003. Modélisation systémique de la digestion dans le rumen : comparaison de modèles existants, modélisation des flux d'amidon, approche thermodynamique des fermentations. Thèse de doctorat, Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris, France.
- Offner, A., Bach, A., Sauvant, D., 2003. Quantitative review of *in situ* starch degradation in the rumen. Anim. Feed Sci. Technol., 106, 81-93.
- Offner, A., Sauvant, D., 2004. Comparative evaluation of the Molly, CNCPS, and LES rumen models. Anim. Feed Sci. Technol., 112, 107-130.
- Offner, A., Sauvant, D., 2006. Thermodynamic modeling of ruminal fermentations. Anim. Res., 55, 343-365.
- Ollier, S., Leroux, C., de la Foye, A., Bernard, L., Rouel, J., Chilliard, Y., 2009. Whole intact rapeseeds or sunflower oil in high-forage or high-concentrate diets affects milk yield, milk composition, and mammary gene expression profile in goats. J. Dairy Sci., 92, 5544-5560.
- O'Mara, F. P., Murphy, J. J., Rath, M., 1997. The effect of replacing dietary beet pulp with wheat treated with sodium hydroxide, ground wheat, or ground corn in lactating cows. J. Dairy Sci., 80:530-540.
- Opatpatanakit, Y., Kellaway, R. C., Lean, I. J., Annison, G., Kirby, A., 1994. Microbial fermentation of cereal grains *in vitro*. Aust. J. agric. Res., 45, 1247 - 1263.
- Orpin, C. G., Joblin, K. N., 1988. The rumen anaerobic fungi. In: Hobson, p. N. (ed.), The rumen microbial ecosystem, p 129-150. Elsevier Applied Science, London, UK.
- Ørskov, E. R., McDonald, I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. J. Agric. Sci. Camb., 92, 499-503.
- Oshio, S., tahata, I., Minato, H., 1987. Effects of diets differing in ratios of roughage to concentrate on microflora in the rumen of heifers. J. Gen. Appl. Microbiol., 33, 99-111.

- Owens, F. N., Goetsch, A. L., 1986. Digesta passage and microbial protein synthesis. In: Milligan, L. P., Grovum, W. L., Dobson, A. (eds.), Control of digestion and metabolism in ruminants, p 196-223. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., USA.
- Pell, A. N., Schofield, P., 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. J. Dairy Sci., 76, 1063-1073.
- Peterson, D. G., Matitashvili, E. A., Bauman, D. E., 2003. Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased *trans*-10, *cis*-12 CLA in milk fat and coordinate suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. J. Nutr., 133, 3098-3102.
- Petruzzi, H., Danfar, A., Nrgaard, P., 2002. A dynamic simulation model of nutrient digestion in the rumen of dairy cows. J. Anim. Feed Sci., 11, 367-397.
- Piperova, L. S., Teter, B. B., Bruckental, I., Sampugna, J., Mills, S. E., Yurawecz, M. P., Fritsche, J., Ku, K., Erdman, R. A., 2000. Mammary lipogenic enzyme activity, *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat-depressing diet. J. Nutr., 130, 2568-2574.
- Pitt, R. E., Van Kessel, J. S., Fox, D. G., Pell, A. N., Barry, M. C., Van Soest, P. J., 1996. Prediction of ruminal volatile fatty acids and pH within the net carbohydrate and protein system. J. Anim. Sci., 74, 226-244.
- Quin, J. I., Van der Walt, J. C., Myburgh, S., 1938. Studies on the alimentary tract of merino sheep in South Africa. Description of experimental technique. J. Vet. Sci. Anim. Ind., 11, 341-349.
- Ramangasoavina, B., Sauvant, D., 1993. Validation comparée de 3 modèles de digestion ruminale pour prédire les flux azotés duodénaux microbiens. Ann. Zootech., 42, 164-165.
- Ramos, S., Tejido, M. L., Martinez, m. E., Ranilla, M. J., Carro, M. D., 2009. Microbial protein synthesis, ruminal digestion, microbial populations, and N balance in sheep fed diets varying in forage to concentrate ratio and type of forage. J. Anim. Sci., 87, 2924-2934.
- Rapetti, L., Tamburini, A., Crovetto, G. M., Galassi, G., Succi, G., 1997. Energy utilization of diets with different hay proportions in lactating goats. Zootec. Nutr. Anim., 23, 317-328.
- Reichl, J. R., Baldwin, R. L., 1975. Rumen modeling: rumen input-output balance models. J. Dairy Sci., 58, 879-890.
- Rémond, B., Brugère, H., Poncet, C., Baumont, R., 1995. Le contenu du réticulo-rumen. In: Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M. (eds.), Nutrition des ruminants domestiques, p 253-298. INRA Editions, Paris, France.
- Ribeiro, C. V., Eastridge, J. L., Firkins, N. R., St-Pierre, N. R., Palmquist, D. L., 2007. Kinetics of fatty acid biohydrogenation *in vitro*. J. Dairy Sci., 90, 1405-1416.
- Russell, J. B., Wallace, R. J., 1988. Energy yielding and consuming reactions. In: Hobson, P. N. (ed.), The rumen microbial ecosystem, p 185-215. Elsevier Applied Science, London and New York.
- Russell, J. B., O'Connor, J. D., Fox, D. G., Soest, P. J. v., Sniffen, C. J., 1992. A Net Carbohydrate and Protein System for evaluating cattle diets. 1. Ruminal fermentation. J. Anim. Sci., 70, 3551-3561.
- Rymer, C., Givens, D.I., 1998. Relationship between the gas production profiles of mixtures of hay and maize and the patterns of rumen fermentation observed in sheep fed those mixtures. In: Proceedings of British Society of Animal Science Annual Meeting, Scarborough, p. 63.

- Rymer, C., Huntington, J. A., Williams, B. A., Givens, D. I., 2005a. *In vitro* cumulative gas production techniques: history, methodological considerations and challenges. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 123-124, 9-30.
- Rymer, C., Williams, B. A., Brooks, A. E., Davies, D. R., Givens, D. I., 2005b. Inter-laboratory variation of *in vitro* cumulative gas production profiles of feeds using manual and automated methods. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 123-124, 225-241.
- Sackmann, J. R., Duckett, S. K., Gillis, M. H., Realini, C. E., Parks, A. H., Eggelston, R. B., 2003. Effects of forage and sunflower oil levels on ruminal biohydrogenation of fatty acids and conjugated linoleic acid formation in beef steers fed finishing diets. *J. Anim. Sci.*, 81, 3174-3181.
- Santini, F. J., Lu, C. D., Potchoiba, M. J., Fernandez, J. M., Coleman, S. W., 1992. Dietary fiber and milk yield, mastication, digestion, and rate of passage in goats fed alfalfa hay. *J. Dairy Sci.*, 75, 209-219.
- Sanz Sampelayo, M. R., Chilliard, Y., Schmidely, P., Boza, J., 2007. Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk. *Small Ruminant Res.*, 68, 42-63.
- Sautet, J., 1995. L'appareil digestif et ses adaptations. In: Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M. (eds.), *Nutrition des ruminants domestiques, ingestion et digestion*, p 183-222. INRA Editions, Paris, France.
- Sauvant, D., 1988. La modélisation de la digestion dans le rumen. *Reprod. Nutr. Develop.*, 28, 33-58.
- Sauvant, D., 1992. La modélisation systémique en nutrition. *Reprod. Nutr. Develop.*, 32, 217-230.
- Sauvant, D., Chapoutot, P., Archimède, H., 1994. La digestion des amidons par les ruminants et ses conséquences. *INRA Prod. Anim.*, 7, 115-124.
- Sauvant, D., Dijkstra, J., Mertens, D., 1995a. Optimisation of ruminal digestion: a modelling approach. In: Journet, M., Grenet, E., Farce, M.-H., Thériez, M., Demarquilly, C. (eds.), *Recent developments in the nutrition of herbivores No. 143-165*. INRA Editions, Paris, France.
- Sauvant, D., Grenet, E., Doreau, D., 1995b. Dégradation chimique des aliments dans le réticulo-rumen : cinétique et importance. In: Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M. (eds.), *Nutrition des ruminants domestiques*, p 383-406. INRA Editions, Paris, France.
- Sauvant, D., Van Milgen, J., 1995. Les conséquences de la digestion des aliments sur le métabolisme ruminal et les performances animales. *INRA Prod. Anim.*, 8, 353-367.
- Sauvant, D., 1997. Rumen mathematical modelling. In: Hobson, P. N., Stewart, C. S. (eds.), *The rumen microbial ecosystem*, p 685-708. Blackie Academic and Professional, London, UK.
- Sauvant, D., Meschy, F., Mertens, D., 1999. Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogènes des rations. *INRA Prod. Anim.*, 12, 49-60.
- Sauvant, D., Morand-Fehr, P., 2000. Quantitative analysis of dairy goat response to concentrate supply. In: 7th International Conference on Goats, Tours, France. p 80-81.
- Sauvant, D., Bas, P., 2001. La digestion des lipides dans le rumen. *INRA Productions Animales*, 14, 303-310.
- Sauvant, D., Martin, O., Berthelot, V., Mertens, D., 2001. Influence de la digestion dans le rumen sur la composition des produits. *Renc. Rech. Rum.*, 8, 71-74.
- Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., Meschy, F., 2006. Le contrôle de l'acidose ruminale. *INRA Prod. Anim.*, 19, 69-78.
- Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., Meschy, F., 2007. Alimentation des caprins, Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux–Valeurs des Aliments. Tables INRA 2007, p 137-148. Editions Quae, Versailles, France.

- Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., 2008a. Meta-analysis of responses of goats to chewing index. In: Joint Annual Meeting ADSA-ASAS, 07-11 July 2008, Indianapolis, Indiana (USA)
- Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., 2008b. Utilisation de l'énergie et production de méthane par la chèvre laitière. Renc. Rech. Rum., 15, 222.
- Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., Archimède, H., Baumont, R., 2008a. Modélisation des relations entre l'activité masticatoire des ruminants, les caractéristiques du régime et sa digestion. Renc. Rech. Rum., 15, 331-334.
- Sauvant, D., Schmidely, P., Daudin, J. J., St-Pierre, N. R., 2008b. Meta-analysis of experimental data in animal nutrition. Animal, 2, 1203-1214.
- Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., 2009. Modélisation des interactions digestives et de la production de méthane chez les ruminants. INRA Prod. Anim., 22, 375-384.
- Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., Serment, A., Broudiscou, L. P., 2011. Influences des régimes et de leur fermentation dans le rumen sur la production de méthane par les ruminants. INRA Prod. Anim., 24, 433-446.
- Schmidely, P., Sauvant, D., 2001. Taux Butyreux et composition de la matière grasse du lait chez les petits ruminants: effets de l'apport de matières grasses ou d'aliments concentrés. INRA Prod. Anim., 14, 333-352.
- Schmidely, P., Glasser, F., Doreau, D., Sauvant, D., 2008. Digestion of fatty acids in ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors. 1. Total fatty acids. Animal, 2, 677-690.
- Schmidely, P., Andrade, P. V. D., 2011. Dairy performance and milk fatty acid composition of dairy goats fed high or low concentrate diet in combination with soybeans or canola seed supplementation. Small Ruminant Res., 99, 135-142.
- Seo, S., Lanzas, C., Tedeschi, L. O., Fox, D. G., 2007. Development of a mechanistic model to represent the dynamics of liquid flow out of the rumen and to predict the rate of passage of liquid in dairy cattle. J. Dairy Sci., 90, 840-855.
- Seo, S., Lanzas, C., Tedeschi, L. O., Pell, A. N., Fox, D. G., 2009. Development of a mechanistic model to represent the dynamics of particle flow out of the rumen and to predict rate of passage of forage particles in dairy cattle. J. Dairy Sci., 92, 3981-4000.
- Shingfield, K. J., Griinari, J. M., 2007. Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. Eur. J. Lipid Sci. Tech., 109, 799-816.
- Shingfield, K. J., Bernard, L., Leroux, C., Chilliard, Y., 2010. Role of *trans* fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. Animal, 4, 1140-1166.
- Shriver, B. J., Hoover, W. H., Sargent, J. P., Crawford, R. J. J., Thayne, W. V., 1986. Fermentation of high concentrate diet as affected by ruminal pH and digesta flow. J. Dairy Sci., 69, 413-419.
- Siddons, R. C., Paradine, J., 1981. Effect of diet on protein degrading activity in the sheep rumen. J. Sci. Food Agric., 32, 973-981.
- Singh, B., Gautam, S. K., Verma, V., Kumar, M., Singh, B., 2008. Metagenomics in animal gastrointestinal ecosystem: Potential biotechnological prospects. Anaerobe, 14, 138-144.
- Slyter, L. L., Nelson, W. O., Wolin, M. J., 1964. Modifications of a device for maintenance of the rumen microbial population in continuous culture. Appl. Microbiol., 12, 374-377.
- Slyter, L. L., 1976. Influence of acidosis on rumen function. J. Anim. Sci., 43, 910-929.
- Sniffen, C. J., O'Connor, J. D., Soest, P. J. v., Fox, D. G., Russell, J. B., 1992. A Net Carbohydrate and Protein System for evaluating cattle diets. 2. Carbohydrate and protein availability. J. Anim. Sci., 70, 3562-3577.

- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., de Haan, C., 2006. Livestock's long shadow: environmental issues and options. 390 p. FAO, Rome, Italie. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a0701e/a0701e.pdf> Consulté le 15 mars 2012.
- Sveinbjörnsson, J., Huhtanen, P., Udén, P., 2006. The Nordic dairy cow model, Karoline - Development of volatile fatty acid submodel. In: Kebreab, E., Dijkstra, J., Bannink, A., Gerrits, W. J. J., France, J. (eds.), Nutrient Digestion and Utilization in Farm Animals: Modelling Approaches, p 1-14. CAB International, Wallingford, UK.
- Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., Benno, Y., 2001. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 2766-2774.
- Tamminga, S., van Vuuren, A. M., 1988. Formation and utilisation of end products of lignocellulose degradation in ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 21, 141-159.
- Teh, T. H., Trung, L. T., Jia, Z. H., Gipson, T. A., Ogden, K. B., Sweeney, T. F., 1994. Varying amount of rumen-inert fat for high producing goats in early lactation. *J. Dairy Sci.*, 77, 253-258.
- Tessmann, N. J., Radloff, H. D., Kleinmans, J., Dniman, T. R., Satter, L. D., 1991. Milk production responses to dietary forage:grain ratio. *J. Dairy Sci.*, 74, 2696-2707.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., France, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 48, 185-197.
- Tice, E. M., Eastridge, M. L., Firkins, J. L., 1993. Raw soybeans and roasted soybeans of different particle sizes. 1. Digestibility and utilization by lactating cows. *J. Dairy Sci.*, 76, 224-235.
- Tilley, J. M. A., Terry, R. A., 1963. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.*, 18, 104-111.
- Titgemeyer, E. C., 1997. Design and interpretation of nutrient digestion studies. *J. Anim. Sci.*, 75, 2235-2247.
- Troegeler-Meynadier, A., Nicot, M. C., Bayourthe, C., Moncoulon, R., Enjalbert, F., 2003. Effects of pH and concentrations of linoleic and linolenic acids on extent and intermediates of ruminal biohydrogenation *in vitro*. *J. Dairy Sci.*, 86, 4054-4063.
- Ueda, K., Ferlay, A., Chabrot, J., Loor, J. J., Chilliard, Y., Doreau, M., 2003. Effect of linseed oil supplementation on ruminal digestion in dairy cows fed diets with different forage:concentrate ratios. *J. Dairy Sci.*, 86, 3999-4007.
- Ulyatt, M. J., Baldwin, R. L., Koong, L. J., 1976. The basis of nutritive value - a modelling approach. *Proc. New Zeal. Soc. An.*, 36, 140-149.
- Van Kessel, J. S., Russell, J. B., 1996. The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 20, 205-210.
- Van Nevel, C. J., Demeyer, D. I., 1996. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents *in vitro*. *Reprod. Nutr. Develop.*, 36, 53-63.
- Vérité, R., Michalet-Doreau, B., Chapoutot, P., Peyraud, J. L., Poncet, C., 1987. Révision du système des Protéines Digestibles dans l'Intestin (PDI). *Bull. Tech. Cent. Rech. Zootech. Vét. Theix* 70, 19-34.
- Vermorel, M., 1995. Productions gazeuses et thermiques résultant des fermentations digestives. In: Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M. (eds.), Nutrition des ruminants domestiques, p 649-670. INRA Editions, Paris, France.
- Vlaeminck, B., Fievez, V., Cabrita, A. R. J., Fonseca, A. J. M., Dewhurst, R. J., 2006. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 131, 389-417.

- Voelker, J. A., Allen, M. S., 2003a. Pelleted beet pulp substituted for high-moisture corn: 3. Effects on ruminal fermentation, pH, and microbial protein efficiency in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 86, 3562-3570.
- Voelker, J. A., Allen, M. S., 2003b. Pelleted beet pulp substituted for high-moisture corn: 2. Effects on digestion and ruminal digestion kinetics in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 86, 3553-3561.
- Wallace, R. J., Cotta, M. A., 1988. Metabolism of nitrogen-containing compounds. In: Hobson, P. N. (ed.), *The rumen microbial ecosystem*, p 217-249. Elsevier Applied Science, London and New York.
- Wang, J. H., Song, M. K., Son, Y. S., Chang, M. B., 2002. Effect of concentrate level on the formation of conjugated linoleic acid and *trans*-octadecenoic acid by ruminal bacteria when incubated with oilseeds *in vitro*. *Asian Australas. J. Anim. Sci.*, 15, 687-694.
- Wattiaux, M. A., Satter, L. D., R, M. D., 1992. Effect of microbial fermentation on functional specific gravity of small forage particles. *J. Anim. Sci.*, 70, 1262-1270.
- Williams, A. G., Strachan, N. H., 1984. Polysaccharide degrading enzymes in microbial populations from the liquid and solid fractions of bovine rumen digesta. *Can. J. Anim. Sci.*, 64, 58-59.
- Williams, B. A., Bosch, M. W., Boer, H., Verstegen, M. W. A., Tamminga, S., 2005. An *in vitro* batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 123-124, 445-462.
- Wolin, M., 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *J. Dairy Sci.*, 40, 1452-1459.
- Wu, Z., Ohajuruka, O. A., Palmquist, D. L., 1991. Ruminal synthesis, biohydrogenation, and digestibility of fatty acids by dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 74, 3025-3034.
- Yanez Ruiz, D. R., Moumen, A., Martin Garcia, A. I., Molina Alcaide, E., 2004. Ruminal fermentation and degradation patterns, protozoa population, and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on two-stage olive cake: Effect of PEG supply. *J. Anim. Sci.*, 82, 2023-2032.
- Yang, W., 1991. Etude cinétique de la colonisation microbienne des aliments dans le rumen du mouton, conséquences sur la compartimentation de la biomasse et sur sa dynamique de sortie du rumen dans le cas de différents types de rations. Thèse de Doctorat, Université de Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France.
- Yokoyama, M. T., Johnson, K. A., 1988. Microbiology of the rumen and intestine. In: Church, D. C. (ed.), *The ruminant animal, digestive physiology and nutrition*, p 125-144. Reston Book, New Jersey (USA).
- Zelter, S. Z., Leroy, F., Tissier, J. P., 1970. Protection des protéines alimentaires contre la désamination bactérienne dans le rumen. Etudes *in vitro* : comportement en milieu de rumen de quelques protéines tannées avec du tannin de châtaignier ou certains aldéhydes (formaldéhyde, glutaraldéhyde, glyoxal). *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.*, 10, 111-122.
- Zhang, C. M., Guo, Y. Q., Yuan, Z. P., Wu, Y. M., Wang, J. K., Liu, J. X., Zhu, W. Y., 2008. Effect of octadeca carbon fatty acids on microbial fermentation, methanogenesis and microbial flora *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 146, 259-269.

Autorisation d'exploitation des figures et tableaux

L'auteur remercie les éditeurs, rédacteurs en chef ou auteurs, des articles, thèses et livres suivants, d'avoir permis l'utilisation de figures et tableaux dans cette thèse :

Figure 4 :

Koike, S., Pan, J., Kobayashi, Y., Tanaka, K., 2003. Kinetics of in sacco fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. *J. Dairy Sci.*, 86, 1429-1435. **Fig 1 et Fig 2 p 1431-1432 (Figures traduites)**

Figures 5, Figure 6, Figure 24, Tableau 1 :

Sauvant, D., Van Milgen, J., 1995. Les conséquences de la digestion des aliments sur le métabolisme ruminal et les performances animales. *INRA Prod. Anim.*, 8, 353-367 : **Figure 2 p 355, Figure 13 p 362, Figure 14 p 363, Tableau 1 p 354**

Figure 7 :

Rémond, B., Brugère, H., Poncet, C., Baumont, R., 1995. Le contenu du réticulo-rumen. In: Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M. (eds.), *Nutrition des ruminants domestiques*, p 253-298. INRA Editions, Paris, France. **Figure 7.11. p 268**

Figure 8 :

Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., Meschy, F., 2006. Le contrôle de l'acidose ruminale. *INRA Prod. Anim.*, 19, 69-78 : **Figure 6 p 75**

Figure 9 :

Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., Archimède, H., Baumont, R., 2008a. Modélisation des relations entre l'activité masticatoire des ruminants, les caractéristiques du régime et sa digestion. *Renc. Rech. Rum.*, 15, 331-334. **Figure 4 p333**

Figure 10 :

Dragomir, C., Sauvant, D., Peyraud, J. L., Giger-Reverdin, S., Michalet-Doreau, B., 2008. Meta-analysis of 0 to 8 h post-prandial evolution of ruminal pH. *Animal*, 2, 1437-1448. **Fig 1 p 1439 (Figure traduite)**

Figure 14, Figure 15, Figure 16 :

Vermorel, M., 1995. Productions gazeuses et thermiques résultant des fermentations digestives. In: Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M. (eds.), *Nutrition des ruminants domestiques*, p 649-670. INRA Editions, Paris, France. **Figure 18.1. p 654, Figure 18.2. p 655, Figure 18.6. p 663**

Figure 18, Figure 40, Figure 41 :

Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., Serment, A., Broudiscou, L. P., 2011. Influences des régimes et de leur fermentation dans le rumen sur la production de méthane par les ruminants. *INRA Prod. Anim.*, 24, 433-446 : **Figure 1 p 435, Figure 2 p 436, Figure 9 p 441**

Figure 19 :

Jarrige, R., Journet, M., Vérité, R., 1978. Azote. In: Jarrige, R. (ed.), Alimentation des ruminants, p 89-128. INRA Editions, Versailles, France. **Figure 3.1 p 94**

Figure 23 :

Chapoutot, P., Dorléans, M., Sauvant, D., 2010. Etude des cinétiques de dégradation dans le rumen des constituants pariétaux des aliments concentrés et coproduits agroindustriels. INRA Prod. Anim. 23(3), 285-304 : **Figure 1 p 286**

Figure 25 :

Morgavi, D. P., Forano, E., Martin, C., Newbold, C. J., 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. Animal, 4, 1024-1036. **Fig 1 p 1026 (Figure traduite et refaite)**

Figure 27 :

Sauvant, D., Martin, O., Berthelot, V., Mertens, D., 2001. Influence de la digestion dans le rumen sur la composition des produits. Renc. Rech. Rum., 8, 71-74. **Figure 4 p 73**

Figure 28 et Figure 31 :

Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., Doreau, M., 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. Eur. J. Lipid Sci. Tech., 109, 828-855. **Fig 1 p 829 et Fig 2 p 830 (Figures traduites et refaites)**

Figure 29 :

Shingfield, K. J., Griinari, J. M., 2007. Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. Eur. J. Lipid Sci. Tech., 109, 799-816. **Fig 1 p 800 (Figure traduite et refaite)**

Figure 30 :

Vlaeminck, B., Fievez, V., Cabrita, A. R. J., Fonseca, A. J. M., Dewhurst, R. J., 2006. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: a review. Anim. Feed Sci. Technol., 131, 389-417. **Fig 1 p 392 (Figure traduite)**

Figure 35 :

Marden, J. P., 2007. Contribution à l'étude du mode d'action de la levure *Saccharomyces cerevisiae* Sc 47 chez le ruminant : approche thermodynamique chez la vache laitière. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Toulouse, Toulouse, France.

Figure 47 :

Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., 2008a. Meta-analysis of responses of goats to chewing index. In: Joint Annual Meeting ADSA-ASAS, 07-11 July 2008, Indianapolis, Indiana (USA) (Figure traduite)

Tableau 4 :

Sauvant, D., Bas, P., 2001. La digestion des lipides dans le rumen. INRA Productions Animales, 14, 303-310 : **Tableau 1 p 305**

Tableau 8 :

Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., Meschy, F., 2007. Alimentation des caprins, Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux–Valeurs des Aliments. Tables INRA 2007, p 137-148. Editions Quae, Versailles, France. **Tableau 7.4. p 147**

ANNEXES

Annexe 1 : Liste des publications : modèles de rumen

- 1 Baldwin, R. L., Lucas, H. L., Cabrera, R., **1970**. Energetic relationships in the formation and utilization of fermentation end-products. In: Phillipson, A. T. (eds.) Physiology of digestion and metabolism in the ruminant. p 319-334. Oriel Press, Newcastle-upon-Tyne, UK.
- 2 Reichl, J. R., Baldwin, R. L., **1975**. Rumen modeling: rumen input-output balance models. *Journal of Dairy Science* 58: 879-890.
- 3 Ulyatt, M. J., Baldwin, R. L., Koong, L. J., **1976**. The basis of nutritive value - a modelling approach. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 36: 140-149.
- 4 Baldwin, R. L., Koong, L. J., Ulyatt, M. J., **1977**. A dynamic model of ruminant digestion for evaluation of factors affecting nutritive value. *Agricultural Systems* 2: 255-288.
- 5 Black, J. L., Beever, D. E., Faichney, G. J., Howarth, B. R. et McC. Graham, N., **1981**. Simulation of the effects of rumen function on the flow of nutrients from the stomach of sheep I - description of a computer program. *Agricultural Systems* 6: 195-219.
- 6 France, J., Thornley, J. H. M., Beever, D. E., **1982**. A mathematical model of the rumen. *Journal of Agricultural Science* 99: 343-353.
- 7 Van Soest, P. J., Sniffen, C. J., Mertens, D. R., Fox, D. G., Robinson, P. H., Krishnamoorthy, U., **1982**. A net protein system for cattle: the rumen submodel for nitrogen. In: Symposium on protein requirements for cattle, Oklahoma State University, Stillwater. p 265-279.
- 8 Murphy, M. R., Baldwin, R. L., Ulyatt, M. J., **1986**. An update of a dynamic model of ruminant digestion. *Journal of Animal Science* 62: 1412-1422.
- 9 Baldwin, R. L., Thornley, J. H. M., Beever, D. E., **1987**. Metabolism of the lactating cow. II. Digestive elements of a mechanistic model. *Journal of Dairy Research* 54: 107-131.
- 10 Argyle, J. L., Baldwin, R. L., **1988**. Modeling of rumen water kinetics and effects of rumen pH changes. *Journal of Dairy Science* 71: 1178-1188.
- 11 Paul, W., **1990**. Physiologie des Milchkuh, eine Mathematische Systemanlage. *Landbauforschung Volkende. Sonderheft 116*, Braunschweig, Germany.
- 12 Danfaer, A., **1990**. A dynamic model of nutrition, digestion and metabolism in lactating dairy cows. Ph.D. Thesis, National Institute of Animal Science, Denmark.
- 13 Dijkstra, J., Neal, H. D. S. C., Beever, D. E., France, J., **1992**. Simulation of nutrient digestion, absorption and outflow in the rumen: model description. *Journal of Nutrition* 122: 2239-2256.
- 14 Russell, J. B., O'Connor, J. D., Fox, D. G., Van Soest, P. J., Sniffen, C. J., **1992**. A Net Carbohydrate and Protein System for evaluating cattle diets. 1. Ruminant fermentation. *Journal of Animal Science* 70: 3551-3561.
- 15 Dijkstra, J., **1994**. Simulation of the dynamics of protozoa in the rumen. *British Journal of Nutrition* 72: 679-699.
- 16 Lescoat, P., Sauvant, D., **1995**. Development of a mechanistic model for rumen

- digestion validated using the duodenal flux of amino acids. *Reproduction, Nutrition, Development* 35: 45-70.
- 17 Dijkstra, J., France, J., Neal, H. D. S. C., Assis, A. G., Aroeira, L. J. M., Campos, O. F., **1996**. Simulation of digestion in cattle fed sugarcane: model development. *Journal of Agricultural Science* 127: 231-246.
 - 18 Pitt, R. E., Van Kessel, J. S., Fox, D. G., Pell, A. N., Barry, M. C., Van Soest, P. J., **1996**. Prediction of ruminal volatile fatty acids and pH within the net carbohydrate and protein system. *Journal of Animal Science* 74: 226-244.
 - 19 Bannink, A., De Visser, H., Klop, A., Dijkstra, J., France, J., **1997**. Causes of inaccurate prediction of volatile fatty acids by simulation models of rumen function in lactating cows. *Journal of Theoretical Biology* 189: 353-366.
 - 20 Chilibruste, P., Aguilar, C., Garcia, F., **1997**. Nutritional evaluation of diets. Simulation model of digestion and passage of nutrients through the rumen-reticulum. *Animal Feed Science and Technology* 68: 259-275.
 - 21 Kohn, R. A., Boston, R. C., **2000**. The role of thermodynamics in controlling rumen metabolism. In: McNamara, J. P., France, J., Beever, D. E. (eds.) *Modelling nutrient utilization in farm animals*. p 11-24. CAB International, Wallingford UK.
 - 22 Dijkstra, J., Gerrits, W. J., Bannink, A., France, J., **2000**. Modelling lipid metabolism in the rumen. In: McNamara, J. P., France, J., Beever, D. E. (eds.) *Modelling Nutrient Utilization in Farm Animals*. p 25-36. CABI, London, UK.
 - 23 Mills, J. A. N., Dijkstra, J., Bannink, A., Cammell, S. B., Kebreab, E., France, J., **2001**. A mechanistic model of whole-tract digestion and methanogenesis in the lactating dairy cow: model development, evaluation, and application. *Journal of Animal Science* 79: 1584-1597.
 - 24 Petruzzi, H., Danfar, A., Nrgaard, P., **2002**. A dynamic simulation model of nutrient digestion in the rumen of dairy cows. *Journal of Animal and Feed Sciences* 11: 367-397.
 - 25 Kebreab, E., Mills, J. A. N., Crompton, L. A., Bannink, A., Dijkstra, J., Gerrits, W. J. J., France, J., **2004**. An integrated mathematical model to evaluate nutrient partition in dairy cattle between the animal and its environment. *Animal Feed Science and Technology* 112: 131-154.
 - 26 Moate, P. J., Chalupa, T. C., Jenkins, T. C., Boston, R. C., **2004**. A model to describe ruminal metabolism and intestinal absorption of long chain fatty acids. *Animal Feed Science and Technology* 112: 79-105.
 - 27 Collao-Saenz, E. A., Dijkstra, J., Paiva, P. C. d. A., Bannink, A., Arcuri, P. B., Teixeira, J. C., Perez, J. R. O., David, F. M., **2005**. Simulation model for particle dynamics in rumen of cattle fed sugarcane diet. *Scientia Agricola* 62: 102-110.
 - 28 Imamidoost, R., Cant, J. P., **2005**. Non-steady-state modeling of effects of timing and level of concentrate supplementation on ruminal pH and forage intake in high-producing, grazing ewes. *Journal of Animal Science* 83: 1102-1115.
 - 29 Danfaer, A., Huhtanen, P., Uden, P., Sveinbjornsson, J., Volden, H., **2006**. The Nordic dairy cow model, Karoline - description. In: Kebreab, E., Dijkstra, J., Bannink, A., Gerrits, W. J. J., France, J. (eds.) *Nutrient digestion and utilization in farm animals: modelling approaches*. p 383-406. CAB International, Wallingford,

UK.

- 30 Ding, Z., Xu, Y., **2006**. A model for exploring lactic acidosis: 1. Model description. *Belgian Journal of Zoology* 136: 117-124.
- 31 Harvatine, K. J., Allen, M. S., **2006**. Fat supplements affect fractional rates of ruminal fatty acid biohydrogenation and passage in dairy cows. *The Journal of Nutrition* 136: 677-685.
- 32 Offner, A., Sauvant, D., **2006**. Thermodynamic modeling of ruminal fermentations. *Animal Research* 55: 343-365.
- 33 Ribeiro, C. V., Eastridge, J. L., Firkins, N. R., St-Pierre, N. R., Palmquist, D. L., **2007**. Kinetics of fatty acid biohydrogenation in vitro. *Journal of Dairy Science* 90: 1405-1416.
- 34 Seo, S., Lanzas, C., Tedeschi, L. O., Fox, D. G., **2007**. Development of a mechanistic model to represent the dynamics of liquid flow out of the rumen and to predict the rate of passage of liquid in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 90: 840-855.
- 35 Chilibruste, P., Dijkstra, J., Robinson, P. H., Tamminga, S., **2008**. A simulation model "CTR Dairy" to predict the supply of nutrients in dairy cows managed under discontinuous feeding patterns. *Animal Feed Science and Technology* 143: 148-173.
- 36 Moate, P. J., Boston, R. C., Jenkins, T. C., Lean, I. J., **2008**. Kinetics of ruminal lipolysis of triacylglycerol and biohydrogénation of long-chain fatty acids: new insights from old data. *J. Dairy Sci.*, 91, 731-742.
- 37 Seo, S., Lanzas, C., Tedeschi, L. O., Pell, A. N., Fox, D. G., **2009**. Development of a mechanistic model to represent the dynamics of particle flow out of the rumen and to predict rate of passage of forage particles in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 92: 3981-4000.
- 38 Ellis, J. L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Archibeque, S., France, J., Bannink, A., **2010**. Prediction of methane production in beef cattle within a mechanistic digestion model. In: Sauvant, D., Van Milgen, J., Faverdin, P., Friggens, N. (eds.) 7th International Workshop on Modelling Nutrient Digestion and Utilisation in Farm Animals, Paris, France, 10-12 September, 2009. p 181-188.
- 39 Bannink, A., Schijndel, M. W. v., Dijkstra, J., **2011**. A model of enteric fermentation in dairy cows to estimate methane emission for the Dutch National Inventory Report using the IPCC Tier 3 approach. *Animal Feed Science and Technology* 166/167: 603-618.

Annexe 2 : Liste des publications : bases de données « pourcentage de concentrés chez les caprins »

[rumen] : publications entrant dans la base de données « chèvre – rumen »

[zoot] : publications entrant dans la base de données « chèvre – zootechnique »

- Abijaoudé, J. A., Morand-Fehr, P., Tessier, J., Schmidely, P., Sauvant, D. 2000. Influence of forage:concentrate ratio and type of starch in the diet on feeding behaviour, dietary preferences, digestion, metabolism and performance of dairy goats in mid lactation. *Anim. Sci.* 71: 359-368. **[zoot] [rumen]**
- Andrade, H., Bernal, G., Llamas, G. 1996. Influence of different alfalfa:sorghum ratios in the diet of dairy goats on productivity and rumen turnover. *Small Ruminant Res.* 21: 77-82. **[zoot]**
- Andrade, P. V. D., Schmidely, P. 2006. Influence of percentage of concentrate in combination with rolled canola seeds on performance, rumen fermentation and milk fatty acid composition in dairy goats. *Livestock Science* 104: 77-90. **[zoot] [rumen]**
- Archimède, H., Sauvant, D., Hervieu, J., Ternois, F., Poncet, C. 1996. Effects of the nature of roughage and concentrate and their proportion on ruminal characteristics of non lactating goats, consequences on digestive interactions. *Anim. Feed Sci. Technol.* 58: 267-282. **[rumen]**
- Bailoni, L., Andrighetto, I. 1995. Effect of forage:concentrate ratio on digestive and metabolic parameters and milk production in primiparous dairy goats. *Zootec. Nutr. Anim.* 21: 333-344. **[zoot]**
- Calderon, I., Peters, E. J. d., Smith, N. E., Franke, A. A. 1984. Composition of goat's milk: changes within milking and effects of a high concentrate diet. *J. Dairy Sci.* 67: 1905-1911. **[zoot]**
- Cantalapiedra-Hijar, G., Yanez-Ruiz, D. R., Martin-Garcia, A. I., Molina-Alcaide, E. 2009. Effects of forage:concentrate ratio and forage type on apparent digestibility, ruminal fermentation, and microbial growth in goats. *J. Anim. Sci.* 87: 622-631. **[rumen]**
- Cerrillo, M. A., Russell, J. R., Crump, M. H. 1999. The effects of hay maturity and forage to concentrate ratio on digestion kinetics in goats. *Small Ruminant Res.* 32: 51-60. **[rumen]**
- Desnoyers, M., Duvaux-Ponter, C., Rigalma, K., Roussel, S., Martin, O., Giger-Reverdin, S. 2008. Effect of concentrate percentage on ruminal pH and time-budget in dairy goats. *Animal* 2: 1802-1808. **[zoot] [rumen]**
- Eik, L. O. 1991. Effects of feeding intensity on performance of dairy goats in early lactation. *Small Ruminant Res.* 6: 233-244. **[zoot]**
- Hadjipanayiotou, M. 1982. Effect of sodium bicarbonate and of roughage on milk yield and milk composition of goats and on rumen fermentation of sheep. *J. Dairy Sci.* 65: 59-64. **[zoot]**
- Kawas, J. R., Lopes, J., Danelon, D. L., Lu, C. D. 1991. Influence of forage-to-concentrate ratios on intake, digestibility, chewing and milk production of dairy goats. *Small Ruminant Res.* 4: 11-18. **[zoot]**
- Lu, C. D. 1993. Implication of feeding isoenergetic diets containing animal fat on milk composition of alpine does during early lactation. *J. Dairy Sci.* 76: 1137-1147. **[zoot] [rumen]**

- Mele, M., Serra, A., Rafanelli, M. R., Conte, G., Secchiari, P. 2005. Effect of forage/concentrate ratio and soybean oil supplementation on milk yield and quality from dairy goats. *Ital. J. anim. Sci.* 4: 392-394. **[zoot]**
- Molina-Alcaide, E., Martin Garcia, A. I., Aguilera, J. F. 2000. A comparative study of nutrient digestibility, kinetics of degradation and passage and rumen fermentation pattern in goats and sheep offered good quality diets. *Livest. Prod. Sci.* 64: 215-223. **[rumen]**
- Ollier, S., Leroux, C., Foye, A. d. l., Bernard, L., Rouel, J., Chilliard, Y. 2009. Whole intact rapeseeds or sunflower oil in high-forage or high-concentrate diets affects milk yield, milk composition, and mammary gene expression profile in goats. *J. Dairy Sci.* 92: 5544-5560. **[zoot]**
- Rapetti, L., Tamburini, A., Crovetto, G. M., Galassi, G., Succi, G. 1997. Energy utilization of diets with different hay proportions in lactating goats. *Zootec. Nutr. Anim.* 23: 317-328. **[zoot]**
- Santini, F. J., Lu, C. D., Potchoiba, M. J., Coleman, S. W. 1991. Effects of acid detergent fiber intake on early postpartum milk production and chewing activities in dairy goats fed alfalfa hay. *Small Ruminant Res.* 6: 63-71. **[zoot]**
- Santini, F. J., Lu, C. D., Potchoiba, M. J., Fernandez, J. M., Coleman, S. W. 1992. Dietary fiber and milk yield, mastication, digestion, and rate of passage in goats fed alfalfa hay. *J. Dairy Sci.* 75: 209-219. **[zoot] [rumen]**
- Sauvant, D., Chilliard, Y., Bas, P., Morand-Fehr, P. 1979. Goat adipose tissue mobilisation and milk production level. *Ann. Rech. Vet.* 10: 404-407. **[zoot]**
- Yanez Ruiz, D. R., Moumen, A., Martin Garcia, A. I., Molina Alcaide, E. 2004. Ruminant fermentation and degradation patterns, protozoa population, and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on two-stage olive cake: Effect of PEG supply. *J. Anim. Sci.* 82: 2023-2032. **[rumen]**
- Zambom, M. A., Alcalde, C. R., Silva, K. T., Macedo, F. A. F., Santos, G. T., Borghi, E. L., Barbosa, E. D. 2005. Effects of different forage:concentrate ratios on intake, digestibility, and milk yield of Saanen goats. *Rev. Bras. Zootecn.* 34: 2505-2514. **[zoot]**

Nous avons écarté les articles suivants :

- Bava, L., Rapetti, L., Crovetto, G. M., Tamburini, A., Sandrucci, A., Galassi, G., Succi, G. 2001. Effects of a nonforage diet on milk production, energy, and nitrogen metabolism in dairy goats throughout lactation. *J. Dairy Sci.* 84: 2450-2459.
- El-Gallad, T. T., Gihad, E. A., Allam, S. M., El-Bedawy, T. M. 1988. Effect of energy intake and roughage ratio on the lactation of Egyptian Nubian (Zaraibi) goats. *Small Ruminant Res.* 1: 327-341.

Annexe 3 : Communications à des congrès (posters et abstracts)

Communication 1 :

Serment, A., Schmidely, P., Giger-Reverdin, S. et Sauvant, D. 2010. Effet du pourcentage de concentrés sur les paramètres ruminiaux et sanguins, la production et la qualité du lait chez la chèvre en milieu de lactation. *Rencontres Recherches Ruminants 17*: 305. (Poster)

Effet du pourcentage de concentrés sur les paramètres ruminiaux et sanguins, la production et la qualité du lait chez la chèvre en milieu de lactation Effect of the percentage of concentrate on ruminal and plasmatic parameters, milk production and quality in mid-lactation goats.

SERMENT A. (1, 2), SCHMIDELY P. (1, 2), GIGER-REVERDIN S. (1, 2), SAUVANT D. (1, 2)

(1) AgroParisTech, UMR 791 MoSAR, 16 rue Claude Bernard, 75005 Paris, France

(2) INRA, UMR 791 MoSAR, 16 rue Claude Bernard, 75005 Paris, France

INTRODUCTION

L'intensification de la production laitière caprine passe, en partie, par une augmentation de la part des concentrés (CO) dans la ration. Les principales réponses zootechniques au % CO ont été modélisées (INRATON, Sauvant *et al.*, 2007). Mais, les données concernant l'effet du % CO à la fois sur des paramètres fermentaires ruminiaux et plasmatique (urée), et sur la production et la composition fine du lait sont rares.

1. MATERIEL ET METHODES

Treize chèvres (95 ± 4 j post-partum), porteuses d'une canule ruminale, ont reçu *ad libitum*, pendant 42 j, un régime riche (H) (sur base MS : CO : 70 % ; 0,95 UFL ; 114 g PDIN ; 114 g PDIE et 36 g NDF, n = 6) ou pauvre (B) en CO (CO : 35 %, 0,83 UFL ; 113 g PDIN ; 104 g PDIE et 41 g NDF ; n = 7). Ces rations complètes sont composées de foin de graminées, de luzerne déshydratée, de concentré commercial (Agralys Aliment, Châteaudun, France), de pulpes de betterave surpressées, de tourteaux de soja et de sels de Ca d'huile de palme. Elles ont été formulées pour être iso-acides gras (AG = 2,5 % MS). Des prélèvements ruminiaux répétés (pH, acides gras volatils, ammoniac (NH₃)) et sanguins (urée) après la distribution du repas du matin ont été réalisés en début et fin d'essai (données sur les 2 périodes moyennées). La production laitière (PL), le TB et le TP du lait ont été mesurés chaque semaine durant tout l'essai. La composition en AG du lait a été analysée en début et fin d'essai, et moyennée. Les données (sauf AG) ont été analysées par un modèle mixte incluant le régime, le temps, l'animal et l'interaction régime*temps. Aucune interaction régime*temps n'a été détectée. Une analyse en composantes principales (ACP), visant à caractériser les relations entre les paramètres ruminiaux et le profil en AG du lait, a été réalisée.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. PARAMETRES RUMINAUX ET PLASMATIQUES

Le pH du rumen et le rapport acétate/propionate (C2/C3) du lot H sont inférieurs à ceux du lot B (Tableau 1), en accord avec les résultats de Cantalapiedra-Hijar *et al.* (2009). Les concentrations en NH₃ ruminal et en urée plasmatique ont été réduites dans le lot H, pouvant refléter une captation accrue du NH₃ par les micro-organismes, probablement du fait d'une croissance microbienne stimulée par la forte disponibilité en énergie du régime H.

2.2. PRODUCTION ET QUALITE DU LAIT

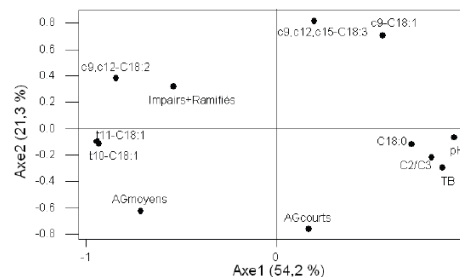
L'ingestion d'énergie et le bilan énergétique ont été augmentés pour le lot H par rapport au lot B (équilibré pour

ce dernier). La PL a répondu positivement à l'augmentation du % CO (Tableau 1). La sécrétion de protéines a été augmentée, mais pas le TP. En l'absence de modification de la sécrétion de MG (Tableau 1), le TB a été diminué par le % CO, probablement dû à un effet de dilution.

2.3. RELATION ENTRE PROFIL EN AG DU LAIT ET PARAMETRES RUMINAUX

Les deux 1^{ères} composantes principales de l'ACP expliquent 75 % de la variance totale. Sur l'axe 1, les variables pH, C2/C3 et TB sont associées traduisant l'effet majeur des régimes. Ces 3 variables sont positivement liées aux % en C18:0 et c9-C18:1 et négativement aux % en t10 et t11-C18:1. Le % en c9,c12-C18:2 est accru pour le régime H pouvant être relié à une teneur en cet AG plus élevée dans ce régime (33 % AG totaux vs 17 % pour le régime B) et par une réduction de la biohydrogénation ruminale liée au % CO. L'axe 2 traduit la variabilité individuelle de l'efficacité globale de transfert du c9, c12, c15-C18:3 alimentaire dans le lait opposée à la synthèse mammaire d'AG.

Figure 1 Projection des variables dans le plan 1-2 de l'ACP réalisée sur le profil en AG du lait et les paramètres ruminiaux



CONCLUSION

Nos résultats confirment les données de la littérature pour la plupart des paramètres mesurés (excepté les concentrations en NH₃ ruminal et en urée plasmatique). Les AG du lait pourraient être un bon indicateur non-invasif des fermentations ruminales du fait des associations entre ces paramètres.

Cantalapiedra-Hijar, G., Yáñez-Ruiz, D.R., Martín-García, A. I., Molina-Alcaide, E., 2009. *J. Anim. Sci.* 87, 622-631
Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., Meschy, F., 2007. *Alimentation des bovins, ovins et caprins*. Ed. Quae, Versailles, France, 137-148.

Tableau 1 : Effet du pourcentage de concentrés sur les paramètres ruminiaux, plasmatiques, et laitiers

	Paramètres ruminiaux et plasmatiques				Energie (UFL/j)		Lait				
	pH	C2/C3	[N-NH ₃] mmol/l	[N-urée] plasma mmol/l	Ingestion	Bilan	PL kg/j	TB g/kg	MG g/j	TP g/kg	Protéines g/j
Régime H	6,04	2,84	4,97	18,45	2,87	0,37	3,7	35,1	127	31,8	116
Régime B	6,41	3,76	9,04	24,15	2,17	-0,06	2,9	41,6	124	32,6	95
SEM	0,062	0,179	0,795	1,445	0,123	0,079	0,18	2,07	6,6	0,67	4,7
P	<0,001	<0,01	<0,01	<0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	NS	NS	<0,01

Effet du pourcentage de concentrés sur les paramètres ruminiaux et sanguins, la production et la qualité du lait chez la chèvre en milieu de lactation



A. Serment, P. Schmidely, S. Giger-Reverdin, D. Sauvant
UMR INRA-AgroParisTech MoSAR, 16 rue Claude Bernard, 75005 Paris, France

Introduction

L'intensification des facteurs de production en élevage caprin passe souvent par l'augmentation de la part des concentrés dans la ration dont les lois de réponses multiples ont été peu étudiées.

Objectifs

Etude « multicritères » de l'effet du **pourcentage de concentrés (%C)** chez la chèvre laitière : production et qualité du lait, paramètres du rumen et plasmatiques.

Matériel et Méthodes

Animaux : 13 chèvres en lactation, canulées du rumen

Régimes : Comparaison de 2 rations complètes : riche (**H**) vs pauvre (**B**) en concentrés

Matières premières : Foin de graminées, luzerne déshydratée, concentré commercial (Agralyx, Châteaudun), pulpes de betteraves surpressées, tourteaux de soja, sels de Ca d'huile de palme

Composition (/ kg MS)	% C	UFL	PDIN (g)	PDIE (g)	NDF (g)	AG (g)
H (n = 6)	70	0,95	114	114	360	28,1
B (n = 7)	35	0,83	113	104	409	23,3

Ad libitum

Début d'essai : 95 ± 4 j *post-partum*

Durée de l'essai : 6 semaines

Mesures : ► Suivi zootechnique : Ingestion, Bilan énergétique

► Lait : Production Laitière, TP, TB, Profil en AG

► Jus de rumen et plasma (cinétiques post-prandiales en début et fin d'essai) : pH, [AGV], [NH₃], [Urée]_{plasma}

Statistiques :

① Modèle mixte : $Y = \text{Régime} + \text{Temps} + \text{Animal} + \text{Régime} * \text{Temps} + \varepsilon$ ② ACP : Paramètres du rumen et AG du lait

Résultats et Discussion

① Effet du %C sur les paramètres du rumen, plasmatiques et du lait

	Rumen et Plasma				Energie (UFL/j)		Lait				
	pH	C2/C3	[N-NH ₃] mmol/l	[N-urée plasma] mmol/l	Ingestion	Bilan	PL kg/j	TB g/kg	MG g/j	TP g/kg	Protéines g/j
H	6,04	2,84	4,97	18,45	2,87	0,37	3,72	35,1	127	31,8	116
B	6,41	3,76	9,04	24,15	2,17	-0,06	2,94	41,6	124	32,6	95
SEM	0,062	0,179	0,795	1,445	0,123	0,079	0,176	2,07	6,6	0,67	4,7
Effet du % C	***	**	**	*	***	***	***	**	NS	NS	**

Croissance microbienne stimulée par forte disponibilité en énergie pour H = ↗ captation du NH₃

Effet dilution

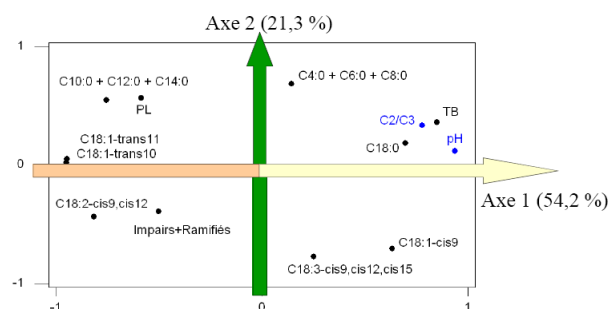
② Projection des variables dans le plan 1-2 de l'ACP réalisée sur le profil en AG du lait et les paramètres du rumen

La CP n°1 traduit l'influence de l'augmentation du %C :

- ↗ : AG trans

- ↘ : pH, C2/C3, TB, C18:0 et C18:1-c9

La CP n°2 traduit la synthèse mammaire (AG courts et moyens) opposée aux AG longs (inhibition de la synthèse).



Conclusion

- Résultats confirmant les données de la littérature ([N-NH₃] ruminale et [N-urée] plasmatique moins classiques)
- AG du lait pouvant être un bon indicateur non-invasif des fermentations ruminales (associations entre paramètres du rumen et AG du lait au niveau de l'ACP)

Communication 2 :

Serment, A. et Giger-Reverdin, S. 2012. Evolution de la variabilité individuelle du comportement d'ingestion de la chèvre laitière liée à un changement de régime. Rencontres Recherches Ruminants 19. (Poster accepté)

Evolution de la variabilité individuelle du comportement d'ingestion de la chèvre laitière liée à un changement de régime
Evolution of the individual variability of intake behaviour in dairy goat due to diet modification

SERMENT A. (1, 2), GIGER-REVERDIN S. (1, 2)

(1) AgroParisTech, UMR 791 MoSAR, 16 rue Claude Bernard, 75005 Paris, France

(2) INRA, UMR 791 MoSAR, 16 rue Claude Bernard, 75005 Paris, France

INTRODUCTION

Les études sur le comportement d'ingestion portent généralement sur la comparaison de régimes. Or, il existe une variabilité individuelle non négligeable (Vasilatos et Wangsness, 1980).

L'objectif de cette étude a été d'étudier la variabilité individuelle du comportement d'ingestion de chèvres laitières alimentées avec un régime donné et de suivre, sur plusieurs semaines, les changements induits par une modification du pourcentage de concentrés de la ration.

1. MATERIEL ET METHODES

Treize chèvres en lactation (95 ± 4 jours post-partum), logées en case individuelle, ont été suivies sur une période de 10 semaines. Elles ont été alimentées *ad libitum* en deux distributions (2/3 le soir et 1/3 le matin, pour respecter les intervalles entre les traites). En semaine 1, elles ont reçu une ration moyenne à 52,5 % de concentrés « M » (0,89 UFL ; 113 g PDIN ; 109 g PDIE sur la base MS). Après une période de transition de deux semaines, elles ont été alimentées pendant 7 semaines avec, soit une ration riche « R » (70 % de concentrés ; 0,95 UFL ; 114 g PDIN ; 114 g PDIE ; n = 6), soit pauvre « P » en concentrés (35 % de concentrés ; 0,83 UFL ; 113 g PDIN ; 104 g PDIE ; n = 7). Les cinétiques d'ingestion de la MS ont été enregistrées en semaines 1, 4 et 10, pour chaque chèvre, pendant 4 jours consécutifs par semaine, grâce à des auges placées sur jauge de contrainte. Ce système a permis d'enregistrer la masse du contenu des auges toutes les 2 minutes (Desnoyers *et al.*, 2008). Les données du repas du soir ont été étudiées, car c'est le plus gros repas de la journée et il y a moins de perturbations liées aux activités humaines. La vitesse d'ingestion a été estimée par le calcul de la proportion de MS ingérée pendant les 90 minutes suivant la distribution du repas par rapport à la MS ingérée totale du repas (P90). Le comportement d'ingestion ayant été répétable entre les jours pour un même animal, les données d'enregistrement ont été moyennées par semaine.

2. RESULTATS ET DISCUSSION**2.1. VARIABILITE INDIVIDUELLE DE LA CINETIQUE D'INGESTION AVEC UN REGIME COMMUN**

En semaine 1, sur la même ration (M), les chèvres ont présenté une variabilité individuelle importante de leur comportement d'ingestion pendant les premières heures suivant la distribution du repas (Figure 1). Les animaux ont été classés selon le paramètre P90 : 5 ont ingéré plus de 70 % de leur repas en 90 minutes (mangeurs rapides) et 5 ont ingéré moins de 50 % de leur repas dans cette durée (mangeurs lents). Trois chèvres se sont situées dans le continuum entre ces deux groupes. Cette forte variabilité du comportement d'ingestion suggère, pour de prochaines études, la nécessité d'équilibrer les mangeurs rapides et lents, observés avec le régime commun, au sein des lots expérimentaux. En effet, du fait de la relation étroite entre le comportement d'ingestion et les dynamiques fermentaires (Giger-Reverdin *et al.*, 2009), sa non-prise en compte pourrait biaiser les résultats.

2.2. EFFET DU POURCENTAGE DE CONCENTRES

Le comportement d'ingestion a évolué différemment selon le régime distribué. Les chèvres alimentées avec la ration P ont conservé le comportement d'ingestion qu'elles avaient en semaine 1. Celles recevant la ration R, plus acidogène que la ration P, ont diminué leur vitesse d'ingestion (P90, Figure 2), réduisant ainsi la variabilité individuelle du groupe en termes de P90. Desnoyers *et al* (2008) ont montré des modifications du comportement d'ingestion chez des chèvres en acidose ou ayant été en acidose.

Figure 1 Cinétique de la proportion de MS ingérée pendant le repas du soir. Classement des animaux suivant le P90.

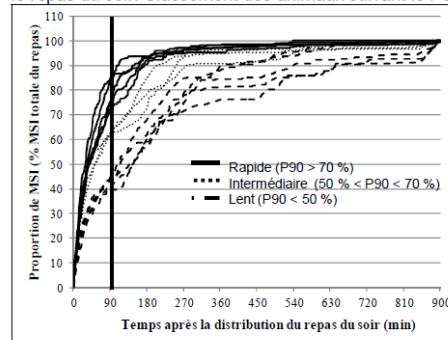
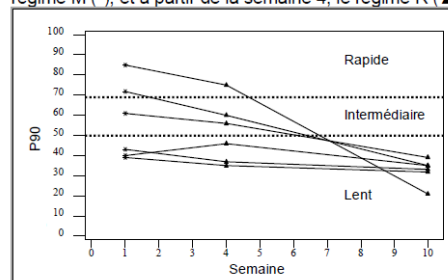


Figure 2 Evolution de la vitesse d'ingestion (P90) au cours des semaines pour les chèvres recevant en semaine 1, le régime M (*), et à partir de la semaine 4, le régime R (▲).

**CONCLUSION**

Cette étude a permis d'identifier une adaptation du comportement d'ingestion des chèvres lié à leur régime. Seules des études de moyen ou long terme permettent d'identifier ce type d'adaptation.

Desnoyers, M., Giger-Reverdin, S., Duvaux-Ponter, C., Lebarbier, E., Sauvant, D. 2008. Renc. Rech. Ruminants, 15, 339-343.

Giger-Reverdin, S., Duvaux-Ponter, C., Sauvant, D. 2009. In Chilliard, Y., Glasser, F., Faulconnier, Y., Bocquier, F., Veissier, I., Doreau, M. (Eds), Proceedings of the XIth ISRP, Clermont-Ferrand, France. Wageningen Academic Publishers, Pays-Bas. 792-793.

Vasilatos, R., Wangsness, P., J., 1980. J. Dairy Sci. 63, 412-416.

Evolution de la variabilité individuelle du comportement d'ingestion de la chèvre laitière liée à un changement de régime



A. Serment, S. Giger-Reverdin

UMR INRA-AgroParisTech MoSAR, 16 rue Claude Bernard, F75005 Paris, France



Introduction et objectifs

Les études sur le comportement d'ingestion portent généralement sur la comparaison de régimes. Or, il existe une variabilité individuelle non négligeable (Vasilatos et Wangsness, 1980).

Objectif 1 : Etudier la **variabilité individuelle du comportement d'ingestion** de chèvres laitières alimentées avec un **régime commun**

Objectif 2 : Suivre les changements de comportement d'ingestion induits par un **changement de ration** (modification du pourcentage de concentrés de la ration)

Matériel et Méthodes

Semaine 1 :

13 Chèvres en lactation
à 95 ± 4 j *post-partum*
Ration moyenne (M) à 52 % C
UFL = 0,89 ; PDIN = 113 g ; PDIE = 109 g (/kg MS)

Transition alimentaire

Semaines 4 à 10 :

7 Chèvres
Ration pauvre (P) à 35 % C
UFL = 0,83 ; PDIN = 113 g ; PDIE = 104 g (/kg MS)

6 Chèvres
Ration riche (R) à 70 % C
UFL = 0,95 ; PDIN = 114 g ; PDIE = 114 g (/kg MS)



Auge placée sur jauge de contrainte (Desnoyers et al., 2008)
Mesure de la quantité dans l'auge toutes les 2 min

Logement en cases individuelles

Alimentation *ad libitum*

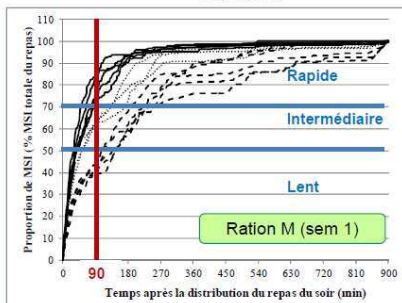
Mesures : Cinétique d'ingestion de la MS en Sem 1, 4 et 10 pendant 4 j consécutifs / sem.

Vitesse d'ingestion estimée par le calcul suivant :

$$P90 = \frac{\text{MSI à 90 min après distribution du repas}}{\text{MSI totale du repas}}$$

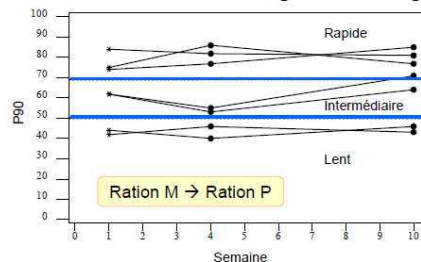
Résultats et Discussion

Cinétiques d'ingestion avec un régime commun

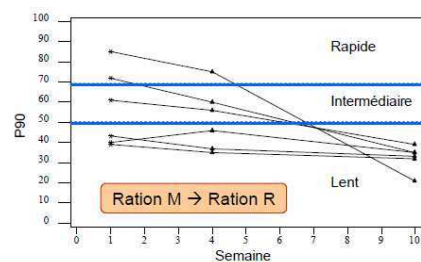


- Variabilité individuelle importante du comportement d'ingestion
- Classement des animaux en trois groupes selon le P90 : mangeurs rapide, intermédiaire et lent

Effet d'un changement de régime



→ Pas de changement de la vitesse d'ingestion



→ Diminution de la vitesse d'ingestion

Conclusions

- Identification d'une adaptation du comportement d'ingestion des chèvres à leur régime.
- Seules des études sur le moyen / long terme permettent d'identifier ces changements de comportement, qui s'expriment sur le terrain.

Références :

- Desnoyers, M., Giger-Reverdin, S., Duvaux-Ponter, C., Lebarbier, E., Sauvant, D. 2008. Rencontres Recherches Ruminants, 15, 339-343.
- Vasilatos, R., Wangsness, P.J., 1980. J. Dairy Sci. 63, 412-416.

Communication 3 :

Serment, A. et Sauvant, D. 2009. *Physicochemical mechanistic model of an in vitro gas test system. 7th International Workshop on Modelling Nutrient Digestion and Utilisation in Farm Animals, Paris, France, 10-12 September, 2009. p 33. INRA, AgroParisTech, Paris, France. (Poster)*

PHYSICOCHEMICAL MECHANISTIC MODEL OF AN *IN VITRO* GAS TEST SYSTEM

Serment A.*, Sauvant D.,

INRA-AgroParisTech Physiologie de la Nutrition et Alimentation, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris Cedex 05 FRANCE

Although rumen functioning is governed by both biological and physicochemical laws, few current rumen models have developed the two aspects (Pitt *et al*, 1996). This study proposes a mechanistic model which focuses specifically on the physicochemical description of relations between pH, bicarbonates and gas. This first version was developed in the context of an *in vitro* device.

Due to its high level of standardization and its use by several research teams, this work is based on results obtained with a syringe gas test method (Menke *et al*, 1979) which can be adapted to study the dynamics of *in vitro* digestion for 48 hours (Maaroufi *et al*, 2009). The system is thus a syringe in which a feedstuff is incubated with rumen fluid and a buffer solution for 48 hours. Total model is comprised of 14 compartments representing the main components of the feedstuff, microorganisms, fermentation products and bicarbonate of the buffer solution. It describes the processes of degradation of proteins to peptides and ammonia (N-NH₃) and of fibre and non-fibre carbohydrates to soluble carbohydrates and then to volatile fatty acids (VFA), carbon dioxide (CO₂) and methane (CH₄). Only one population of microorganisms was considered. The ATP produced by the fermentation of soluble carbohydrates provided energy for maintenance and growth of microbes. The lysis of microbes was taken into account by the use of a fractional rate of microbial lysis which inversely varies with a fractional microbial growth rate. The basic parameters of the model were estimated from general knowledge about rumen digestion. They remained constant. Only fractional degradation rates were calibrated to the tested feedstuff. The major outputs were: concentrations in the fermentation juice of VFA, of N-NH₃ and of soluble carbohydrates, pH and production of gas.

As said before, a specific part of this model focuses on describing the dynamics of pH and gas production. This part contains seven compartments. Four of them concern aqueous and gaseous forms of both CO₂ and CH₄. Bicarbonate of the buffer solution is the fifth one. As pK_a values of the different VFA are comparable, VFA are represented by only two compartments: a weak acid and its associated base.

Gas produced in the syringe was from two origins: CO₂ and CH₄ directly produced by the fermentation of soluble carbohydrates, assuming a constant ratio of 1 between gas and VFA, and CO₂ produced by the acid-base reaction between VFA and bicarbonate of the buffer solution. The dynamics of pH can be deduced by relative concentrations of the two forms of the VFA, assuming the medium value of pK_a. As CO₂ and CH₄ are produced in the aqueous phase, there is a priori a delay between their production rate and their appearance in the gaseous phase. It appeared necessary to describe gas diffusion between these phases. When the aqueous phase is upper-saturated in gas, a net flow of gas results until an equilibrium state is reached with the gaseous phase as described by Henry's law.

This model has been calibrated from experimental data of pea seed fermentations in syringes. Dynamics of predicted values for concentration of N-NH₃ and total gas production were realistic with regression coefficients of 1.06±0.020 and 0.93±0.015 between observed and predicted values, respectively (R²=0.97, RMSE=11.12mg.L⁻¹, n=7 and R²=0.99, RMSE=1.2mL, n=7). Improvements must be made for pH and concentration of soluble carbohydrates. This model constitutes a physicochemical kernel which can be included as a submodel in a larger one.

Maaroufi, C., Chapoutot, P., Sauvant, D. & Giger-Reverdin, S. 2009. Fractionation of pea flour with pilot scale sieving. II. *In vitro* fermentation of pea seed fractions of different particle sizes. *Animal Feed Science and*

Technology, 154, 135-150.

Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D. & Schneider, W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *Journal of Agricultural Science, UK*, 93, 217-222.

Pitt, R. E., Kessel, J. S. v., Fox, D. G., Pell, A. N., Barry, M. C. & Soest, P. J. v. 1996. Prediction of ruminal volatile fatty acids and pH within the net carbohydrate and protein system. *Journal of Animal Science*, 74, 226-244.

* Email: amelie.serment@agroparistech.fr

Physicochemical mechanistic model of an *in vitro* gas test system

A. Serment and D. Sauvant

UMR INRA-AgroParisTech Physiologie de la Nutrition et Alimentation,
16 rue Claude Bernard, 75005 PARIS FRANCE



Introduction:

- Rumen functioning is governed by both biological and physicochemical laws.
- But few current models have developed the second aspect (Pitt *et al*, 1996).

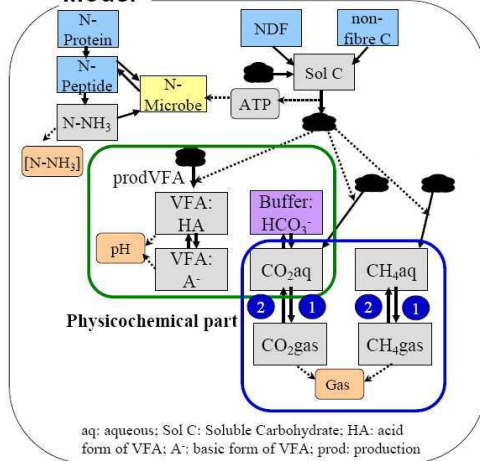
Objectives:

- Simulate digestion dynamics observed in an *in vitro* device (Menke *et al*, 1979)
- Describe pH dynamics and gas production → **Physicochemical part**

Model Description:

- **Biological System:** A syringe in which a **feedstuff** is incubated with **rumen fluid** and a **buffer solution** for 48h (Maaroufi *et al*, 2009)
- **Calibration** from experimental data of pea seed fermentations

Model



pH dynamics

Hypothesis: Equilibrium state reached at each time step



Concentration	Status at t	[HCO ₃ ⁻] _t	[HA] _t	[CO ₂ aq] _t	[A ⁻] _t
Status at t+dt	[HCO ₃ ⁻] _{t+dt}	[HCO ₃ ⁻] _t - X	[HA] _t - X	[CO ₂ aq] _t + X	[A ⁻] _t + X
			+ [prodVFA] _{dt}	+ [Flow CO ₂] _{dt}	

$$\text{Equilibrium constant} = \frac{[\text{HCO}_3^-]_{t+dt} * [\text{HA}]_{t+dt}}{[\text{CO}_2\text{aq}]_{t+dt} * [\text{A}^-]_{t+dt}} = \frac{10^{-\text{pKaVFA}}}{10^{-\text{pKaBuffer}}}$$

Quadratic equation at each time step → **Solution X**

pH calculation by Henderson-Hasselbach equation:

$$\text{pH} = \text{pKa}_{\text{VFA}} + \text{Log} [\text{A}^-]/[\text{HA}]$$

Gas production

Hypothesis: Delay between production of gas (aqueous phase) and appearance in gaseous phase

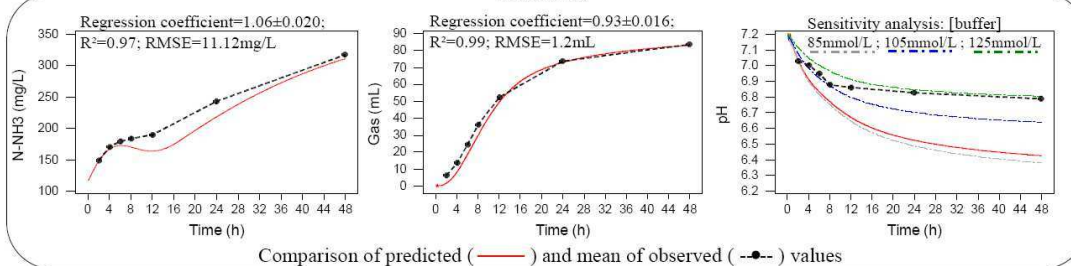
→ Flow ① = $k_{\text{aq} \rightarrow \text{gas}} * [\text{GAS}]_{\text{aq}}$

Flow ② = $k_{\text{gas} \rightarrow \text{aq}} * P_{\text{GAS}}$ (with P_{GAS} : partial pressure)

If equilibrium, Henry's law: $[\text{GAS}]_{\text{aq}} = K * P_{\text{GAS}}$
with $K = \text{constant} = k_{\text{gas} \rightarrow \text{aq}} / k_{\text{aq} \rightarrow \text{gas}}$

→ Flow ② = $k_{\text{aq} \rightarrow \text{gas}} * K * P_{\text{GAS}}$

Results



Conclusion:

- Satisfying results but improvements must be made for pH (underestimation of the buffer capacity?)
- External validation is expected on data from the literature (VFA and data on microbes were not included in calibration data).
- The physicochemical part can be included as a submodel in a larger model of rumen.

Maaroufi *et al*. 2009. *Animal Feed Science and Technology*, doi: 10.1016/j.anifeeds.2009.07.008.
Menke *et al*. 1979. *Journal of Agricultural Science*, (93), 217-222.
Pitt *et al*. 1996. *Journal of Animal Science*, (74), 226-244

Communication 4 :

Serment, A. et Sauvant, D. 2009. *Modèle mécaniste physico-chimique de fermenteur in vitro gaz-test* 3èmes Journées d'Animation Scientifique du Département de Physiologie Animale et Systèmes d'Élevage, Tours, France, 7-9 Octobre, 2009. p 116. INRA, Tours, France. (Communication orale)

MODELE MECANISTE PHYSICO-CHIMIQUE DE FERMENTEUR *IN VITRO* GAZ-TEST

Amélie SERMENT*, Daniel SAUVANT
UMR PNA, INRA AgroParisTech PARIS Cedex 05
amelie.serment@agroparistech.fr

INTRODUCTION

Bien que le fonctionnement du rumen soit régi à la fois par des lois biologiques et des lois physico-chimiques, rares sont les modèles de rumen qui ont cherché à intégrer ces deux aspects (Pitt *et al.*, 1996). En effet, dans les modèles mécanistes, les variables physico-chimiques sont généralement prédites par des équations empiriques. L'objectif du travail a été de développer un modèle mécaniste simple qui soit à la fois capable de simuler les phénomènes de digestion observés en culture *in vitro* de jus de rumen, et qui décrive de manière spécifique les lois physico-chimiques expliquant les dynamiques d'évolution du pH et de formation de gaz.

MATERIEL ET METHODES

Du fait de son niveau de standardisation et de son utilisation par de nombreuses équipes de recherche, ce travail est basé sur des résultats obtenus avec la méthode du gaz-test, appelée également méthode des seringues (Menke *et al.*, 1979), qui a été adaptée à l'étude de la dynamique de digestion *in vitro* d'aliments pendant 48 heures (Maaroufi *et al.*, 2009).

Le système considéré est une seringue dans laquelle un aliment est incubé avec un mélange de jus de rumen et d'une solution tampon. Le modèle comprend 15 compartiments représentant les principaux composants chimiques de l'aliment testé, les micro-organismes (compartiment unique) et les produits des fermentations. Il décrit les phénomènes de dégradation et de fermentation de l'aliment par les microorganismes. La force motrice du modèle est la population microbienne dont l'énergie nécessaire à son entretien et à sa croissance provient de la fermentation des glucides en Acides Gras Volatils (AGV) et dont la lyse fournit du substrat azoté (peptide et N-NH₃) et des chaînes carbonées au milieu fermentaire.

Une partie spécifique du modèle décrit les réactions physico-chimiques existant entre les AGV, représentés par un couple acido-basique unique (pKa = 4,8), les bicarbonates de la solution tampon, le CO₂ et le CH₄. Les gaz ont deux origines possibles : une production directe consécutive à la fermentation des glucides solubles en AGV ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de glucides solubles dégradés, avec un rapport de 1 entre les AGV et les gaz) et une production indirecte de CO₂ par la

réaction acido-basique entre les AGV et les bicarbonates. Le pH peut être déduit par les pKa et le rapport des concentrations des couples AGV et bicarbonate/CO₂. Le CO₂ et le CH₄ sont produits en phase aqueuse, ce qui peut introduire un délai entre le moment de leur formation et leur apparition dans la phase gazeuse. Les phénomènes de diffusion (loi de Henry) entre ces deux phases sont décrits.

La détermination d'une partie des paramètres du modèle a été réalisée sur la base de connaissances générales sur la digestion microbienne issues de la littérature. Les valeurs les plus spécifiques ont été ajustées à partir de données expérimentales de cinétiques de fermentation *in vitro* de pois (7 durées d'incubation) (Maaroufi *et al.*, 2009).

Le modèle simule les dynamiques de production de gaz, de pH, de concentrations en N-NH₃ et en glucides solubles pendant 48 heures d'incubation.

RESULTATS

Les dynamiques de concentrations en N-NH₃ et de production de gaz sont correctement simulées, avec des coefficients de régression respectivement de $1,06 \pm 0,020$ et $0,93 \pm 0,015$ entre les valeurs observées et prédites ($R^2 = 0,97$, ETR = 11,12 mg.L⁻¹, n = 7 et $R^2 = 0,99$, ETR = 1,2 ml, n = 7). L'ordre de grandeur du pH et des concentrations en glucides solubles prédits par le modèle est respecté, mais la description de leur dynamique est imparfaitement représentée.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Malgré sa grande simplicité, le modèle proposé aboutit à des résultats satisfaisants. Des améliorations devront être apportées pour les dynamiques d'évolution du pH et de concentrations en glucides solubles. Une validation externe du modèle sera faite sur des données issues de la littérature et notamment des valeurs en AGV qui n'avaient pas été mesurées dans le jeu de données utilisé pour la calibration des paramètres. Ultérieurement, ce modèle pourra être intégré comme sous-modèle dans des modèles de rumen *in vivo* plus complets.

REFERENCES

- Maaroufi *et al.* 2009. Anim. Feed Sci. Technol. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2009.07.008.
Menke *et al.* 1979. J. Agric. Sci. 93:217-222.
Pitt *et al.* 1996. J. Anim. Sci. 74: 226-244.

Communication 5 :

Serment, A., Giger-Reverdin, S., Sauvant S. 2012. Modelling C and H rumen stoichiometry from *in vitro* measurements. 8th INRA-Rowett Symposium on Gut Microbiology, Gut microbiota: friend or foe? Clermont-Ferrand, France, 17-20 Juin, 2012, 134 (Poster)

Modelling C and H rumen stoichiometry from *in vitro* measurements. A Serment^{a, b}, S Giger-Reverdin^{a, b}, D Sauvant^{a, b}. ^aAgroParisTech, UMR MoSAR, F75005 Paris, ^b INRA UMR 791 MoSAR, F 75005 Paris

Stoichiometry of C and H in rumen fermentation is a key-point to understand the partition of degradable dietary compounds between useful fermentation products (volatile fatty acids or VFA and microbial biomass) and waste products such as methane (CH₄) and carbon dioxide (CO₂).

In this context, *in vitro* batch methods can be useful because VFA and gas productions are much easier to measure compared to *in vivo* methods.

Fermentation of two substrates with very different carbohydrate composition corresponding to two diets with either 35 or 70% of concentrate, with or without oil addition was studied *in vitro* with the Hohenheimer Futterwert Test (HFT) procedure. Volatile fatty acid production was measured after three hours of incubation, such as gas production and composition (CH₄, CO₂ and hydrogen or H₂). Gas production and composition, and molecular H₂ production were calculated from VFA production according to classic stoichiometric relationships^{1,2}. *In vitro* gas production has two origins: degradation of substrates (direct gas) and buffering of VFA (indirect gas).

The prediction of total gas was accurate with a slope equal to 1 when compared with the measured data, which partly validates chosen stoichiometry coefficients. However, the actual CH₄ prediction was curvilinearly linked with the measured one. This response, according to decreasing marginal returns, could be explained by other molecular H₂ sinks (microbial synthesis, acetogenesis, fatty acid biohydrogenation, ...). Further, chosen stoichiometric coefficients overestimated theoretical CH₄ production in comparison with the measured one. This can question this usual way to model CH₄ production.

This work also shows that indirect gas might be important (51.2 ± 2.60% of total gas production) that could explain some discrepancies in the HFT method when predicting intake or digestibility of feeds.

1. Blümmel, M., *et al.* (1999). A note on the stoichiometrical relationship of short chain fatty acid production and gas formation *in vitro* in feedstuffs of widely differing quality. *J. anim. Physiol. anim. Nutr.* 81, 157-167.

2. Demeyer, D.I., 1991. Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and hindgut, In: Jouany, J.-P. (Ed.), *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*, INRA Editions, Paris, France, pp. 217-237.

Modelling C and H rumen stoichiometry from *in vitro* measurements

A. Serment, S. Giger-Reverdin, D. Sauvant

UMR INRA-AgroParisTech MoSAR, 16 rue Claude Bernard, F75005 Paris, France

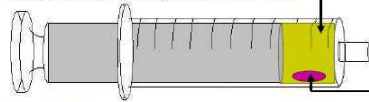


Introduction and objectives



Material and Methods

***In vitro* study : Syringe's method** (Menke *et al.*, 1979)



Inoculum: Buffer solution + Rumen fluid

Rumen fluid from goats fed :
 - Total mixed rations (TMR) with 35% concentrate (L) or, *Li vs. Hi*
 - TMR with 70% concentrate (H).

Substrate:

- TMR L or TMR H (*Li vs. Hi*);
 - with or without oil supplementation (*Oil suppl*)

Measurements at 3h of incubation:

► VFA production + Gas production and composition (CO₂ and CH₄)

Estimation of gas production from measured VFA production (mmol / mmol produced VFA)

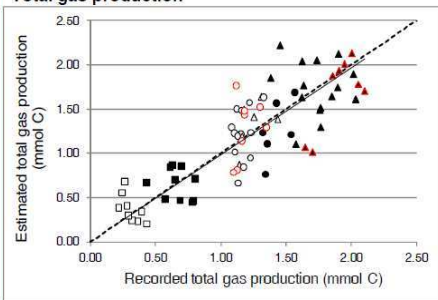
	Direct gas	Indirect gas	Molecular H ₂	Potential CH ₄
Acetate	1	1	2	0.5
Propionate	0	1	-1	-0.25
Butyrate	2	1	2	0.5
Minor VFA	1	1	0	0

Total gas = direct gas + indirect gas

Degradation of substrates *Buffering of VFA* (Demeyer, 1991)
 (Blümmel *et al.*, 1999)

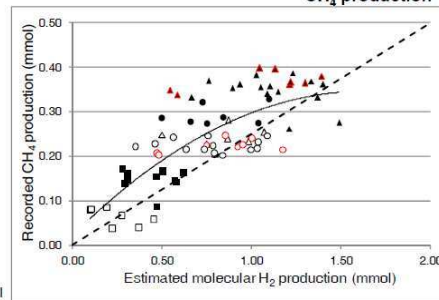
Results and Discussion

Total gas production



Accurate prediction of total gas production (slope = 1)
 Indirect gas = 51.2 ± 2.60% of total gas

CH₄ production



Curvilinear relationship between recorded and estimated CH₄ production

Conclusions

Partial validation of chosen stoichiometrical coefficients

Importance of indirect gas:
 could explain some discrepancies in the syringe's method when predicting intake or digestibility of feeds

Overestimation of CH₄ production with chosen stoichiometrical coefficients

Explanation:
 Other H₂ sinks (microbial synthesis, acetogenesis, fatty acid biohydrogenation...)

→ Question the usual way to model CH₄ production

References:

- Blümmel, M., Alpe, K.P., Steingass, H., Becker, K., 1999. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 81, 157-167.
- Demeyer, D. L., 1991. In: Jouany, J.-P. (Ed.), Rumen microbial metabolism and ruminant digestion, INRA Editions, Paris, France, pp. 217-237.
- Menke, K.H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., Schneider, W., 1979. J. Agric. Sci. Camb. 93, 217-222.

INRA-Rowett Symposium on Gut Microbiology, Gut microbiota: friend or foe?
 Clermont-Ferrand France, 17-20 June 2012



Dynamique et intensité de biotransformation dans le rumen

La « biotransformation ruminale » est un concept qui regroupe l'ensemble des réactions se produisant dans le rumen (dégradation, synthèse et conversion). Ces réactions sont pilotées par trois forces motrices majeures : les lois de la cinétique chimique, de la thermodynamique et de la dynamique des populations microbiennes. Cette thèse a pour objectif d'étudier l'impact d'un facteur alimentaire (pourcentage de concentrés incorporés dans la ration, supplémentation en huile) sur le fonctionnement du rumen et la biotransformation ruminale des constituants alimentaires en termes de dynamique et d'intensité. Cette thèse a combiné trois types d'approches : un essai *in vivo* sur des chèvres en milieu de lactation, deux essais *in vitro* (méthode du gaz-test) et une approche de modélisation mécaniste. *In vivo*, les réactions de biotransformation ont été évaluées par un suivi de la dynamique postprandiale et des mesures de bilans duodénaux. De plus, nous avons étudié l'influence réciproque des phénomènes ruminiaux et de l'animal-hôte (comportement d'ingestion, métabolisme, paramètres zootechniques, et qualité du lait) sur le long terme (6 semaines). Nos résultats sont en accord avec la plupart des études antérieures effectuées chez la chèvre ou la vache laitières. Les modifications du comportement d'ingestion observées après 6 semaines avec le régime riche en concentrés ont eu un effet sur les phénomènes digestifs ruminiaux. Les flux duodénaux d'acides gras ont expliqué les profils en acides gras du lait. Les études *in vitro* ont donné des résultats très cohérents par rapport à l'*in vivo* lorsque les animaux donneurs recevaient les régimes incubés. Enfin, nous avons développé un modèle mécaniste de fonctionnement de rumen *in vitro* décrivant de manière spécifique les lois physico-chimiques expliquant les dynamiques d'évolution du pH et de formation de gaz. Ce modèle aboutit à des résultats satisfaisants et pourrait être intégré à un modèle de rumen plus complet. La modélisation semble être le meilleur moyen pour intégrer toutes les réactions de biotransformation observées lors d'expérimentations.

Mots-clés : rumen, pourcentage de concentrés, chèvre laitière, production de gaz *in vitro*, modélisation.

Pattern and extent of ruminal biotransformation

“Ruminal biotransformation” is a concept aggregating all the reactions occurring in the rumen (degradation, synthesis and conversion). These reactions are driven by three major driving forces: laws of chemical kinetics, thermodynamics and the dynamics of microbial populations. The principal objective of the thesis was to study how a dietary factor (percentage of concentrate in the ration, oil supplementation) can modify rumen function and the ruminal biotransformation of dietary components in terms of pattern and extent. To answer to this question, three approaches were used: an *in vivo* experiment on mid-lactation goats, two *in vitro* experiments (with the gas-test method) and the development of a mechanistic model. *In vivo* biotransformation reactions were assessed by post-feeding measurements or by duodenal flow determination. Further, the relationships between the rumen and the host animal (intake behaviour, metabolism, performance parameters, and milk quality) were studied over a period of 6 weeks. Our results were consistent with previous reports in goats and dairy cows. Animals adapted their intake behaviour in 6 weeks with the high-concentrate diet. As a consequence, modifications of ruminal digestion patterns were observed. Duodenal flow of fatty acids explained the milk fatty acid profile. The *in vitro* studies gave consistent results with the *in vivo* study when donor animals were fed the incubated diets. Finally, a mechanistic model of rumen functioning in *in vitro* devices was developed. It describes specifically the physicochemical laws explaining pH and gas production patterns. This model gives satisfying results and could be integrated to a larger mechanistic model of rumen. Modelling provides a logical framework within which to mathematically integrate all the biotransformation reactions observed in experiments.

Keywords: rumen, percentage of concentrate, dairy goat, *in vitro* gas production, modelling.