

Impact du tanin de chêne ajouté à l'ensilage d'herbe sur l'efficience azotée de vaches laitières

Auteur : Warnimont, Mathieu

Promoteur(s) : Beckers, Yves; 5409

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : sciences agronomiques, à finalité spécialisée

Année académique : 2017-2018

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/5087>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.



IMPACT DU TANIN DE CHENE AJOUTE A L'ENSILAGE D'HERBE SUR L'EFFICIENCE AZOTEE DE VACHES LAITIERES

WARNIMONT MATHIEU

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER BIOINGENIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

ANNEE ACADEMIQUE 2017-2018

CO-PROMOTEURS : BECKERS YVES, HERREMANS SOPHIE

Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de Gembloux Agro-Bio Tech.

Le présent document n'engage que son auteur.



IMPACT DU TANIN DE CHENE AJOUTE A L'ENSILAGE D'HERBE SUR L'EFFICIENCE AZOTEE DE VACHES LAITIERES

WARNIMONT MATHIEU

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER BIOINGENIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

ANNEE ACADEMIQUE 2017-2018

CO-PROMOTEURS : BECKERS YVES, HERREMANS SOPHIE

J'adresse mes remerciements les plus vifs à toutes les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail de fin d'études.

Tout d'abord, je tiens à remercier Monsieur Beckers qui, en tant que co-promoteur, a veillé au bon déroulement de mon TFE et de son contenu scientifique.

Je remercie également Madame Sophie Herremans qui en tant que co-promotrice m'a guidé dans la réalisation de notre expérimentation et dans le suivi de la rédaction de ce travail.

Je souhaite aussi remercier Madame Soyeurt, membre de mon jury, qui m'a apporté un soutien technique lors de la réalisation de mes analyses statistiques.

Je souligne vivement l'accueil et la disponibilité dont ont fait preuve Madame Sophie Mathieu et toute l'équipe du CRA-W avec laquelle j'ai travaillé.

Et finalement, je souhaite témoigner ma reconnaissance envers ma maman qui m'a toujours soutenu et motivé tout le long de mon cursus.

Résumé :

Selon la littérature, les tanins dans la ration des ruminants augmentent l'efficacité azotée. Ils diminuent la digestion des protéines dans le rumen, ce qui a pour conséquence d'augmenter la proportion digestible dans l'intestin grêle. Cette réaction est due au fait que les tanins complexent les protéines lorsqu'elles sont en solution dans un milieu à pH neutre comme le rumen. Les tanins inhibent aussi le métabolisme d'une partie de la flore du rumen et certaines enzymes utiles à la digestion des protéines dans celui-ci.

Une expérience a été réalisée sur six vaches laitières de race Holstein. L'objectif de cette expérimentation est d'analyser l'impact de tanin de chêne hydrosoluble ajouté à l'ensilage d'herbe, à une concentration de 1% de la matière sèche totale de la ration, sur l'efficacité azotée. L'expérience a été décomposée en trois périodes : une préadaptation de dix jours et deux périodes de trois semaines. Les six vaches séparées en deux lots homogènes ont reçu, à tour de rôle, la ration avec et sans tanin, à la manière d'un carré latin.

Durant la dernière semaine de chaque période, est réalisée la semaine de prélèvement où tous les inputs (aliments) et les outputs (lait, urine, fèces) sont pesés et analysés. Les données collectées ont permis de réaliser un bilan protéique complet et d'analyser comment agissent les tanins.

Les résultats n'ont pas montré de différences significatives sur la production laitière ni sur la composition du lait. Seul le ratio perte d'azote urinaire sur perte d'azote fécal et la qualité de l'ensilage semblent être modifiés. Le tanin ajouté à l'ensilage réduirait les pertes d'azote urinaire mais augmenterait les pertes d'azote fécal. Cette expérience n'a pas montré de modification de l'efficacité azotée.

La faible concentration ou l'emploi de tanins hydrolysables seuls (plus efficaces cumulés aux tanins condensés) sont probablement les raisons de ces résultats. Les tanins, ajoutés au moment de l'andainage, ont réagi avec l'ensilage mais peu avec la flore du rumen.

Abstract :

Tannins in the ruminant diet are expected to increase the nitrogen efficiency of the ruminants by promoting protein digestion in the small intestine rather than in the rumen. This reaction is due to the fact that tannins complex proteins when they are in solution with a pH neutral medium such as the rumen. Tannins also inhibit some of the rumen flora and some enzyme useful for digestion of proteins in the rumen.

An experiment was carried out on six dairy cows of Holstein breed. The objective of this experiment is to analyze the impact of water soluble oak tannin added to grass silage to a concentration of 1% of the total dry matter of the ration, on the nitrogen digestion efficiency. The experiment was divided into three periods: a 10-days pre-adaptation and two three-weeks periods. The six cows separated into two homogeneous batches received in rotation the ration with and without tannin in the manner of a Latin square.

The last week of each period is the sampling week. During this week, all the input (feed) and the outputs (milk, urine, faeces) were weighed and analysed. All the data were collected and analysed statistically to show how oak tannin impacts the nitrogen efficiency.

The results did not show any significant differences in milk yield or milk composition. Only the ratio of urinary nitrogen loss on faecal nitrogen loss and the quality of the silage seemed to be modified. Tannin added to silage would reduce urinary nitrogen losses but increase faecal nitrogen losses. This experiment did not show a change in nitrogen digestion efficiency.

The low concentration or use of hydrolysable tannins alone (more effective when add with condensed tannins) are probably the reasons of these results. Tannins, incorporated at the swathing time, reacted with silage but less with the rumen flora.

Table des matières

Introduction et contexte bibliographique	1
Quelle est la place de l'agriculture dans notre société occidentale actuelle ?.....	1
Généralités.....	1
Attentes du consommateur.....	1
Impact de l'agriculture et plus particulièrement de la production laitière bovine sur le réchauffement climatique	2
Pertes azotées au sein des élevages et pollutions potentielles de l'environnement	3
Empreinte écologique des produits laitiers.....	5
Impact économique de l'efficace azotée dans une ferme laitière	5
Perspectives des pays occidentaux	6
Amélioration de l'efficace azotée	7
Digestion de l'azote chez le ruminant	7
Efficace azotée actuelle chez la vache laitière et comparaison avec les autres animaux de rente.	8
Meilleure adéquation entre la ration et les besoins des ruminants - importance de l'OEB et du ratio DVE par kVEM	9
Pistes d'amélioration de la conservation des fourrages	10
Amélioration de la digestibilité de l'azote par le ruminant.....	12
Impact de la performance sur l'efficace azotée	13
Les tanins et leurs impacts sur l'efficace azotée et la production de méthane	13
Définition et classification des tanins.....	13
Effets des tanins sur l'efficace azotée	16
Effets des tanins sur la production laitière et études de cas pratiques	19
Effets des tanins sur les émissions de méthane	23
Les autres avantages et inconvénients des tanins	25
Synthèse de la bibliographie.....	27
Matériel et Méthode	28
Préparation du matériel végétal	28
Choix des animaux	29
Planning général	30
Ration expérimentale	32
Prélèvements et analyses des refus	35

Prélèvements et analyses des urines	35
Prélèvements et analyses des matières fécales	36
Prélèvements et analyses du lait.....	37
Analyses de la conservation des ballots d'ensilage d'herbe	38
Prélèvements et analyses du jus de rumen	39
Pesées des vaches	40
Analyse de la teneur en matière sèche des aliments	40
Traitements et analyses des échantillons d'aliments	41
Analyse du spectre infrarouge	41
Analyse de la teneur en MAT (DUMAS)	42
Analyse du taux d'urée	43
Méthode de Kjeldhal	43
Vérification de la qualité de l'ensilage	44
Traitement des données statistiques	44
Résultats	46
Résultats escomptés.....	46
Valeurs sélectionnées.....	47
Analyse de l'ensilage	47
Analyse des refus	48
Analyse du jus de rumen.....	49
Analyse de la digestibilité apparente	51
Analyse en composantes principales du spectre du lait	52
Analyse de la production et de la composition du lait	53
Analyse des flux d'azote	55
Analyse des efficacités azotées et ratios.....	56
Discussions	58
Analyse de l'ensilage	58
Analyse de l'ingestion et de l'appétence	59
Analyse du jus de rumen.....	59
Analyse des prédictions de méthane.....	60
Analyse des digestions apparentes	61
Analyse de la production laitière et de la composition du lait.....	63

Analyse des pertes fécales et urinaires.....	68
Analyse de l'efficacité azotée du lait	69
Conclusion	69
Bibliographie.....	72
Annexes	81
Préparation de l'ensilage avec tanin	81
Préparation des poches à urine.....	82
Equipeur de traite au « métabolisme »	84

Table des figures

Figure 1 : Les 4 objectifs pour orienter le consommateur vers des produits laitiers plus durables.....	2
Figure 2 : Représentation de la digestion des protéines chez le ruminant	8
Figure 3 : Structure des tanins hydrolysables (A) et condensés (B).....	15
Figure 4 : Représentation des liaisons hydrophobes, ioniques et des ponts hydrogène qui peuvent exister entre un tanin et une protéine	17
Figure 5 : Représentation de (A) Pyrogallol et (B) Resorcinol.....	26
Figure 6 : Pulvérisation de la solution de tanin sur les andains.....	28
Figure 7 : Stabulation entravée au "métabolisme".....	31
Figure 8 : Système de collecte des urines	35
Figure 9 : Agitateur.....	38
Figure 10 : (A) Sac micro-perforé pour l'analyse de la MS des fourrages et (B) barquette en aluminium pour l'analyse de la MS du maïs et des concentrés.....	40
Figure 11 : CycloTech.....	41
Figure 12 : Automated Wet Chemistry Analyzer - Continuous Flow Analyzer	43
Figure 13 : Digestibilité de la MS en fonction de la période et de la ration	52
Figure 14 : Digestibilité apparente de l'azote en fonction de la période et de la ration.....	52
Figure 11 : Taux de protéines du lait en fonction de la période et de la ration	54
Figure 12 : Moyenne du ratio N urinaire sur N fécal par période et par ration	57
Figure 13 : Représentation de la variabilité de la production de lait journalière.....	64
Figure 18: Préparation de la solution de tanin hydrolysable à pulvériser	81
Figure 19 : Pulvérisation de la solution à base de tanin hydrolysable sur l'ensilage.....	81
Figure 20 : Confection des poches à urine	82
Figure 21 : Poche à urine avant fixation.....	82
Figure 22 : Poche à urine fixée	83
Figure 23 : Machine de traite portative	84

Table des tableaux

Tableau 1 : Les principaux principes actifs retrouvés dans les additifs pour améliorer la qualité des ensilages	11
Tableau 2 : Tableau synthétique des expériences les plus récentes avec du tanin dans la ration de vaches laitières.....	20
Tableau 3 : Vaches sélectionnées.....	30
Tableau 4 : Planning général de l'expérience	32
Tableau 5 : Planning journalier.....	32
Tableau 6 : Ration journalière	34
Tableau 7 : Composition en acides gras à courte chaîne du fourrage.....	47
Tableau 8 : Production d'ammoniac de l'ensilage	48
Tableau 9 : Analyse statistique des refus.....	48
Tableau 10 : Concentration des acides gras à courte chaîne et ammoniac du jus de rumen en fonction de la ration et du temps de prélèvement.....	49
Tableau 11 : pH du jus de rumen en fonction de la ration et du temps de prélèvement	49
Tableau 12 : P-value des Acides gras à courte chaîne, ammoniac et pH du jus de rumen	49
Tableau 13 : Prédiction des émissions de méthane par la méthode de Demeyer & Fievez, (2000) en mol de CH ₄ /mol d'AGV.....	50
Tableau 14 : Prédiction des émissions de méthane par la méthode de Ramin & Huhtanen, (2013) en mol de CH ₄ /mol d'AGV.....	50
Tableau 15 : P-value des prédictions des émissions de méthane.....	50
Tableau 16 : Analyse statistique de la digestibilité apparente	51
Tableau 17 : Valeur de l'ACP du spectre infrarouge du lait en fonction de la ration	53
Tableau 18 : Valeur statistique pour la production laitière	53
Tableau 19 : Valeur statistique de la quantification du flux journalier d'azote.....	55
Tableau 20 : Valeur statistique de l'efficacité et des ratios importants	56
Tableau 21 : Représentation de la variabilité de la production de lait journalière	64
Tableau 22 : Prédictions et besoins en VEM et DVE	65
Tableau 23 : Valeurs nutritionnelles de l'herbe avec et sans impact théorique des tanins	67

Abréviations :

AGV	Acide gras volatil
BRE %	Stabilité dans le rumen des protéines alimentaires
CT	Tanin condensé
Da	Dalton, unité de masse qui représente 1/12 de la masse d'un C12
DVBE	Protéines non dégradables digestibles dans l'intestin
DVE	Darmverteerbaar eiwit, représente la somme des acides aminés digérés dans l'intestin grêle
DVME	Protéines microbiennes digestibles dans l'intestin
HT	Tanin hydrolysable
M	Masse molaire
MF	Matière fécale
MAP	Matière azotée protéique
MAT	Matière azotée totale
MG	Matière grasse
MO	Matière organique
MOF	Matière organique fermentescible

MP	Matière protéique
MS	Matière sèche
MSA	Matière sèche analytique
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
OEB	Onbestendige eiwit balans, représente la différence entre la concentration en NH ₃ et la MOF
ST	Sans tanin
T	Tanin
VEM	Voedereenheid melk, représente l'énergie du fourrage (glucose + ATP au niveau cellulaire)

A. INTRODUCTION ET CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

1) Quelle est la place de l'agriculture dans notre société occidentale actuelle ?

a) Généralités

Le monde agricole est souvent décrié et est la cible de nombreuses attaques (pollution, bien-être animal, qualité des produits,...) mais il a un rôle essentiel qui est de nourrir l'humanité. Un des grands enjeux pour augmenter la rentabilité et la productivité des fermes d'élevage est, en parallèle avec un travail sur la génétique, d'optimiser la ration alimentaire. Il faut travailler sur des rations avec de bonnes valeurs nutritionnelles tout en gardant un coût de production le plus faible possible. Toutefois, il faut porter une attention particulière à véhiculer une image plus verte de ce secteur.

Pourquoi ne pas commencer cette démarche avec la production laitière qui est une part importante du marché agricole wallon ?

b) Attentes du consommateur

L'agriculture moderne, si elle veut continuer à avoir un attrait pour le consommateur, devra prendre en compte ses attentes. Selon une étude réalisée à Gand (Vermeir & Verbeke, 2006), le consommateur belge est à la recherche de produits laitiers plus en adéquation avec une production durable et responsable.

Pour que les consommateurs aient l'intention de s'orienter vers un produit laitier plus écologiquement soutenable, il faut travailler sur quatre grands objectifs (Vermeir & Verbeke, 2007) :

- Sensibiliser les consommateurs à la cause écologique et leur donner la certitude que le produit en question répond à leurs attentes en matière de durabilité.
- Les convaincre que leur apport personnel peut avoir un impact collectif à grande échelle.
- Leur montrer comment et pourquoi le produit est en adéquation avec leur attente écologique.
- Orienter les normes sociales vers des produits laitiers plus durables.

Vermeir & Verbeke, 2007 représentent ces quatre grands objectifs de la manière suivante :

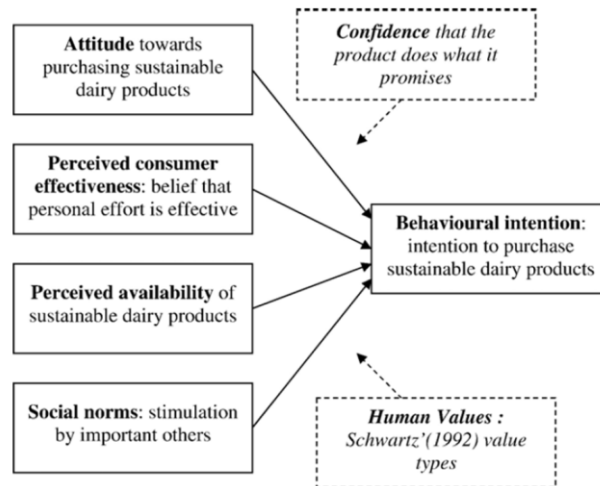


Figure 1 : Les 4 objectifs pour orienter le consommateur vers des produits laitiers plus durables (Vermeir & Verbeke, 2007)

Il existe une part croissante de personnes sensibilisées à l'impact écologique de leur alimentation. Cette part de la population est appelée Homo Politicus. Ce sont ces consommateurs qui cherchent à optimiser leur impact pour la société. Cependant, une majeure partie de la population continue à agir comme Homo Economicus et se concentre uniquement sur ses propres besoins (Vermeir & Verbeke, 2007).

Le consommateur belge, s'il est à la recherche de produits plus durables, n'est cependant pas prêt à dépenser plus (Vermeir & Verbeke, 2006). Le prix reste le facteur primordial dans le choix d'un produit en grande surface. Il faut donc diminuer la pollution produite par l'élevage wallon, sans augmenter le coût de production.

c) Impact de l'agriculture et plus particulièrement de la production laitière bovine sur le réchauffement climatique

Les émissions de gaz à effet de serre dues à l'élevage représentent dans le monde 5% des émissions anthropiques de dioxyde de carbone (CO₂), 44% des émissions anthropiques de méthane (CH₄) et 53% des émissions anthropiques de protoxyde d'azote (N₂O). Le tout représente un total de plus de 7 gigatonnes d'équivalent CO₂. L'élevage de bovins représente

65 % de ces émissions dont 20% pour les vaches laitières. La moitié de ces émissions est due à la fermentation entérique (Gerber *et al.*, 2013).

En équivalent CO₂ le méthane représente 6.3% des émissions anthropiques, ce qui en fait le second gaz à effet de serre le plus important.

d) Pertes azotées au sein des élevages et pollutions potentielles de l'environnement

Les vaches laitières, pour produire du lait, ont notamment besoin d'ingérer de l'énergie et des protéines. En fonction de nombreux facteurs, 25 à 30 % de l'azote consommé se retrouvent dans le lait. Cependant, le reste est excrété via les effluents dans l'environnement.

L'élevage occasionne donc une pollution azotée, liée aux effluents. Les composés azotés des matières fécales et des urines des bovins sont l'urée, l'azote ammoniacal et nitrique ainsi que les acides aminés. Ceux-ci vont vite se dégrader et se retrouver sous forme soit de nitrate en milieux aqueux et polluer les nappes phréatiques et les cours d'eau, soit sous forme d'ammoniac ou de protoxyde d'azote et polluer l'atmosphère (Peyraud *et al.*, 2012).

L'azote du sol peut être dénitrifié (perte dans l'atmosphère) ou lixivié (perte dans les sols et les cours d'eau) en fonction du type de sols et des conditions climatiques.

Des particules fines peuvent être formées à cause de l'ammoniac. Ces particules sont nocives pour l'homme.

Ces pollutions sont dues à la faible efficacité de la digestion azotée et en particulier celle d'une ration à l'herbe pour les ruminants. Pour un ensilage d'herbe, 65% de ses protéines sont digestibles. Moins de 30% le sont dans l'intestin grêle. En comparaison, pour un tourteau de soja, 90% des protéines sont digestibles et plus de la moitié le sont dans l'intestin grêle (Beckers, 2013).

La quantité d'azote perdue via les matières fécales est relativement constante et n'est principalement impactée que par la quantité de matière sèche ingérée. Celle perdue via les

urines est plus variable et dépend à la fois de la quantité de matière sèche ingérée mais également de la concentration en azote de cette dernière (Peyraud *et al.*, 1995).

En fonction du type d'effluent et de sa modalité de gestion, les pertes en azote par émissions gazeuses peuvent représenter plus de la moitié de la quantité initiale de cet élément chimique. La perte durant toute la gestion des effluents sous forme d'ammoniac peut représenter jusqu'à 20% du poids en matière sèche de la matière fécale, celle du protoxyde d'azote est de 1.5% avec peu de différence entre le lisier et le fumier (Peyraud *et al.*, 2012).

Même après épandage, que ce soit pour l'urine ou les matières fécales, c'est près du tiers des composés utiles qui est perdu soit par lixiviation, soit par perte gazeuse (Peyraud *et al.*, 2012).

La teneur moyenne naturelle en nitrates des nappes phréatiques est de 2 ppm mais l'agriculture et les pertes d'azote par lixiviation augmentent cette concentration. Une concentration supérieure peut provoquer des problèmes sérieux de santé pour l'homme (Payet *et al.*, 2009). En Belgique, la part de l'agriculture dans la pollution des nappes phréatiques est indéniable. Elle est due à un excès de fertilisants (minéraux ou organiques) et à une mauvaise gestion des effluents d'élevage selon le rapport de la Cour des comptes sur la gestion durable de l'azote en agriculture transmis au Parlement wallon en 2011.

Un taux d'azote plus élevé dans les eaux stagnantes, dû au lessivage, peut aussi causer de l'eutrophisation surtout si l'azote est accompagné de phosphore (Agle *et al.*, 2010). La pollution azotée peut avoir des effets néfastes tels que la perte de la biodiversité à l'échelle locale et régionale. L'azote est particulièrement mobile, ce qui facilite sa dissémination (Howarth, 2008). Le littoral peut, lui aussi, être sujet à l'eutrophisation et l'on constate dès lors une surproduction d'algues.

L'azote perdu dans l'atmosphère peut également causer de nombreux problèmes. En effet, il peut atteindre des zones écologiques précieuses et s'y concentrer dans le sol. Une concentration élevée dans celui-ci, que ce soit dans une plaine ou dans une forêt, peut mener à une diminution du pH car le surplus d'ammonium qui se nitrifie produit des ions H⁺. Et ceci peut rendre des ions métalliques toxiques plus disponibles pour les plantes. La teneur en azote plus élevée favorise aussi les espèces nitrophiles. Toutes ces raisons peuvent mener à une

perte de la biodiversité. Les tourbières, qui sont des zones écologiques très riches, sont particulièrement sensibles à la concentration en azote organique dans l'atmosphère (Bobbink *et al.*, 1998). La pollution de l'air en NH₃ provient à 83% de l'agriculture (Driscoll *et al.*, 2003).

e) Empreinte écologique des produits laitiers

Le consommateur est de plus en plus conscient de l'impact écologique que peut avoir l'élevage. Une solution pour rendre les produits laitiers plus attractifs est donc de réduire leur empreinte écologique. L'empreinte écologique est un concept qui représente la superficie nécessaire utile pour produire nos ressources et pour assimiler nos déchets et pollution sans induire une altération de ces milieux pour les générations futures (Wackernagel & Yount, 1998). Cette superficie ne devrait en théorie pas dépasser notre bio-capacité. La bio-capacité est un concept qui représente la superficie actuellement disponible pour produire nos besoins et assimiler nos déchets et pollutions (Monfreda *et al.*, 2004).

Pour réduire notre empreinte écologique, il existe trois solutions majeures. Nous pouvons soit réduire notre pollution, soit améliorer notre efficacité de production à l'hectare, soit consommer moins (Wackernagel *et al.*, 1999).

Dans le cadre de la production laitière, les principaux objectifs pour réduire l'empreinte écologique sont donc de permettre une meilleure efficacité des aliments pour bétail et de réduire les pollutions telles que les émissions de méthane et les rejets azotés.

f) Impact économique de l'efficacité azotée dans une ferme laitière

Les pertes d'azote ne sont pas seulement un facteur négatif pour l'environnement, elles sont aussi une source de perte monétaire et affectent les performances économiques de l'exploitation (Arriaga *et al.*, 2009). Un producteur, s'il veut maintenir son exploitation, doit rester compétitif face à ses concurrents.

Les protéines sont souvent les composants les plus coûteux de la ration des vaches laitières. Elles peuvent représenter 40% de son coût (Lapierre *et al.*, 2015). Ainsi, leur part dans l'alimentation a un impact sur le coût de revient du lait. Bien que fort variable d'une

année à l'autre, et d'une exploitation à l'autre, le coût moyen de l'alimentation des vaches laitières en Belgique représentait 10 centimes par litre de lait en 2015, soit 30% du total (Jürgens, 2017). De nombreuses études montrent que l'amélioration de l'efficacité azotée est une bonne solution pour améliorer l'efficacité économique des fermes occidentales (St-Pierre & Thraent, 1999 ; Nevens *et al.*, 2006 ; Groot *et al.*, 2006).

g) Perspectives des pays occidentaux

Toutes ces raisons poussent les politiques à travailler sur une meilleure gestion de l'azote, notamment via une réglementation sur le taux de liaison au sol. Ce taux représente la quantité d'azote que l'on peut épandre sur les surfaces agricoles. Dans certaines zones où l'élevage est très dense, il est parfois compliqué de trouver la superficie suffisante pour évacuer l'entièreté des effluents qui y sont produits.

De plus, la sélection génétique et les recherches sur l'équilibre des rations alimentaires dans les pays de l'OCDE ont permis de réduire les émissions de gaz à effet de serre par kg de lait. En OCDE, il est produit 1.7 kg d'équivalent CO₂ par litre de lait, ce qui est proche de la moitié de la moyenne mondiale qui est de 2.9 kg. (Gerber *et al.*, 2013).

Toutefois, il reste encore énormément d'efforts à réaliser pour minimiser l'impact de l'élevage sur notre empreinte écologique.

Une piste en deux phases est à l'étude pour améliorer l'efficacité azotée :

- L'amélioration de la qualité nutritionnelle de la ration alimentaire
- L'amélioration de la digestibilité de l'azote par le ruminant

2) Amélioration de l'efficacité azotée

a) Digestion de l'azote chez le ruminant

L'efficacité azotée est un pourcentage qui correspond à la quantité d'azote valorisé par rapport à l'ingéré. Dans le cas de production laitière, le valorisé correspond à l'azote du lait (Beckers., 2013).

Pour bien comprendre comment il est possible d'améliorer l'efficacité azotée chez la vache laitière, il est important de connaître son système digestif. Cela permet d'identifier les facteurs sur lesquels un moyen d'action est envisageable.

Les protéines assimilées par l'intestin grêle chez les ruminants sont :

- Les microbiennes
- Les endogènes
- La partie des protéines alimentaires qui n'ont pas été digérées dans le rumen, mais qui le seront dans l'intestin grêle.

Les protéines les plus abondantes entrant dans l'intestin du ruminant sont les microbiennes. Ces dernières sont synthétisées par les microorganismes du rumen en grande partie à l'aide du NH_3 qui provient de la digestion des protéines alimentaires.

Les protéines endogènes proviennent des enzymes digestives, des desquamations des cellules épithéliales et du mucus.

Les protéines alimentaires assimilées par l'animal dépendent de la quantité initiale de protéines ingérées et de leur digestibilité dans le rumen. Toutes les protéines non digérées dans le rumen ne sont pas forcément digérées dans l'intestin grêle. Les protéines qui ne le sont pas sont dites indigestibles. (Tamminga *et al.*, 2007).

Les ruminants sont aussi capables de réaliser un recyclage de l'azote. En effet, quand le foie produit l'urée dont un tiers est évacué via les urines. Les deux autres tiers sont renvoyés vers le rumen ou les intestins via le système sanguin (Reynolds & Kristensen, 2014).

Lors de ce recyclage de l'urée, 10% vont être évacués via les fèces, 40% réabsorbés sous forme d'ammoniac et l'autre moitié va être absorbée sous forme d'acides aminés. En effet, les microorganismes vont transformer l'urée en azote assimilable dans le rumen pour la synthèse de protéines microbiennes (Lapierre & Lobley, 2001). Cette réabsorption est donc très dépendante des activités de la flore des microorganismes du rumen.

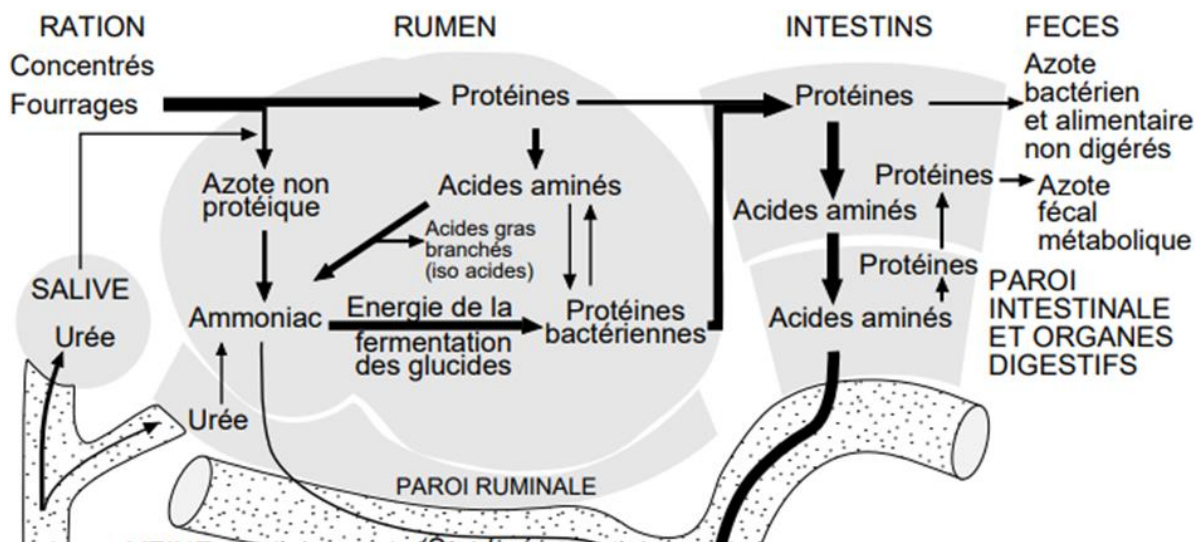


Figure 2 : Représentation de la digestion des protéines chez le ruminant

Figure 2 adapté de Wattiaux, Michel A., Institut Babcock

b) Efficience azotée actuelle chez la vache laitière et comparaison avec les autres animaux de rente

Les rations pour vache laitière, de type européen, sont composées d'ensilage d'herbe et de maïs et complétées majoritairement par des céréales, du soja et du colza. Elles ont une efficience protéique faible. En effet, seulement 27% en moyenne des protéines se retrouvent dans le lait (minimum 16% et maximum 40%) (Huhtanen & Hristov, 2009).

Cette efficience est faible face à celle des autres animaux d'élevages. Les poulets de chair en production conventionnelle ont une efficience protéique de 40 à 45% et le porc conventionnel à l'engraissement de 30 à 35%. Ces différences sont surtout dues au fait que les bovins consomment des protéines végétales bien moins digestibles et valorisables que celles des deux autres productions. De plus, les rations des bovins sont souvent pléthoriques en protéines, car leur concentration est souvent considérée comme le facteur limitant en production. Un travail réalisé tant sur la génétique que sur des rations de plus en plus

performantes a déjà permis d'améliorer de manière importante et continue l'efficacité protéique. Toutefois, la marge de manœuvre est encore importante (Peyraud, 2016).

c) Meilleure adéquation entre la ration et les besoins des ruminants - importance de l'OEB et du ratio DVE par kVEM

Une solution pour améliorer le bilan protéique peut être de travailler avec des aliments qui ont une valeur énergétique plus élevée et qui sont moins concentrés en azote que les aliments conventionnels afin d'arriver à un OEB optimal pour la ration. Cependant, si l'OEB est trop négatif, la ration peut aboutir à des carences en protéines pour les microorganismes du rumen. Ceci peut avoir de gros impacts négatifs sur les performances zootechniques. Une ration énergétique se traduit généralement par une ration riche en MOF, ce qui peut aussi induire des risques d'acidose. Il faut donc, si l'on veut optimiser l'azote, travailler sur des rations avec un bon équilibre énergie/protéines (Calsamiglia *et al.*, 2010). De plus, un excès d'azote peut impacter les qualités organoleptiques du lait à cause d'une augmentation du taux d'urée dans celui-ci (Keim & Anrique, 2011). Un OEB optimal doit être positif et proche de zéro.

Dans le rumen, un apport énergétique est essentiel afin que les microorganismes puissent utiliser l'ammoniac qui provient de la dégradation de l'azote alimentaire pour se développer. Les bactéries ainsi formées vont être digérées et produire des acides aminés assimilables pour le ruminant (Knapp *et al.*, 2013). La synchronisation de l'apport protéique et énergétique disponible pour les microorganismes a donc, en théorie, un impact qui permet de réduire les pertes d'azote via les urines (Seo *et al.*, 2010). Une méta-analyse (Yang *et al.*, 2010) signale que la synchronisation peut avoir un effet positif mais que toutes les études ne vont pas en ce sens et qu'il est donc important de continuer la recherche.

Pour des vaches produisant de 7000 à 9000 litres de lait par an, le ratio DVE par kVEM recommandé est de 80 à 85. Dans une expérimentation (Knapp *et al.*, 2013), la réduction du ratio DVE/kVEM de 95 à 85 a permis d'améliorer l'efficacité azotée totale et par litre de lait de 5 à 7% sans impacter la production laitière. A contrario, trop de carbohydrates mène à un ratio protéine/énergie trop faible et peut entraîner une baisse du pH, inhibant le développement des microorganismes essentiels (Tamminga *et al.*, 2007).

d) Pistes d'amélioration de la conservation des fourrages

Les méthodes de conservation d'un fourrage humide sont complexes. Le processus de fermentation va consommer l'oxygène présent et réduire le pH. Lors de la fermentation, une partie de l'énergie du fourrage va être perdue sous forme de chaleur. Une partie des protéines va aussi être dégradée par hydrolyse. Cette dégradation est appréciée par le rapport N-NH₃/N-total et est exacerbée lorsque les conditions de conservation sont médiocres. L'objectif de la fermentation est, une fois terminée, de maintenir une bonne conservation et de stabiliser les qualités nutritionnelles grâce au pH acide et à l'anaérobie. L'anaérobie va permettre de stopper le processus de respiration cellulaire qui est consommatrice d'énergie. Elle permet aussi d'éviter la dégradation du fourrage par les microorganismes aérobies (Rotz & Muck, 1994).

En moyenne, lors de la phase d'ensilage, l'herbe perd 10% de VEM et 25% de DVE. Les valeurs en termes de VEM sont fort variables. Mathot *et al.*, (2009) ont réalisé une analyse sur 69 échantillons d'ensilages d'herbe en Belgique montrant que le VEM min est de 658 pour un max de 901. Il est donc important, si l'on veut bien maîtriser sa nutrition, de connaître les caractéristiques de son fourrage en le faisant analyser. Une meilleure conservation des fourrages, notamment en préservant sa valeur énergétique, peut être une bonne piste d'amélioration du ratio DVE/KVEM et d'augmentation de la concentration en DVE.

Une meilleure conservation des fourrages à l'aide d'additifs peut permettre de réduire les pertes de la valeur nutritionnelle de l'ensilage par rapport à la qualité bromatologique des composés initiaux.

Le rôle des additifs peut être de (Charmley, 2001). :

- Fournir le substrat pour l'acidification
- Acidifier le fourrage
- Inhiber ou favoriser certains microorganismes
- Pré-digérer le fourrage

Le tableau ci-dessous (tableau 1) reprend les principaux principes actifs retrouvés dans les additifs pour améliorer la qualité des ensilages d'herbes (Amyot, 2003).

Types d'additifs	Mode d'action
L'acide formique	<ul style="list-style-type: none"> - Baisse rapide du pH - Inhibe le développement des bactéries indésirables - Réduit la teneur en azote ammoniacal et en azote soluble - Réduit la teneur en acide butyrique et acétique, meilleure conservation des sucres solubles
L'acide propionique	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibe les levures et les moisissures - Améliore la stabilité anaérobie de l'ensilage, baisse du pH - Réduit la dégradation des protéines
Les produits sucrés	<ul style="list-style-type: none"> - Améliorent la conservation des ensilages avec une concentration trop faible en sucre soluble - Réduisent le pH
Les enzymes	<ul style="list-style-type: none"> - Dégradent les sucres simples contenus dans les cellules et dans les parois cellulaires - Baissent le pH et améliorent la conservation de l'ensilage
Les bactéries lactiques	<ul style="list-style-type: none"> - Favorisent la fermentation homolactique - Baisse plus rapide du pH - Inhibition des microorganismes et enzymes indésirables
Les associations bactéries-enzymes	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentent le taux de fermentation - Les enzymes favorisent le développement des bactéries
Les bactéries productrices d'inhibiteurs de moisissures	<ul style="list-style-type: none"> - Améliorent la stabilité aérobie de l'ensilage
L'ammoniaque	<ul style="list-style-type: none"> - Additif nutritionnel - Enrichit l'ensilage en protéines brutes - Agent de conservation
L'urée	<ul style="list-style-type: none"> - Additif nutritionnel, enrichit l'ensilage en protéines brutes - Transformée en ammoniac par les enzymes du fourrage

Tableau 1: Les principaux principes actifs retrouvés dans les additifs pour améliorer la qualité des ensilages d'herbes

En plus des additifs conventionnels, d'autres composés comme les tanins peuvent avoir des effets positifs. Pour de l'ensilage d'herbe, 5% de la MS en tanin permet un impact significatif et positif sur la baisse du pH, la réduction de la concentration en ammoniac, une proportion en acides gras à courte chaîne avec plus d'acide lactique et moins d'acide butyrique (Salawu *et al.*, 1999).

La composition standard en acides gras à courte chaîne et en alcool d'un ensilage d'herbe de bonne qualité, après fermentation, est en % de matière sèche (Kung & Shaver, 2001) :

- 6-10 pour l'acide lactique
- 1-3 pour l'acide acétique
- 0.5-1 pour l'acide acétique
- 0.5-1 pour l'éthanol

L'azote ammoniacal représente 5-10% de l'azote total. La proportion des acides gras à courte chaîne est très importante pour avoir un ensilage de qualité.

e) Amélioration de la digestibilité de l'azote par le ruminant

Réduire la dégradation des fourrages dans le rumen pourrait permettre une augmentation des quantités d'acides aminés essentiels arrivant jusqu'au duodénum (Zimmer & Cordesse, 1996). Il faut cependant garder à l'esprit que la cellulose ne peut être dégradée que dans le rumen. Un passage trop bref ou une faible dégradation du fourrage dans le rumen peuvent représenter une forte perte énergétique. Il faut donc trouver une solution pour réduire la dégradation des protéines dans le rumen mais pas celle d'autres composés organiques comme la cellulose.

Les additifs les plus récurrents pour réduire la digestibilité des protéines dans le rumen et augmenter leur digestion dans le duodénum sont les tanins et le formaldéhyde. Les deux composés agissent de la même manière en se liant aux protéines, les rendant non disponibles pour les microorganismes. Un traitement thermique permet aussi d'améliorer l'effet bypass des protéines via, par exemple, l'utilisation d'un expandeur (Tamminga 1981). La méthode

thermique semble difficilement envisageable pour les fourrages humides et donc la solution des additifs semble être une meilleure piste.

f) Impact de la performance sur l'efficacité azotée

L'efficacité azotée semble s'améliorer avec des vaches à haute performance laitière. Elle s'améliorerait de 5% par tranche de 1000 kg de lait supplémentaires en production annuelle (Vérité & Delaby, 2000. cité par Peyraud *et al.*, 2012). Travailler avec des vaches hautes productrices peut donc être une solution. Cependant, selon la loi des rendements marginaux décroissants, il ne faut pas dépasser l'optimum que peut produire sa vache sinon l'on risque de polluer plus par unité de production supplémentaire.

3) Les tanins et leurs impacts sur l'efficacité azotée et la production de méthane

Le tanin agit à la fois sur la conservation de l'ensilage et sur une augmentation de sa valeur DVE. Son utilisation semble être une piste intéressante. C'est donc ce composé qui a retenu mon attention comme point de départ de ma recherche.

a) Définition et classification des tanins

Les tanins sont des composés phénoliques présents dans les organelles cytoplasmiques des végétaux (Kriia & Thewis, 1999). Ceux-ci servent de mécanisme de défense utilisé par les plantes face aux herbivores et aux micro-organismes (Zimmer 1996).

Les tanins ont plusieurs fonctions chez les plantes comme l'allélopathie, l'attraction des pollinisateurs, la défense face aux pathogènes, la protection face aux lumières UV absorbées par les polyphénols et hypothétiquement le stockage du carbone (Mc Mahon 2000).

Il s'agit de polyphénols hydrosolubles dont la masse molaire est comprise entre 500 et 3000 g/mol selon la définition de Bate-Smith et Swain en 1962. Mais cette définition ne prend pas en compte les tanins avec une masse molaire supérieure à 20 000 Da. C'est pourquoi Griffith a défini plus tard les tanins comme des macromolécules de substance phénolique. C'est lui-même qui élabore la première classification en divisant les tanins en 2 catégories :

les hydrolysables et les condensés. Mais cette définition n'englobe pas les tanins à faible poids moléculaire (inférieur à 1000 da) ou encore les tanins monomères. (Khanbabaee & Van Ree, 2001). On peut dès lors constater qu'il est extrêmement difficile de trouver une définition qui couvre l'ensemble des tanins. Leur classification est aussi extrêmement complexe. Le système le plus courant est la définition de Bate-Smith et Swain et la classification de Griffith.

Les tanins peuvent avoir des propriétés chimiques et physiques variables. Il est donc important de savoir quel type de tanin est utilisé (Piluzza *et al.*, 2013).

Les tanins condensés (CT) sont des polymères de flavanol. Ils ont souvent un poids moléculaire supérieur aux tanins hydrolysables. Leur poids moléculaire va de 1000 à 20 000 Da. Ceux des HT varient de 500 à 3000 Da (Frutos *et al.*, 2004).

Les tanins hydrolysables (HT) sont des esters de sucre simple et d'acide phénolique. Lorsqu'ils sont hydrolysés, les acides phénoliques produits sont soit de l'acide gallique (cfr : fig 3) soit de l'acide éllagique (cfr : fig 3). En fonction du composé produit, on peut donc subdiviser les tanins hydrolysables en deux catégories : les galliques et les éllagiques (Zimmer & Cordesse, 1996).

McMahon *et al* 2000 reprennent l'illustration suivante (figure 3) afin de montrer la structure des tanins hydrolysables et condensés.

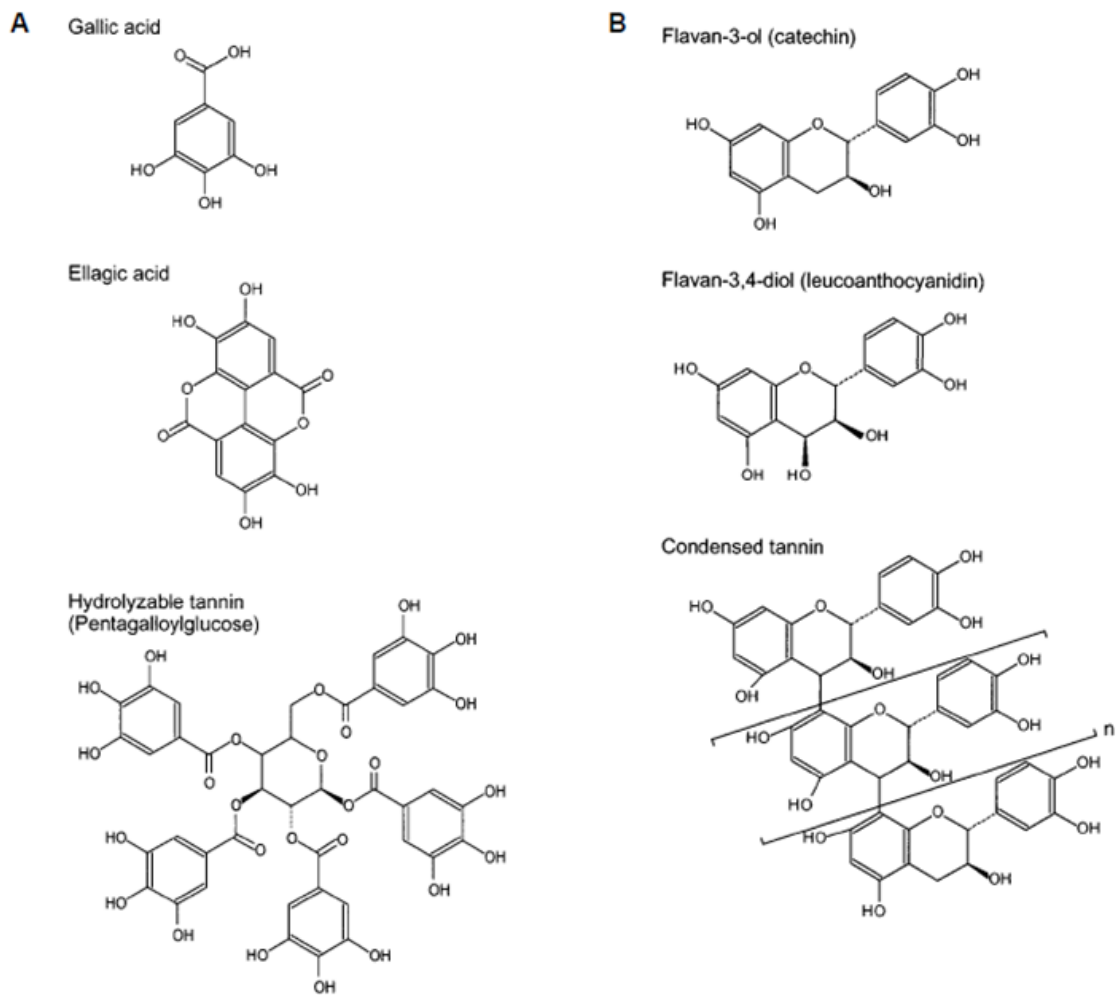


Figure 3 : Structure des tanins hydrolysables (A) et condensés (B) (McMahon *et al* 2000)

Les tanins condensés sont les plus fréquents et sont présents chez des plantes fourragères (surtout légumineuses) tels que le sainfoin, le sulla et le lotier. Les tanins hydrolysables, eux, sont plus présents chez les arbres comme par exemple le chêne, les sumacs et les châtaigniers (Kriaa & Thewis, 1999). Les tanins hydrolysables ne sont présents que chez les dicotylédones. Ils se trouvent généralement plus dans la partie ligneuse des végétaux contrairement aux tanins condensés plus fréquents dans les feuilles et les « parties vertes ».

b) Effets des tanins sur l'efficacité azotée

Les tanins peuvent avoir des effets positifs ou négatifs en nutrition animale et donc avoir un effet variable sur les performances zootechniques. L'impact varie en fonction de nombreux critères : du type de tanin, de l'animal et du milieu (Jeronimo *et al.*, 2014).

Certains acides aminés comme la proline rendent la protéine plus sensible à la réaction de complexation avec les tanins. L'impact de la proline est dû au fait que, en grande quantité dans une protéine, elle est responsable de sa structure tridimensionnelle ouverte et flexible ce qui favorise la réaction de complexation. Les protéines qui sont les plus sensibles sont les grandes protéines hydrophobes qui ont une structure ouverte et flexible avec une grande proportion de proline (Frutos *et al.*, 2004).

Les protéines les plus présentes chez les végétaux sont les Rubiscos. Elles peuvent être subdivisées en deux catégories, les petites et les grandes. La taille des protéines ayant un impact sur la complexation, on peut donc en déduire les affirmations ci-après. Les small sub-units (SSU) seront moins liées aux tanins. Cependant, ces protéines sont déjà celles qui se dégradent le moins dans le rumen. A contrario, les large sub-units (LSU) de Rubisco sont rapidement dégradées dans le rumen. Leur complexation avec les tanins a lieu rapidement (Min *et al.*, 2003). Les tanins permettent donc de préserver les protéines qui sont normalement les plus sensibles à la dégradation dans le rumen.

La réaction qui rend les protéines moins accessibles à la dégradation dans le rumen est une réaction de complexation. En effet, en précipitant les protéines, les tanins les rendent moins accessibles (Schofield *et al.*, 2001).

Jusqu'il y a peu, on pensait que la réaction de complexation des protéines était due majoritairement aux ponts hydrogènes mais il existe 4 types de liaison qui peuvent lier les protéines aux tanins :

- Les ponts hydrogènes qui sont réversibles en fonction du pH. Ces ponts se réalisent entre le radical hydroxyle du groupe phénolique et l'oxygène qui provient du groupe amine des peptides des protéines.
- Les interactions hydrophobes qui sont aussi réversibles en fonction du pH. Elles se réalisent entre le cercle aromatique des composés phénoliques et les régions hydrophobes des protéines.
- Les ponts ioniques qui sont réversibles. Ils ont lieu entre les ions phénolates et les sites cationiques des protéines.
- Les liaisons covalentes qui, elles, sont irréversibles. Elles se réalisent à travers l'oxydation des polyphénols en quinones et de la condensation nucléophile des protéines.

Faurie B., 2015 représente les liaisons entre une protéine et un composé de type tanin de la manière suivante :

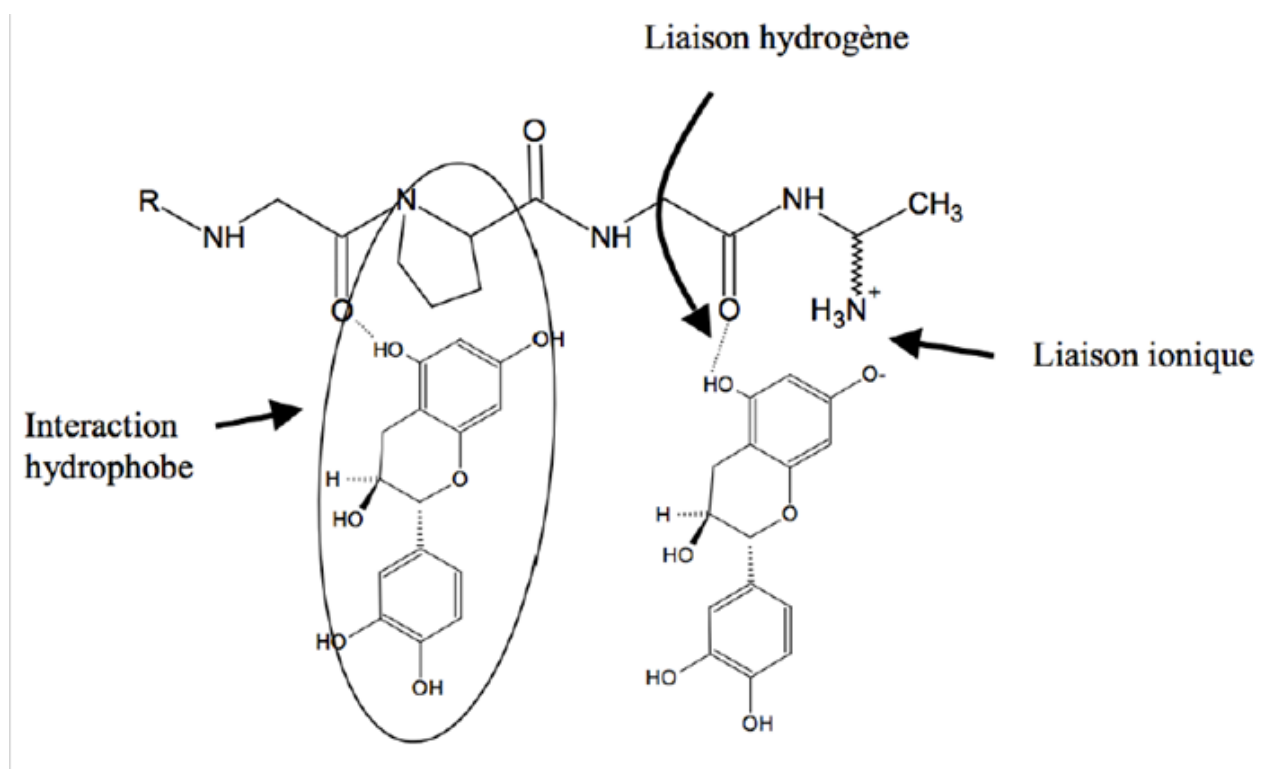


Figure 4 : Représentation des liaisons hydrophobes, ioniques et des ponts hydrogène qui peuvent exister entre un tanin et une protéine (Faurie B., 2015)

Nous savons que ce sont les interactions hydrophobes qui sont les plus importantes lors du phénomène de complexation des protéines des fourrages. (Frutos *et al.*, 2004).

Un pH faible provoque la dissociation du complexe tanin/protéine et permet aux protéines d'être de nouveau plus accessibles à la digestion. Les protéines complexent donc dans le rumen qui est à un pH de 6-7 et se libèrent en arrivant dans le duodénum à un pH de 2.5-3. Les tanins complexent en général à un pH de 5.5-7 et se dissocient à un pH de 2.5-3.5 (Jeronimo *et al.*, 2014).

Certaines bactéries du rumen sont tolérantes aux tanins, elles utilisent l'acide tannique (tanin hydrolysable) comme source de carbone (McMahon *et al.*, 2000). Le degré de résistance est propre à chaque microorganisme mais il dépend aussi du type de tanins HT ou CT. Certains microorganismes en présence de tanins changent même leur morphologie pour s'adapter. Certaines bactéries protéolytiques qui sont sensibles aux tanins peuvent, après une période d'adaptation, modifier leur métabolisme (Frutos *et al.*, 2004). Il faudra donc prendre en compte une notion de temps dans les recherches sur le tanin, que ce soit un temps d'adaptation ou éventuellement un temps de résilience.

Le mécanisme qui réduit la dégradation des protéines dans le rumen grâce aux tanins ne se limite pas aux réactions de complexation avec les protéines. Les tanins agissent aussi en réduisant le substrat des micro-organismes, que ce soit en complexant les carbohydrates ou en bloquant certains ions nécessaires au développement de ces micro-organismes. Ils en inhibent les enzymes et agissent directement sur les micro-organismes du rumen (Frutos *et al.*, 2004). Les tanins peuvent aussi avoir un effet inhibiteur avec de nombreuses enzymes digestives. Ils pourraient, entre autres, de manière réversible, inhiber la trypsine, la chymotrypsine, l'amylase, les protéases et la cellulase (Schofield *et al.*, 2001; Cirkovic-Velickovic & Stanic-Vucinic, 2017). Le fait d'inhiber les microorganismes du rumen peut influencer de nombreux facteurs et notamment avoir un impact négatif sur la digestibilité de la matière organique dans le rumen, ce qui aura pour conséquence de réduire la valeur énergétique des aliments et donc amener à une production de lait moindre. La digestion de la cellulose par les ruminants est essentielle car ce sont les seuls animaux d'élevage capables d'utiliser cette source d'énergie. Il faut donc bien réaliser un bilan de performance afin de voir si les tanins ont un impact positif ou négatif en fonction, entre autres, de leur concentration.

c) Effets des tanins sur la production laitière et études de cas pratiques

De très nombreuses expériences ont été menées sur l'utilité des tanins pour améliorer l'efficacité azotée ainsi que la composition du lait et augmenter la production.

Les différents résultats obtenus sont extrêmement variables. Griffiths *et al.*, 2013 et Henke 2016, par exemples, montrent un impact négatif sur la production de lait suite à un ajout de tanin. Par contre, plus de 10 études, reprises dans le tableau ci-dessous, ne montrent pas de différence significative sur la production laitière. Et enfin, certains, comme Hymes-Fecht *et al.*, 2013 et Woodward *et al.*, 2000, montrent une augmentation de la production laitière lorsque le tanin est ajouté à la ration.

Les autres résultats comme l'efficacité azotée et la composition du lait sont tout autant fluctuants d'une étude à l'autre. Les raisons de cette variabilité sont dues à de nombreux facteurs :

- La concentration du tanin
- Le temps d'adaptation de la flore du rumen
- Le type d'alimentation
- L'origine du tanin (extrait ou naturellement présent dans le fourrage)
- Le type de tanin (condensé ou hydrolysable)

Vu la disparité de ces résultats, il semble intéressant de présenter un tableau de synthèse qui reprend les conclusions des expériences les plus récentes.

Référence	Type de tanin	Animal concerné	Concentration ou quantité la plus intéressante	Observations
Broderick <i>et al.</i> , 2017	Tanin condensé de <i>Lotus Corniculatus</i>	Vache laitière	0.85% de la MS	- Augmentation de l'efficacité azotée du lait
Ali <i>et al.</i> , 2017	Tanin hydrolysable	Vache laitière	40 g par jour	- Augmentation significative de la production laitière - Diminution du taux d'urée du lait - Pas de modification des autres composés du lait
Alves <i>et al.</i> , 2017	Tanin extrait d' <i>Acacia mearnsii</i>	Vache laitière	80 g par jour	- Pas d'augmentation de la production laitière - Pas de différence significative de la balance protéique
Brinkhaus <i>et al.</i> , 2016	Tanin condensé de <i>Onobrychis viciifolia</i>	Vache laitière	4.46% de la MS	- Pas d'impact sur la production et la composition du lait - Réduction des pertes d'azote par les urines
Brinkhaus <i>et al.</i> , 2016	Tanin condensé de <i>Lotus Corniculatus</i> L.	Vache laitière	0.6% de la MS	- Pas d'impact sur la production et la composition du lait
Huyen <i>et al.</i> , 2016	Tanin condensé de <i>Onobrychis viciifolia</i>	Vache laitière	0.88% de la MS	- Une augmentation de la production laitière - Pas de modification de la composition du lait - Pas de meilleure efficacité azotée

				<ul style="list-style-type: none"> - Diminution de la digestibilité de la MO
Aguerre <i>et al.</i>, 2016	Tanin de quebracho et châtaignier 2:1	Vache laitière	1.8% de la MS	<ul style="list-style-type: none"> - Pas d'impact sur la production et la composition du lait - Réduction de la digestibilité de la MO - Réduction des pertes d'azote par les urines
Henke 2016	Tanin de quebracho	Vache laitière	3% de la MS	<ul style="list-style-type: none"> - Réduction des pertes d'azote via les urines - Augmentation des pertes d'azote via les fèces - Diminution de la production laitière
Aprianita <i>et al.</i>, 2014	Tanin condensé	Vache laitière	400g par jour	<ul style="list-style-type: none"> - Pas d'impact sur l'ingestion de la MS - Pas d'impact sur la production laitière et sur sa composition en protéine
Griffiths <i>et al.</i>, 2013	Tanin condensé d' <i>Acacia mearnsii</i>	Vache laitière	444g par jour	<ul style="list-style-type: none"> - Diminution de la production de lait - Diminution de l'urée du lait - Pas d'impact sur les autres composants du lait
Chapuis <i>et al.</i>, 2011	Tanin de châtaignier	Vache laitière	100 g par jour	<ul style="list-style-type: none"> - Pas d'impact sur la production et la composition du lait
Hymes-Fecht <i>et al.</i>, 2013	Tanin condensé de Lotus Corniculatus	Vache laitière	1.6% de la MS	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation de la production laitière - Augmentation de l'efficacité azotée du lait
Liu <i>et al.</i>,	Tanin de châtaignier	Vache laitière	1% de la MS	<ul style="list-style-type: none"> - Pas d'impact pour la MS ingérée

2013				- Pas d'impact sur la production et la composition du lait
Cieslak <i>et al.</i> , 2012	Tanin de <i>Vaccinium vitis idaea</i>	Vache laitière	0.2% de la MS	- Pas d'impact sur la production et la composition du lait
Dschaak <i>et al.</i> , 2011	Tanin condensé de quebracho	Vache laitière	3% de la MS	- Diminution de l'ingestion - Pas d'impact sur la production et la composition du lait - Diminution des pertes azotées urinaires
Arrigo & Dohme, 2009	Tanin condensé d'Esparcette	Vache laitière	1.78% de la MS	- Pas de différence MS ingéré - Diminution de la production d'ammoniaque dans le rumen - Pas de différence de production laitière
Dey <i>et al.</i> , 2009	Tanin condensé de <i>Ficus infectoria</i>	Vache laitière	1.5% de la MS	- Augmentation significative de la rétention azotée - Pas d'impact sur la production et la composition du lait
Lavrencic, 2004	Tanin de châtaignier	Vache laitière	120 g par jour	- Pas d'impact sur la production et la composition du lait
Woodward <i>et al.</i> , 2000	Tanin condensé de <i>Lotus Corniculatus</i>	Vache laitière	1.36% de la MS	- Augmentation de la production laitière

Tableau 2 : Tableau synthétique des expériences les plus récentes avec du tanin dans la ration de vaches laitières

d) Effets des tanins sur les émissions de méthane

Le méthane produit dans le rumen provient d'un groupe de microorganismes, les archées méthanogènes. Il s'agit d'organismes unicellulaires procaryotes. Ces organismes réduisent le dioxyde de carbone en méthane en se servant du dihydrogène comme donneur d'électrons.

De manière synthétique, le méthane est produit à partir de matières organiques en 4 étapes (Godon, 2015) :

- L'hydrolyse : les molécules organiques sont décomposées en monomères.
- L'acidogénèse : les monomères obtenus sont transformés en acides gras volatils ainsi qu'en hydrogène, dioxydes de carbone et autres coproduits (alcool, acide organique).
- L'acétogénèse : les composés de l'étape précédente vont être transformés en précurseurs du méthane, c'est-à-dire en acétate, gaz carbonique et hydrogène. Cette réaction peut soit être hétéro-fermentaire ou homo-fermentaire. Mais cette réaction est thermodynamiquement défavorable dans des conditions standards et a besoin d'une concentration en hydrogène très faible. Si la production de méthane n'utilisait pas l'hydrogène et que sa concentration augmentait, l'acétogénèse serait stoppée.
- La méthanogénèse : la transformation des précurseurs en méthane via cette réaction de minéralisation peut se faire de deux manières différentes soit à l'aide de dioxyde de carbone et d'hydrogène, soit à l'aide d'acétate et d'hydrogène.

Certains protozoaires et champignons, lorsqu'ils fermentent, produisent beaucoup de dihydrogène. La transformation du H₂ en méthane par les archées méthanogènes est une solution pour éviter l'accumulation d'hydrogène. Il est indispensable de ne pas supprimer les émissions de méthane. L'objectif est donc juste de les réduire. En effet, une suppression complète mènerait à une accumulation de H₂ dans le rumen et donc à des problèmes de santé (météorisme). La production de méthane, bien qu'indispensable au bon fonctionnement du rumen, représente une perte énergétique qui peut aller de 2 à 12% de l'énergie brute ingérée (Huyen *et al.*, 2016).

Les deux techniques envisageables pour réduire les émissions sont (Morgavi *et al.*, 2011) :

- Directe, en jouant sur la flore du rumen
- Indirecte, en jouant sur l'accessibilité du dihydrogène présent dans le rumen.

La diminution de la production de méthane par unité de lait produite repose sur trois grands concepts (Knapp *et al.*, 2014) :

- Utiliser des aliments qui vont produire une composition en AGV qui ne favorise pas la production de méthane.
- Utiliser des substances qui modifient la flore méthanogène du rumen.
- Augmenter la production laitière par la génétique ou une ration équilibrée pour diluer la production de méthane.

Il existe des techniques simples en nutrition pour diminuer les émissions de méthane qui consistent à travailler avec des rations plus riches que les standards en matières grasses. Les lipides ont un impact direct négatif sur les méthanogènes et les protozoaires (Morgavi *et al.*, 2011). Les lipides avec une longueur moyenne entre 8 et 16 carbones semblent les plus efficaces et donc particulièrement les lauriques C12 :0 et les myristiques C14 :0. Augmenter la concentration de la ration en lipides de 2.5% à 6.4% permettrait de réduire les émissions de 9% et permettrait une meilleure efficacité de la ration malgré une diminution de la digestibilité de la matière organique (Eugène *et al.*, 2008).

Bhatta *et al.*, (2009) ont montré que le mix de tanins condensés et de tanins hydrolysables est plus efficace pour réduire les émissions de méthane que les composés séparés. Les tanins agissent à la fois directement sur les méthanogènes mais aussi indirectement sur des protozoaires du rumen qui sont en symbiose avec les méthanogènes.

e) Les autres avantages et inconvénients des tanins

Les parasites gastro-intestinaux des ruminants, tels que les nématodes, peuvent avoir un impact négatif sur les performances animales. Il est démontré que des plantes riches en tanins peuvent réduire l'éclosion des œufs de parasites et leur développement au stade larvaire (Min & Hart, 2003).

Par ailleurs, les tanins permettraient d'améliorer la proportion de matières grasses sur les carcasses des animaux (Kriaa & Thewis, 1999).

La consommation de légumineuses riches en tanin en parallèle d'une ration à l'herbe semble avoir un impact significatif en réduisant le météorisme (McMahon *et al.*, 2000). Le météorisme est un trouble grave chez les ruminants. Les risques sont plus importants lorsque les vaches sont en pâturage. Le problème est une diminution ou une cessation de l'éruclation qui provoque une accumulation de gaz dans le rumen. Cette accumulation peut causer une gêne qui va réduire la productivité du bétail et dans des cas extrêmes, elle peut provoquer la mort de l'animal (Moate *et al.*, 1997). Les tanins agissent en réduisant la production de gaz et surtout, en diminuant le taux de protéines solubles. Celles-ci sont des précurseurs de la formation d'un biofilm qui bloque l'évacuation des gaz par l'éruclation (Min *et al.*, 2006).

Les tanins concentrés dans une ration pour brebis ont un impact positif sur la production de laine mais cela dépend du type de tanins et de sa concentration. La concentration optimale de tanins pour une production optimisée de laines va de 0.5% à 5% du poids de la matière sèche de la ration. Les tanins concentrés semblent aussi augmenter le pourcentage de prolificité (Min & Hart, 2003).

Cependant, les tanins ont longtemps été considérés uniquement comme des facteurs antinutritionnels. Cela est dû aux effets néfastes que peut avoir une trop forte concentration de tanins dans une ration sur les performances zootechniques. De plus, à partir d'une certaine concentration, le tanin réduit la quantité de matière sèche consommée. Cela est probablement dû à l'astringence que peuvent procurer les tanins. L'astringence est la sensation de sécheresse dans la bouche. Cette diminution de l'appétence n'est visible qu'avec des fortes

concentrations en tanin, à partir de 50 g/kg (Lamy *et al.*, 2011). A des concentrations plus faibles, la diminution de l'appétence ne semble pas effective.

Deux hypothèses existent concernant les causes de l'astringence :

- Une interaction des tanins avec les glycoprotéines, ce qui causerait des ruptures dans la pellicule de protection salivaire.
- L'interaction du complexe tanins/protéines avec les récepteurs due à la rupture de la pellicule de protection de la muqueuse.

Une quantité trop importante de tanins peut aussi réduire la digestion des fibres (Jeronimo *et al.*, 2014). Les tanins semblent aussi donner un arôme amer à la ration.

Une grande concentration de tanins pourrait aussi endommager les reins et le foie ainsi que les tissus du rumen et former des ulcères intestinaux (Lamy *et al.*, 2011). Ces dégâts qui, dans des cas extrêmes, peuvent entraîner la mort, sont dus au fait que les tanins hydrolysables sont enzymatiquement dépolymérisés dans le rumen à cause d'un clivage des liens ester entre les glucides et les sub-unités phénoliques. Ceci a pour conséquence de produire des acides galliques. Les acides galliques sont métabolisés en pyrogallol et resorcinol qui peuvent être absorbés et devenir la cause de ces dommages cellulaires (Jeronimo *et al.*, 2014).

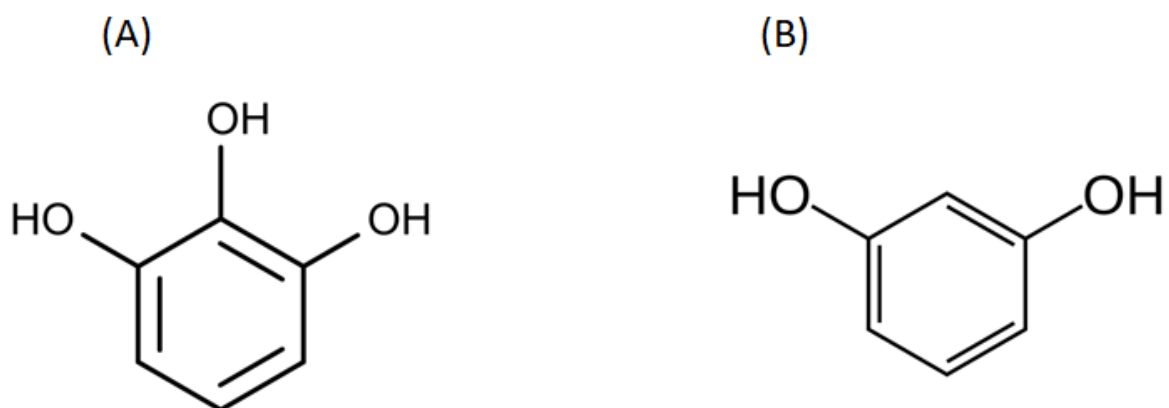


Figure 5 : Représentation de (A) Pyrogallol et (B) Resorcinol (Matta *et al.*, 2008)

f) Synthèse de la bibliographie

Il semblerait donc que les tanins impactent le fonctionnement du rumen. Ceci aurait pour conséquence de réduire les émissions de méthane des ruminants. Cela permettrait aussi de réduire la digestion des protéines au niveau du rumen et donc de favoriser leur digestion au niveau de l'intestin grêle. Cette migration partielle du flux de digestion permet une augmentation de la valeur DVE d'une ration et donc une digestion plus efficace des protéines par le ruminant pour produire le lait.

Il semblerait aussi que l'ajout de tanin à l'ensilage d'herbes permettrait d'améliorer sa conservation et donc d'augmenter sa valeur nutritionnelle.

Une meilleure conservation des fourrages, une augmentation de la valeur DVE des aliments (ce qui peut réduire les pertes d'azote et améliorer l'efficacité protéique du ruminant) ainsi qu'une diminution des émissions de méthane par unité de lait produite sont les trois facteurs qui m'ont poussé à étudier l'impact du tanin pour améliorer l'efficacité azotée des protéines et pour réduire les pollutions souvent reprochées aux élevages modernes de production laitière.

En effet, les attentes du consommateur en termes de produits alimentaires et laitiers plus particulièrement sont de plus en plus orientées vers une production plus « verte ». La population ou du moins une part grandissante de celle-ci veut des produits qui ont une plus faible empreinte écologique. La réduction des émissions de méthane pour limiter l'impact de l'agriculture sur le réchauffement climatique est au centre des débats actuels en matière de développement durable.

B. Matériel et Méthode :

Cette expérience a été réalisée sur 6 vaches laitières de race Holstein. L'objectif a été d'analyser l'impact sur l'efficacité azotée du tanin de chêne hydrosoluble ajouté à l'ensilage d'herbes, à une concentration de 1% de la MS totale de la ration.

L'expérience a été décomposée en 3 périodes : une préadaptation de 10 jours et deux périodes expérimentales de trois semaines. Les 6 vaches séparées en deux lots homogènes ont reçu, à tour de rôle, la ration avec et sans tanin, selon un dispositif en cross over.

Durant la dernière semaine de chaque période expérimentale, les prélèvements ont été réalisés. Tous les inputs (aliments) et les outputs (lait, urines, faeces) ont été pesés et analysés. Les données collectées ont servi à la réalisation d'un bilan azoté.

1) Préparation du matériel végétal :

Une parcelle composée de dactyle (*Dactylis glomerata*), de trèfle blanc (*Trifolium repens*) et de trèfle violet (*Trifolium pratense*) a été fauchée le 23 septembre 2017 et mise en balles le 25 septembre 2017. L'ensilage a été réalisé lors de la troisième coupe après un pâturage.

L'essai comprend deux types d'ensilages expérimentaux, un avec tanin (T) et un sans tanin (ST) qui servira de témoin.

Après la fauche, pour l'ensilage avec tanin, une solution composée d'eau et de tanin de chêne hydrosoluble est pulvérisée sur les andains (photos voir annexe). Dans des conditions optimales, la concentration de tanin de l'ensilage devrait être de 2.7% de la MS. Mais suite aux pertes (restes sur les bords de la cuve, percolation à travers l'andain jusqu'au sol,...), nous estimons qu'il



Figure 6 : Pulvérisation de la solution de tanin sur les andains

reste environ 2% de tanin dans la MS. Les ensilages représentant approximativement la moitié de la ration, le régime avec tanin sera donc concentré à 1% de la MS pour la ration totale finale.

Pour avoir deux ensilages les plus semblables possible, de l'eau a été pulvérisée dans des quantités similaires sur l'ensilage sans tanin.

Les deux ensilages ont été par la suite stockés en ballots dans des conditions similaires jusqu'au début de l'expérimentation le 29 janvier 2018.

2) Choix des animaux :

L'expérimentation a été réalisée sur 6 vaches de race Holstein qui proviennent du troupeau du CRA-W (Centre de Recherche agronomique Wallon). Celles-ci ont été divisées en deux groupes de trois vaches. Les critères pour leur sélection étaient :

- Des vaches multipares
- Des vaches avec un stade de lactation autour de 120 jours au début de l'expérience et de maximum 250 jours en fin d'essai afin d'avoir une production laitière la plus constante possible tout au long de l'expérience.
- Des vaches avec un niveau de production autour des 25-28 litres. La ration journalière étant liée à la production laitière, il faut des vaches avec des productions similaires.
- Des vaches avec un faible nombre de cellules somatiques, afin d'éviter les risques de mammite.
- Des vaches sans problème de santé comme des boiteries.

Les deux lots recevront à tour de rôle la ration avec tanins et sans tanins.

Les vaches sélectionnées pour l'essai sont les suivantes :

Vache	N° de lactation	Day In Milk au S1J1	Production potentielle de la ration au S1J1	Première ration
1411	4	126	27.5 L	ST
1476	2	126	27.5 L	T
5434	2	151	23 L	ST
5427	2	151	27.5 L	T
9587	1	173	23 L	T
5449	2	178	23 L	ST

Tableau 3 : Vaches sélectionnées

Comme nous pouvons le remarquer la vache 9587 ne répond pas au critère multipare. Cela est dû au fait qu'une vache a dû être retirée de l'essai avant celui-ci pour cause de boiterie. Le remplacement a été fait de manière à maximiser l'homogénéité des deux lots en termes de jours de lactation et de production.

3) Planning général :

L'expérimentation a été réalisée sur 52 jours. Elle est divisée en une période de préadaptation et 2 périodes expérimentales appelées P1 et P2.

Lors de la phase de préadaptation (10 jours), toutes les vaches ont reçu la même ration en quantité adaptée à leur production laitière. Dans le but de les habituer progressivement à la ration, le plan suivant a été établi :

- En J1 et J2, la ration était composée de $\frac{3}{4}$ de leur ration d'étable et de $\frac{1}{4}$ de la ration expérimentale.
- En J3 et J4, la ration était composée de la moitié de leur ration d'étable et de la moitié la ration expérimentale.
- En J5 et J6, la ration était composée de $\frac{1}{4}$ de leur ration d'étable et de $\frac{3}{4}$ de la ration expérimentale.
- Et de J7 à J10, la ration a été la ration définitive expérimentale.

L'ensilage utilisé lors de la phase de préadaptation a été similaire au témoin sans-tanin. La phase de préadaptation est nécessaire pour réaliser une transition sans perturber la flore du rumen et sans provoquer des troubles digestifs.

Les périodes P1 et P2 sont chacune subdivisées en 3 semaines S1, S2 et S3 pour la P1 et S4, S5 et S6 pour la P2, comme présenté dans le tableau 12.

L'objectif des semaines d'adaptation est de préparer le rumen à la présence ou non de tanin.

C'est durant les semaines de prélèvement que le bilan azoté est réalisé.

Durant l'ensemble de l'expérimentation, les vaches sont en stabulation entravée. Les semaines 1 et 4, les vaches sont dans le bâtiment dit « maternité » où elles sont traites en salle de traite. En maternité, les vaches disposent de plus de place pour se coucher et sont logées sur copeaux. Les autres semaines, les vaches sont dans le bâtiment dit « métabolisme ». Dans ce bâtiment, les vaches sont traites à la machine portative. Elles sont sur une zone en caoutchouc séparées individuellement par une cloison afin d'éviter le mélange d'aliments et/ou de matière fécale.



Figure 7 : Stabulation entravée au "métabolisme"

Période	Semaine	Date	Descriptif	Lieu d'hébergement	Mode de traite
Hors essai	0 (10 jours)	18/01/18-27/01/18	Préadaptation hors essai (sans additif)	Maternité	Salle de traite
1	1	28/01/18-04/02/18	Adaptation	Maternité	Salle de traite
1	2	05/02/18-11/02/18	Adaptation	Métabolisme	Machines portatives
1	3	12/02/18-18/02/18	Prélèvement	Métabolisme	Machines portatives
2	4	19/02/18-25/02/18	Adaptation	Maternité	Salle de traite
2	5	26/02/18-04/03/18	Adaptation	Métabolisme	Machines portatives
2	6	05/03/18-11/03/18	Prélèvement	Métabolisme	Machines portatives

Tableau 4 : Planning général de l'expérience

Une journée d'essai, en semaine de prélèvement, se déroule comme suit :

Heure	Activité	Semaine
6h30	Arrivée	toutes
7h30	Traite du matin	toutes
	Echantillons composites de lait	S3 et S6
8h30	Distribution de la ration	toutes
10h30	Récolte des matières fécales	S3 et S6
10h30	Récolte des urines	S3 et S6
15h	Pesée des rations du lendemain	toutes
16h30	Traite du soir	toutes
17h30	Distribution de la ration	toutes

Tableau 5 : Planning journalier

Le temps entre les activités est utilisé pour ramasser et rendre les refus tombés par terre et maintenir les vaches propres.

4) Ration expérimentale :

La ration journalière est subdivisée en deux parts égales : la ration du matin donnée à 8h30 et la ration du soir donnée à 17h30.

La ration est composée d'un ensilage d'herbe (avec ou sans tanin), d'un ensilage de maïs, de pulpes de betteraves déshydratées, de tourteaux de colza schilfers, de froment, d'un complément minéral et d'oligoéléments « pH7 oligo », de CaCO₃ et de NaCl.

Les rations sont prédéfinies pour chaque vache avant l'essai, en fonction de leur production laitière. La limite a été placée à 25L. Les vaches de la catégorie plus de 25L sont : la 5427, la 1476 et la 1411. Les vaches de la catégorie moins de 25L sont : la 9587, la 5449 et la 5434. La ration pour les vaches à moins de 25 litres correspond à celle de plus de 25 litres multiplié par un ratio de 0.93 à l'exception des minéraux.

La teneur en matière sèche des concentrés et compléments minéraux est mesurée au préalable. La MS de l'ensilage d'herbe tanin et sans tanin ainsi que celle de l'ensilage de maïs sont définies durant la période d'adaptation.

La teneur en MS du maïs est testée toutes les semaines de l'expérimentation voire tous les jours pendant les deux semaines de prélèvement afin de vérifier la constance de celle-ci. La MS de l'ensilage d'herbe est testée à l'ouverture de chaque nouveau ballot ainsi que tous les jours pendant les deux semaines de prélèvement afin de vérifier la constance de celle-ci. La matière sèche pour les concentrés est réalisée une fois par période durant la semaine de prélèvement.

Les rations calculées qui ont été utilisées durant l'expérimentation sont les suivantes. Ce tableau reprend la somme de la ration du soir et de celle du matin.

Poids en Matière sèche	Ration témoin pour vache < à 25 litres de lait par jour	Ration témoin pour vache > à 25 litres de lait par jour	Ration tanin pour vache < à 25 litres de lait par jour	Ration tanin pour vache > à 25 litres de lait par jour
Ensilage d'herbe ST	9.1 kg	9.8 kg	0 kg	0 kg
Ensilage d'herbe T	0 kg	0 kg	9.1 kg	9.8 kg
Ensilage de maïs	4.45 kg	4.78 kg	4.45 kg	4.78 kg
Tourteau de colza (schilfers)	1.60 kg	1.71 kg	1.60 kg	1.71 kg
Pulpe de betterave déshydratée	2.33 kg	2.51 kg	2.33 kg	2.51 kg
Froment	0.56 kg	0.595 kg	0.56 kg	0.595 kg
pH7 oligo	75 g	75 g	75 g	75 g
CaCO3	40 g	40 g	40 g	40 g
NaCl	15 g	15 g	15 g	15 g
Total	18.17 kg	19.525 kg	18.17 kg	19.525 kg

Tableau 6 : Ration journalière

Les valeurs nutritionnelles pour cette ration sont de 932 VEM et 68 DVE par kg de MS.

Cette ration est volontairement déficiente en DVE (90% des besoins) afin de pouvoir mettre en évidence l'impact du tanin sur les sites de digestion des protéines et vérifier l'impact sur l'efficacité azotée et la production laitière. L'hypothèse est que la complexation des protéines va réduire leur dégradabilité dans le rumen et augmenter leur absorption dans l'intestin grêle. Ceci aura pour conséquence d'augmenter la valeur DVE de la ration et ainsi de permettre une utilisation plus efficace des protéines.

Le lot 1 reçoit la ration sans tanin durant la P1 et la ration avec tanin durant la P2 et le lot 2 à l'inverse reçoit la ration avec tanin en P1 et la ration sans tanin en P2. Cette disposition en carré latin est réalisée afin de minimiser les impacts extérieurs propres à la vache ou aux conditions extérieures entre autres. Les vaches du lot 1 sont la 1411, la 5449 et la 5434. Les vaches du lot 2 sont la 9587, la 5427 et la 1476.

Les rations du soir et du matin ainsi prédéfinies sont pesées la veille et gardées au frais afin d'éviter l'altération des aliments. Elles sont données de manière synchronisée aux vaches à l'heure précise définie dans l'horaire.

5) Prélèvements et analyses des refus :

Les refus du matin sont retirés avant l'incorporation de la ration du soir dans les auges puis redistribués par-dessus la ration du soir. Les refus du soir sont prélevés avant l'incorporation de la ration du matin. En semaine de prélèvement, les refus du soir sont pesés et identifiés. Si la quantité de refus est supérieure à 500 g de matière fraîche, ils seront passés à l'étuve pour mesurer leur teneur en matière sèche (cfr : analyse de la matière sèche). Ils seront ensuite broyés à 1mm et 0.5 mm pour l'analyse de la composition chimique mesurée par infrarouge et la teneur en matière azotée totale (MAT) par la méthode de Dumas. Si la quantité est inférieure à 500 g, leur composition chimique et leur teneur en matière sèche seront estimées (moyenne des valeurs pour les refus de même catégorie).

6) Prélèvements et analyses des urines :

Les poches à urine qui ont servi lors de cette expérience ont été fabriquées au CRA-W. Il s'agit de chambres à air qui ont été coupées, puis recollées afin de prendre la forme d'un entonnoir (photos voir annexe). La plus grande des extrémités est fixée à la vache de manière à avoir l'entièreté de sa vulve dans la poche mais sans obstruer l'anus. La fixation est réalisée grâce à de la colle sur la peau de l'animal. L'extrémité la plus fine est fixée à l'aide de colle et d'un serre-joint à un tube flexible. Le tube flexible est, quant à lui, fixé à un bidon en plastique qui permettra la collecte des urines. Les tubes flexibles sont soutenus par une attache mobile (laisse de chien sur enrouleur



Figure 4 : Système de collecte des urines

automatique) qui permet de suivre les mouvements des vaches et de ne pas forcer sur la poche. Les poches sont fixées la veille des semaines de prélèvements.

La collecte des urines ne se réalise que lors des deux semaines de prélèvements.

Les bidons de collecte sont changés le soir afin d'éviter tout débordement. Afin d'éviter les pertes ammoniacales des urines, le pH de celles-ci est maintenu à une valeur de 2-3. Cette opération est réalisée à partir d'acide sulfurique à une concentration de 4 M. Les pH

sont mesurés en journée, après chaque ajout d'urine, à l'aide d'une tige colorimétrique et sont réduits au besoin. Toutes les quantités d'acide ajoutées sont inscrites afin de pouvoir être retirées du volume total urinaire collecté.

Une journée de collecte des urines va de 10h30 à 10h30 le lendemain. L'urine composite du jour X est donc composée des urines collectées dans le bidon du soir du jour X et des urines collectées jusqu'à 10h30 du jour X+1.

Les deux bidons d'urine sont pesés afin de connaître le total d'urine récoltée. Ensuite, par vache, les urines sont homogénéisées dans un même récipient. Un échantillon de 500 ml est filtré avec un filtre plissé 597 ½.

Tous les jours des deux semaines de prélèvement, 80 ml de l'urine filtrée sont collectés puis stockés au congélateur pour une analyse de la teneur en MAT. Les jours 2 et 5, un pot de 80 ml est rempli avec 1 ml d'urine et 49 ml d'eau désionisée. Ces échantillons serviront à la quantification de l'urée dans les urines. Pour l'analyse de l'urée, seul le J5 sera analysé sauf si la vache n'est plus en collecte d'urine au J5.

7) Prélèvements et analyses des matières fécales :

Lors des semaines de prélèvement, les matières fécales sont collectées. La matière fécale du jour X est composée de la matière fécale excrétée par les vaches à partir de 10h30 au jour X jusqu'à 10h30 du jour X+1.

Chaque vache possède deux bacs plastique pour ses matières fécales (MF), un pour les souillées ou potentiellement souillées et un pour les propres. Les matières fécales sont récoltées tout au long de la journée grâce à une pelle spécifique à chaque vache.

Chaque jour, la quantité totale de matières fécales collectées est pesée. Le bac des matières fécales propres est ensuite homogénéisé. Dans le bac ainsi homogénéisé 800 g sont prélevés pour réaliser une quantification de la teneur en matière sèche. L'opération est similaire à la mesure de la teneur en matière sèche des aliments et est réalisée dans des barquettes en aluminium. Cependant, les matières fécales étant plus compactes et très humides, il est important, au cours du séchage, de casser la croûte de matières fécales qui se forme à la surface de la barquette pour permettre un séchage homogène et éviter les risques de

moisissure. L'opération de « décroûtage » est réalisée 2 fois, le lendemain et le surlendemain de la collecte.

Une fois la teneur en matière sèche des matières fécales déterminée, l'échantillon est ensuite broyé pour les analyses. Une partie est broyée à 0.5 mm pour l'analyse de la MAT et à 1 mm pour une analyse infrarouge.

8) Prélèvements et analyses du lait :

La traite est réalisée à 7h30 et 16h30. Lorsque les vaches sont à la maternité, elles sont traites à la salle de traite avant le reste du troupeau et la production de chacune est enregistrée.

En semaine de prélèvement de J1 pm à J6 am, les vaches sont traites à la machine à traire portative (photo voir annexe). Le lait de chaque vache est pesé, filtré et homogénéisé.

Pour chaque traite et pour chaque vache, 50 ml de lait sont prélevés et conservés avec 2 pastilles d'azide pour l'analyse de la composition chimique mesurée par infrarouge. L'azide (azoture de sodium) est un composé destiné à la conservation des fluides. Il possède d'excellentes propriétés biocides.

Chaque matin, un échantillon composite est recomposé en mélangeant du lait du matin et du lait de la veille au soir proportionnellement au poids de lait produit par la vache lors de ses traites. Le lait du matin est versé encore chaud sur le lait de la veille. Si besoin, le lait du matin peut être maintenu au bain marie à 40°C pendant la traite du matin afin d'éviter son refroidissement et la dissociation des composants. Le lait composite est alors conservé au congélateur et servira à l'analyse de la teneur en MAT.

En J2 et J5 des semaines de prélèvement, un pot de lait composite supplémentaire est réalisé et sera congelé. Celui-ci servira à l'analyse du taux d'urée. Seul le J5 sera analysé sauf si la vache n'est plus en collecte d'urine au J5.

La semaine d'analyse pour la collecte de lait dure donc 5 jours. Elle va du lundi traite du soir au samedi traite du matin. Le jour X est composé du lait du soir du jour X et le lait du matin du jour X+1.

9) Analyses de la conservation des ballots d'ensilage d'herbe

Pour chaque nouveau ballot, un échantillon représentatif des deux ensilages est prélevé. Cet échantillon est composé à partir de plusieurs prélèvements en différents endroits du ballot en ne prenant pas des prélèvements aux bords du ballot.

L'échantillon est coupé finement à l'aide d'une trancheuse afin d'obtenir un fourrage avec des brins d'une longueur moyenne de moins d'un centimètre. L'ensilage haché est pesé afin d'incorporer 50 g dans un récipient d'une contenance d'un litre. 300 g d'eau distillée sont ensuite ajoutés au récipient. Celui-ci est ensuite fermé hermétiquement et mis à agiter durant une heure.



Figure 9 : Agitateur

Le mélange est ensuite laissé au repos durant 22h30 à 4°C. Après ce repos, 150g d'eau distillée supplémentaire sont incorporés et l'échantillon est de nouveau mis à agiter durant 30 minutes.

Le pH de la solution est ensuite déterminé à l'aide d'un pH-mètre calibré au préalable. La solution est ensuite filtrée avec un filtre à café. Un échantillon du filtrat est collecté pour l'analyse des acides gras à courte chaîne. La quantification des AGV et acide lactique se fait par la méthode HPLC (chromatographie en phase liquide).

Le reste de la solution est acidifié à un pH entre 2 et 3 à l'aide d'acide sulfurique 96% et est collecté afin d'analyser sa teneur en ammoniac via la méthode Kjeldhal.

10) Prélèvements et analyses du jus de rumen

Le dernier jour des deux semaines de prélèvements, pour la ration du matin, un prélèvement de jus de rumen est réalisé à l'aide d'une sonde œsophagienne avant la distribution de la ration ainsi que 2 et 4 heures après la ration, du liquide ruminal est collecté.

Le jus collecté est ensuite filtré et centrifugé durant 10 min à 18°C à 1200g. Après centrifugation, la solution est placée dans un berlin. 30 ml sont collectés pour l'analyse des acides gras à courte chaîne (méthode HPLC). Le reste est acidifié à un pH entre 2 et 3 à l'aide d'acide sulfurique 96% et servira à l'analyse de sa teneur en ammoniac (méthode de Kjeldhal).

A l'aide de la composition en acide gras volatil du jus de rumen, il est possible de réaliser une prédiction des émissions de méthane. Cette prédiction est basée sur la compétition entre les AGV et le méthane sur la concentration en di-hydrogène.

L'équation est (Demeyer & Fievez., 2000) :

$$\text{Méthane} = 0.45 * \text{acide acétique} - 0.275 * \text{acide propionique} + 0.4 * \text{acide butyrique}$$

Il existe une autre équation (Ramin & Huhtanen., 2013) :

$$\text{Méthane} = 0.5 * \text{acide acétique} - 0.25 * \text{acide propionique} + 0.5 * \text{acide butyrique}$$

Les concentrations en acide acétique, propionique et butyrique pour les prédictions sont basées sur des moyennes journalières (Moss *et al.*, 2000). Avant de pouvoir quantifier les prédictions de méthane, les concentrations massiques doivent être converties en mol/mol d'AGV. Pour cette expérience, nous ne possédons pas les moyennes journalières mais juste des concentrations instantanées à 0h, 2h et 4h après la ration. Il n'est donc pas possible de quantifier la production de méthane avec précision mais les valeurs nous permettent de réaliser une comparaison entre la ration avec tanin et la ration témoin à ces moments.

11) Pesées des vaches :

Les vaches sont pesées à 3 moments, chaque fois 2 jours d'affilée pour obtenir un poids moyen. La pesée est réalisée à la sortie de la salle de traite le matin, les 2 premiers jours de la S1, de la S4, et de la semaine après l'essai. L'objectif de cette pesée est d'observer une variation potentielle de poids des vaches durant l'expérimentation.

12) Analyse de la teneur en matière sèche des aliments :

L'aliment dont il faut déterminer la teneur en matière sèche est prélevé de manière homogène et la plus représentative possible. Pour les concentrés et le maïs, une barquette en aluminium est pesée à vide afin d'obtenir le poids de la tare. Le maïs ou les concentrés sont ensuite pesés dans la barquette afin d'obtenir la donnée poids frais + tare. La barquette est ensuite placée dans une étuve programmée à 60°C pendant une semaine. La barquette est ensuite pesée afin d'obtenir la donnée poids sec + tare. Une fois les tares déduites, le ratio poids sec sur poids humide nous donne la teneur en matière sèche. La même opération est réalisée sur l'ensilage à l'exception de la barquette en aluminium qui est remplacée par un sac plastique micro-perforé prévu à cette effet.

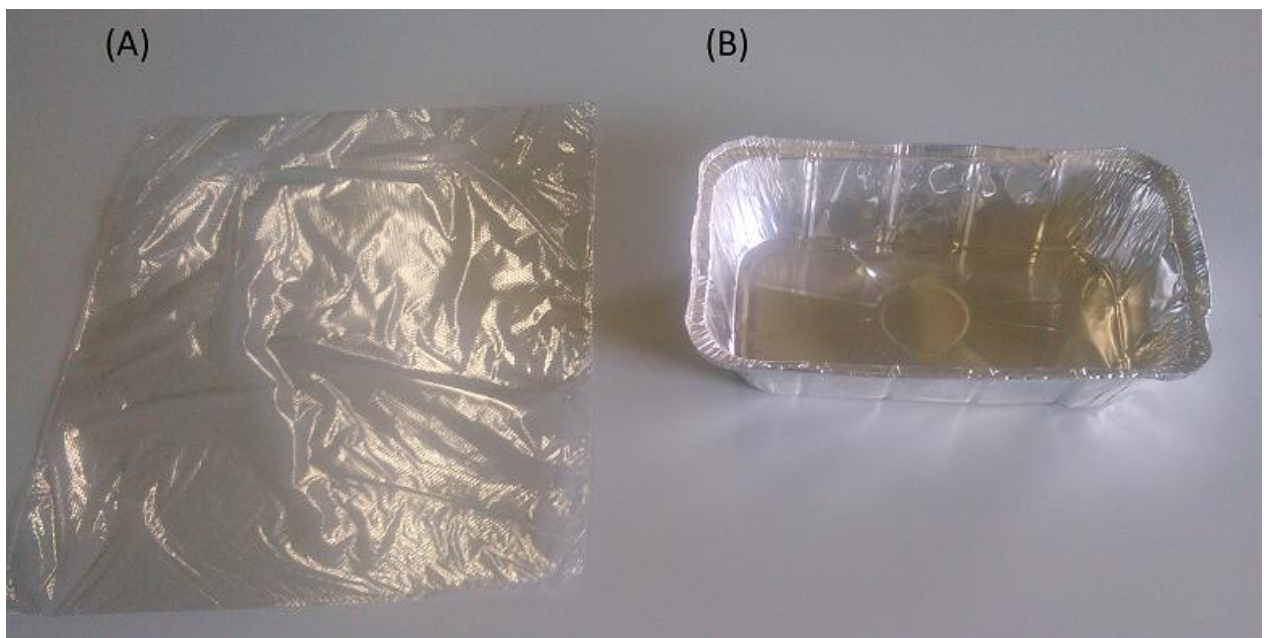


Figure 10 : (A) Sac micro-perforé pour l'analyse de la MS des fourrages et (B) barquette en aluminium pour l'analyse de la MS du maïs et des concentrés

13) Traitements et analyses des échantillons d'aliments :

Les aliments qui sont passés à l'étuve pour réaliser la teneur en matière sèche ont ensuite été broyés. Le broyage se réalise en deux étapes : un pré-broyage grossier et un broyage plus fin au cycloTech.

Les aliments qui seront analysés à l'infrarouge sont broyés à 1mm. Les aliments qui seront analysés par la méthode de Dumas sont broyés à 0.5 mm.

Les concentrés seront analysés pour chaque semaine de prélèvement à l'aide d'un échantillon composite. Les analyses réalisées sont la composition chimique mesurée par infrarouge et la teneur en matière azotée totale (MAT) par la méthode de Dumas.

L'ensilage de maïs est analysé tous les jours durant les semaines de prélèvement. Les analyses réalisées sont la composition chimique mesurée par infrarouge et la teneur en matière azotée totale (MAT) par la méthode de Dumas.

L'ensilage d'herbes est également analysé tous les jours durant les semaines de prélèvements. Les analyses réalisées sont la composition chimique mesurée par infrarouge et la teneur en matière azotée totale (MAT) par la méthode de Dumas.

14) Analyse du spectre infrarouge :

L'analyse de la composition par spectrométrie dans le proche infrarouge est réalisée sur un spectromètre proche infrarouge (appareil XDS, Foss). L'appareil nous permet d'obtenir le profil spectral du composé à analyser à la longueur d'onde du proche infrarouge (780 à 2500 nm). Après l'interaction des différents faisceaux monochromatiques, la lumière réfléchie est mesurée. Le pourcentage d'énergie réfléchi par l'échantillon est fonction des différents constituants de l'échantillon. Les données sont ensuite compilées et présentées sous la forme d'un spectre proche infrarouge.



Figure 5 : CycloTech

Chaque type d'échantillon (ensilage d'herbes, ensilage de maïs, ...) possède, sur base d'une grande base de données, des corrélations qui permettent, à l'aide du spectre, de quantifier le pourcentage de certains éléments, comme par exemple la teneur en cendre, matière grasse, matière protéique, matière organique, la digestibilité de la matière organique,.... Les paramètres conservés pour notre analyse sont : la teneur en matière organique des aliments et la digestibilité de la matière organique pour les aliments, la teneur en matière grasse pour le lait. La teneur en protéines bien que disponible a, elle, été analysée par la méthode de Dumas car celle-ci est plus précise.

L'analyse proche infrarouge a été réalisée deux fois pour chaque échantillon. C'est la valeur moyenne de ces deux données qui nous servira de valeur pour l'échantillon.

15) Analyse de la MAT (DUMAS) :

L'analyse de la Matière Azotée Totale (MAT) a été réalisée par la méthode Dumas.

Cette méthode consiste en une combustion totale de la matrice sous oxygène. Les gaz ainsi produits vont être réduits par du cuivre puis desséchés. L'azote va ensuite être détecté à l'aide d'un détecteur universel.

L'analyse se réalise via les étapes suivantes :

- Le composé à analyser est pesé et placé dans un creuset métallique lui-même placé dans une nacelle.
- L'échantillon entre dans le tube de combustion.
- L'oxygène est injecté dans le tube à combustion et la température monte à 940°C.
- Une combustion « flash » est réalisée.
- La combustion de la nacelle fait monter la température jusqu'à 1800°C.
- Une oxydation et un piégeage des halogènes sur de l'oxyde cobalto cobaltique argenté et sesquioxyde de chrome granulaire sont réalisés.
- Les oxydes d'azote sont réduits en N₂, les composés soufrés et l'excès d'oxygène sont piégés par du cuivre à 700°C. Les gaz présents dans l'hélium sont : N₂, CO₂, et H₂O.
- Les éléments non dosés sont piégés : l'H₂O par l'anhydride et le CO₂ par l'ascarite.
- L'azote est séparé du méthane éventuel (présent si trop grande quantité analysée) par chromatographie

- La détection sur catharomètre est réalisée. Le signal est collecté et les données traitées.

Cette méthode nous donne un pourcentage d'azote dans les matrices analysées (aliments, lait, urine, matière fécale).

16) Analyse du taux d'urée :

L'analyse de la concentration en urée du lait et des urines est réalisée par un « Automated Wet Chemistry Analyzer - Continuous Flow Analyzer » de la marque SKYLAR . Il s'agit d'une machine en plusieurs parties. Les échantillons sont préparés sur une plateforme de sélection automatique. L'échantillon est dilué dans une solution de chlorure de sodium et est dialysé avec un réactif coloré. Par la suite, un réactif catalyseur acide est ajouté. Le flux analytique est chauffé à 90°C. Un chromogène se forme entre l'urée et le diacétyl monoxim. La présence de thiosemicarbazide intensifie la couleur. L'absorbance est mesurée à 520 nm et détermine la concentration en urée du composé analysé.



Figure 12: Automated Wet Chemistry Analyzer - Continuous Flow Analyzer

17) Méthode de Kjeldhal :

La méthode Kjeldhal est la méthode de référence pour la quantification de l'azote organique total. Cette méthode permet aussi de mesurer l'azote ammoniacal.

Le dosage est réalisé par un titrage direct. La solution à analyser est mélangée avec de l'acide borique en excès. Cet acide faible ne réagit pas avec l'ammoniac et sert uniquement à le piéger. L'ammoniac piégé est neutralisé par une solution étalonée d'acide chlorhydrique en présence d'un indicateur coloré. Lorsque l'équilibre acidobasique est atteint, la concentration en ammoniac peut être calculée.

18) Vérification de la qualité de l'ensilage :

Le facteur période qui a un impact significatif pour certaines données peut être décomposé en 2 autres facteurs :

- Le facteur « temps » : la production laitière d'une vache va dépendre de son stade sur la courbe de lactation. La production laitière impacte la composition du lait.
- Le facteur « ballots » : durant les périodes et entre celles-ci, plusieurs ballots d'ensilage différents ont été donnés aux vaches. Cela peut impacter la production laitière si la qualité nutritionnelle des ballots diffère.

Une analyse de la prédiction du DVE par l'analyse du spectre infrarouge proche de l'ensilage d'herbe a été réalisée en fonction de la période et aucune différence significative n'a été trouvée ($p\text{-value}=0.1514$). Les autres aliments ont des valeurs de DVE plus constantes.

19) Traitement des données statistiques :

Les données collectées sont toutes répertoriées dans un fichier Excel afin de pouvoir calculer le bilan azoté total. Seules les données complètes et pour lesquelles toutes les valeurs ont été collectées sont conservées.

Les données sont traitées statistiquement. Une vérification des conditions d'application des procédés statistique a été réalisée : analyse de normalité (normalité univariée) et analyse d'égalité des variances (test de Levene). Le Test est une ANOVA 3 modèle mixte répété. Les facteurs fixes sont la période et la ration et l'aléatoire est la vache.

Pour le taux d'urée du lait, nous n'avons qu'une seule donnée par vache par semaine de prélèvement. C'est pourquoi un test statistique d'analyse de la variance à un facteur fixe (la ration) a été calculé.

Les données provenant du prélèvement du jus de rumen comme le pH, les AGV et la teneur en ammoniac, ainsi que la production de méthane sont analysées statistiquement à l'aide d'une Anova. Il s'agira d'un AV3 mixte avec comme facteurs fixes la ration et l'heure

du prélèvement et comme facteur aléatoire la vache. N'ayant qu'une répétition, l'interaction ration-heure ne peut pas être analysée.

Les données pour la concentration en acide gras volatil des ballots sont réalisées avec un test de comparaison des moyennes avec comme seul facteur la ration.

Pour les données provenant du spectre infrarouge, une analyse en composante principale a été réalisée pour vérifier l'impact du tanin sur la composition du lait.

C) Résultats

1) Résultats escomptés :

Sur base de la littérature, notre hypothèse est que le tanin ajouté à l'ensilage d'herbe au moment de l'andainage va subir une réaction de complexation avec les protéines de l'herbe. Ceci doit avoir pour conséquence de réduire la protéolyse durant la conservation de l'ensilage et donc de réduire le taux d'ammoniac de l'ensilage et de préserver les protéines de l'herbe.

Le tanin, s'il est à une concentration supérieure à 5% pourrait réduire l'ingestion de la ration. A une concentration inférieure, l'astringence du tanin n'impacterait pas la quantité de matière sèche ingérée.

Dans le rumen, le tanin pourrait soit maintenir sa réaction de complexation avec les protéines, ce qui réduirait leur digestion dans le rumen, soit interagir avec la flore du rumen.

Dans le cas de la complexation, les tanins vont réduire la protéolyse et devraient donc diminuer la production d'ammoniac dans le rumen. Une production inférieure d'ammoniac aurait pour conséquence de réduire la production d'urée que ce soit dans le lait ou dans les urines.

Dans le cas où le tanin interagit avec la flore du rumen, celui-ci devrait réduire la concentration d'archaeas méthanogènes et de certains protozoaires. Cela aurait pour conséquence de réduire les émissions de méthane, mais aussi de réduire la digestion de la matière organique.

Lorsque les protéines passent dans la caillette, elles devraient se libérer de la réaction de complexation à cause du pH acide. Elles redeviendraient plus digestibles avant de se retrouver dans l'intestin grêle. Leur digestion fournirait ainsi plus d'acides aminés pour la production laitière.

Si tous les autres besoins nutritionnels sont couverts et que les protéines sont le seul facteur limitant, l'ajout de tanin à la ration pourrait augmenter la production laitière. Dans le

cas contraire, les acides aminés supplémentaires seraient évacués sous forme d'urée. L'ajout de tanin pourrait aussi, en cas de carence protéique, augmenter le taux de protéine du lait.

Avec apport de tanin, les pertes azotées urinaires doivent être inférieures. Cependant, si la réaction de complexation ne se rompt pas dans l'intestin grêle, les pertes d'azote fécal peuvent être supérieures.

L'augmentation de la production laitière liée à une consommation similaire devrait donc mener à une efficacité azotée supérieure.

2) Valeurs sélectionnées

Les données analysées ne l'ont été que pour les combinaisons vaches jour avec un bilan complet. Le nombre de données est donc réduit à : n global = 48, n rations avec tanin = 26, n rations sans tanin = 22, n période 1 = 24, n période 2 = 24.

3) Analyse de l'ensilage

Composition en acides gras à courte chaîne du fourrage

mg/g MS	Moyenne T	Moyenne ST	p-value de la ration
Acide Lactique	39.7	28.45	0.003
Acide Acétique	7.84	6.24	0.038
Acide Propionique	0.14	0.18	0.598
Acide Iso-butyrique	0.41	0.39	0.704
Acide Butyrique	0.34	0.30	0.052
Acide Iso-valérique	0	0	/
Acide Valérique	0	0	/

Tableau 7 : Composition en acides gras à courtes chaîne du fourrage

La présence de tanin dans les ballots a un impact hautement significatif sur la teneur en acide lactique de l'ensilage, un impact significatif sur la teneur en acide acétique et en acide butyrique de l'ensilage et pas d'impact significatif sur la teneur en acide propionique et iso-butyrique de l'ensilage.

	Moyenne T	Moyenne ST	p-value de la ration
MS	50.48	48.42	0.175
pH	5.08	4.80	0.001
Ammoniac (%NH3/Ntot)	4.93	5.35	0.326

Tableau 8 : Concentration en ammoniac de l'ensilage

L'ajout de tanin n'a pas eu d'impact sur la teneur en matière sèche des ballots mais par contre, il a impacté de manière très hautement significative le pH de ceux-ci.

Bien qu'on observe en moyenne proportionnellement moins d'ammoniac dans les ballots avec tanin, l'additif n'a pas eu d'impact significatif sur le pourcentage d'ammoniac par rapport à la teneur en azote totale du fourrage.

4) Analyse des refus

	Moyenne T	Moyenne ST	Moyenne P1	Moyenne P2	p-value ration	p-value période	p-value interaction
% de refus	1.71	2.14	2.20	1.62	0.4049	0.2931	0.4672

Tableau 9 : Analyse statistique des refus

Les données du tableau 15 représentent les refus de la ration en moyenne par jour par vache. Le % de refus est calculé en réalisant le pourcentage de la MS des refus par rapport au total de la MS donnée à la vache sur la journée.

Le facteur « ration » et le facteur « période » n'ont pas d'impact significatif sur le pourcentage de refus. Leur interaction n'a pas d'impact significatif non plus.

5) Analyse du jus de rumen

		Lactic	Acetic	Propionic	Iso But	Butyric	Iso Val	Valeric	NNH3
		mg/ml sol	mg/ml sol	mg/ml sol	mg/ml sol	mg/ml sol	mg/ml sol	mg/ml sol	mgN/100ml
T	0h	0.00	2.56	0.70	0.12	0.74	0.06	0.04	6.83
	2h	0.19	3.33	1.39	0.12	0.90	0.12	0.11	21.01
	4h	0.00	3.48	1.23	0.12	1.01	0.10	0.12	12.63
ST	0h	0.00	2.84	0.78	0.11	0.85	0.07	0.05	7.14
	2h	0.07	3.28	1.44	0.12	0.99	0.13	0.11	20.13
	4h	0.00	3.49	1.30	0.10	1.11	0.11	0.12	13.22

Tableau 10 : concentration des acides gras à courte chaîne et ammoniac du jus de rumen en fonction de la ration et du temps de prélèvement

pH	T	ST
0h	7.32	7.19
2h	6.88	6.78
4h	6.89	6.90

Tableau 11 : pH du jus de rumen en fonction de la ration et du temps de prélèvement

	P-value ration	P-value heure
Acide lactique	0.1217	0.2102
Acide acétique	0.7823	0.0015
Acide propionique	0.3512	<0.0001
Acide iso-Butyrique	0.4575	0.1188
Acide Butyrique	0.0658	0.0058
Acide Iso-Valérique	0.1409	0.0053
Acide Valérique	0.4249	0.0001
Ammoniac	0.9854	<0.0001
pH	0.3445	<0.0001

Tableau 7 P-value des Acides gras à courte chaîne, ammoniac et pH du jus de rumen

Mol CH ₄ /mol d'AGV	T	ST
0h	0.318	0.317
2h	0.271	0.266
4h	0.292	0.287

Tableau 13 : Prédiction des émissions de méthane par la méthode de Demeyer & Fievez, (2000) en mol de CH₄/mol d'AGV

Mol CH ₄ /mol d'AGV	T	ST
0h	0.370	0.368
2h	0.320	0.315
4h	0.342	0.337

Tableau 14 : Prédiction des émissions de méthane par la méthode de Ramin & Huhtanen, (2013) en mol de CH₄/mol d'AGV

	P-value ration	P-value heure
Prédiction méthane par Demeyer & Fievez, (2000)	0.1045	<0.0001
Prédiction méthane par Ramin & Huhtanen, (2013)	0.1493	<0.0001

Tableau 15 : P-value des prédictions des émissions de méthane

Le facteur « ration » n'a pas eu d'impact significatif sur la composition en acides gras volatils du jus de rumen (Tableau 16). Il semblerait juste que la ration donnerait une tendance pour la concentration en acide butyrique. Le facteur « heure » lui a un impact très hautement significatif pour la concentration en acide propionique et acide valérique, un impact hautement significatif pour les acides acétique, butyrique et iso-valérique et pas d'impact significatif pour l'acide lactique et l'acide Iso-butyrique.

Le facteur « ration » n'a pas d'impact significatif sur la teneur en ammoniac du jus de rumen, le facteur « temps » a un impact très hautement significatif (Tableau 16).

Le facteur « ration » n’a pas d’impact significatif sur le pH du jus de rumen, le facteur « temps » a un impact très hautement significatif (Tableau 16).

Le facteur « ration » n’a pas d’impact significatif sur les deux prédictions de méthane, le facteur « temps » lui a un impact très hautement significatif (Tableau 15).

6) Analyse de la digestibilité apparente

	Moyenne T	Moyenne ST	Moyenne P1	Moyenne P2	p-value ration	p-value période	p-value interaction
Digestibilité de la MS	62.11	62.91	61.37	63.58	0.4844	0.0055	0.0379
Digestibilité de la MO ¹	66.4	65.73	65.94	66.24	0.6721	0.6455	0.9780
Digestibilité du N	59.1	60.9	59.5	60.3	0.0317	0.4113	0.0242

Tableau 16 : Analyse statistique de la digestibilité apparente

Les digestibilités apparentes, présentées dans le tableau 16, ont été calculées en réalisant le ratio matière ingérée moins la fécale sur la matière ingérée.

Le facteur « ration » n’a pas d’impact significatif sur la digestibilité fécale apparente de la matière sèche. Par contre, la période a un impact hautement significatif, et l’interaction présente également un impact significatif (Figure 13).

¹ Les conditions d’application du test statistique ne sont pas respectées (pas d’égalité des variances). La variable Digestibilité de la MO a été transformée par la fonction « log ». La p-value du tableau est donc celle pour log de la Digestibilité de la MO.

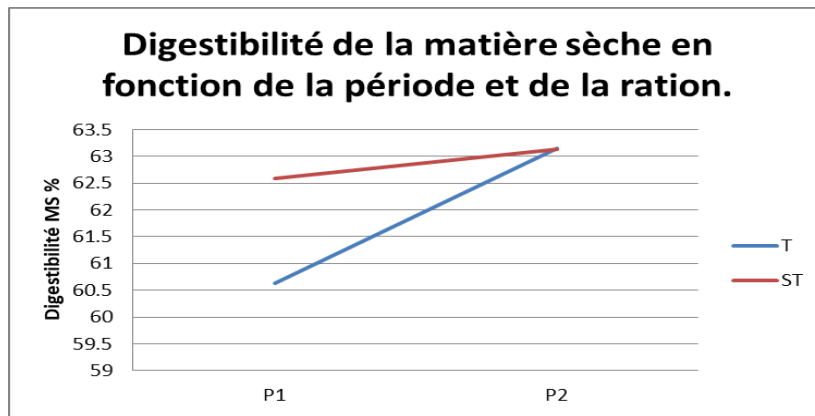


Figure 6 : Digestibilité de la MS en fonction de la période et de la ration

Le facteur « ration » et le facteur « période » n'ont pas eu un impact significatif sur la digestibilité apparente de la matière organique.

La ration a un impact significatif sur la digestibilité apparente de l'azote. Le facteur « période » n'a pas d'impact significatif. L'interaction entre la période et la ration (Figure 14) nous oblige à analyser l'impact de la ration sur chacune des deux périodes. Pour la P1, le facteur ration a une p-value de 0.9294 et est donc non significatif. Pour la P2, le facteur ration a une p-value 0.0064 et est donc hautement significatif. La valeur pour P2 ST est 5% supérieure à P2 T.

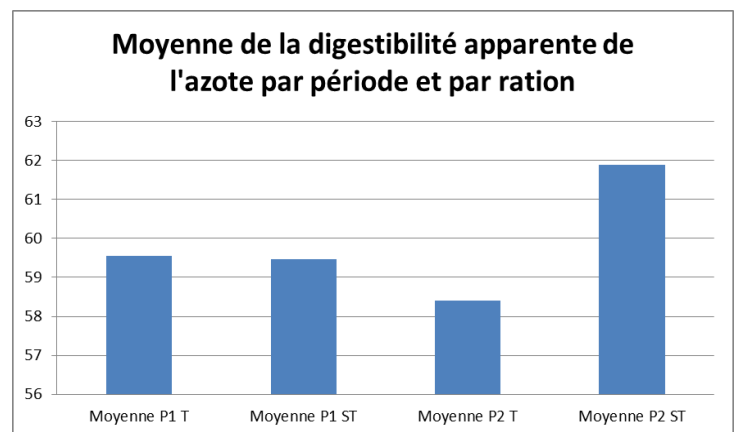


Figure 14: Digestibilité apparente de l'azote en fonction de la période et de la ration

7) Analyse en composantes principales du spectre du lait

L'ACP des 5 principaux facteurs du spectre infrarouge du lait n'a pas donné de différence significative en fonction du facteur ration (Tableau 17). Les résultats dépendant de cette analyse devraient eux aussi, par conséquent, ne pas montrer de différence significative en fonction de la ration. C'est pourquoi le spectre du lait ne sera pas étudié plus en détail.

ACP	Part de la composante	p-value
1	64.01%	0.566
2	13.7%	0.642
3	8.78%	0.588
4	4.06%	0.733
5	2.6%	0.532

Tableau 17 : Valeur de l'ACP du spectre infrarouge du lait en fonction de la ration

8) Analyse de la production et de la composition du lait :

	Moyenne T	Moyenne ST	Moyenne P1	Moyenne P2	p-value ration	p-value période	p-value interaction
Production de lait (kg)	23.21	23.52	23.97	22.73	0.4572	0.0780	< 0.0001
% TB	4.49	4.64	4.59	4.53	0.2303	0.4792	0.4092
% TP	2.76	2.74	2.65	2.84	0.3887	0.0019	0.0135
% N	0.45	0.44	0.43	0.45	/	/	/
Lait corrigé (kg)	23.76	24.44	24.65	23.49	0.2777	0.1604	0.0004

Tableau 18 : Valeur statistique pour la production laitière

D'après le tableau 18, le facteur « ration » et le facteur « période » n'ont pas eu d'impact significatif sur la production laitière. Le facteur « période » semble cependant donner une tendance avec une valeur supérieure pour la P1. Il y a une interaction très hautement significative avec les facteurs « période » et « ration ».

Le facteur « ration », le facteur « période » et leur interaction n'ont pas eu d'impact significatif sur la teneur en matière grasse du lait (mesure IR).

Le facteur « ration » n'a pas eu d'impact significatif sur la teneur en matière protéique du lait. La période a un impact hautement significatif. L'interaction entre le facteur « ration » et le facteur « période » a un impact significatif sur la teneur en protéines (TP) (mesure IR).

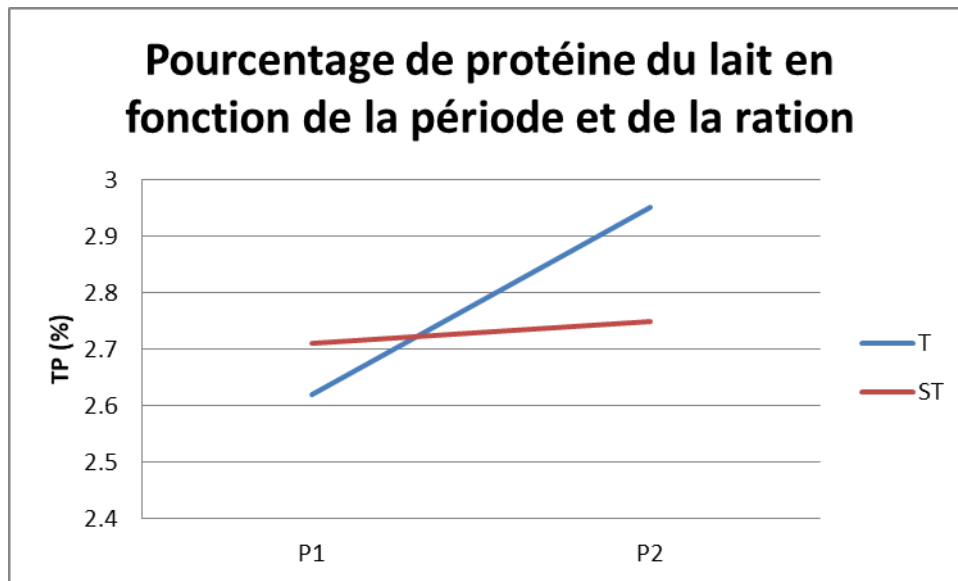


Figure 7 : Taux de protéines du lait en fonction de la période et de la ration

Les conditions d'application pour le traitement statistique de la variable pourcentage d'azote du lait ne sont pas respectées. La transformation de la variable via la fonction « log » ou « racine » ne permet pas non plus d'être en adéquation avec les conditions d'application. Cette problématique provient du fait que la variabilité de cette variable est quasiment nulle et ne répond pas à une distribution normale. Le pourcentage d'azote du lait ne peut donc pas être analysable et interprétable.

Il existe des tests qui permettent de travailler avec des variables même si celles-ci ne répondent pas au test de normalité ou au test d'égalité des variances, comme par exemple le test NPAR1WAY. Mais il s'agit de tests non paramétriques qui rendent l'interprétation des résultats non pertinente.

Le pourcentage d'azote du lait est obtenu par la méthode de Dumas et est normalement plus précis que celui obtenu pour le TP par analyse du spectre infrarouge.

Le lait corrigé correspond à un lait standardisé. La formule employée pour la quantification du lait corrigé est la suivante :

$$\text{Lait corrigé} = (0.337 + (0.115 * \text{MG}) + (0.06 * \text{MP})) * \text{Production de lait}$$

Ni le facteur « période », ni le facteur « ration » n'ont d'impact significatif sur la production de lait corrigée.

Le taux d'urée a été analysé par une autre méthode statistique car il n'a été mesuré qu'une fois par période par vache. Il n'y a pas eu d'impact significatif de la ration (p-value : 0.264). Les valeurs en mg/L de lait sont pour la ration T : 201.19 et pour la ration ST : 223.84.

9) Analyse des flux d'azote :

	Moyenne T	Moyenne ST	Moyenne P1	Moyenne P2	p-value ration	p-value période	p-value interaction
N ingéré (g)	415.65	413.27	414.33	414.79	0.6670	0.7476	0.0319
N urinaire (g)	149.24	161.19	152.18	157.26	0.1192	0.4295	0.0006
N fécale (g)	169.86	161.20	167.52	164.26	0.0068	0.5009	0.6552
N urinaire + fécale (g)	319.10	322.39	319.70	321.52	0.7768	0.689	0.0076
N lait (g)	103.82	102.46	103.76	102.64	0.5938	0.8742	0.0282
N balance (g)	-7.27	-11.58	-9.13	-9.37	/	/	/

Tableau 19 : Valeur statistique de la quantification du flux journalier d'azote

Les valeurs du tableau 19 représentent la quantité d'azote en gramme soit ingérée soit excrétée par vache, par jour, en moyenne.

Le facteur « ration » et le facteur « période » n'ont pas d'impact significatif sur la quantité d'azote ingérée par jour.

Bien que l'apport de tanin dans la ration semble donner une quantité d'azote urinaire journalière inférieure à la ration témoin, l'effet ration n'est pas statistiquement significatif. Il y a une interaction très hautement significative entre la ration et la période concernant le N urinaire.

Par contre, en ce qui concerne les fèces, le facteur « ration » a un impact hautement significatif sur les pertes d'azote. Le facteur « période » n'a pas d'impact significatif. Grâce à l'absence d'interaction entre la période et la ration, le facteur « ration » peut donc être analysé dans sa globalité. Nous observons ainsi que les quantités d'azote fécal sont supérieures avec la ration T de l'ordre de 5%.

La somme des pertes fécales et urinaires n'est pas impactée significativement ni par la ration, ni par la période.

Les facteurs « ration » et « période » n'ont pas d'impact significatif sur la production d'azote via le lait mais leur interaction en présente un.

Le N balance représente la quantité journalière moyenne d'azote ingéré moins les quantités excrétées. Elle représente soit la prise ou perte de masse des vaches, soit la précision du bilan azoté. Durant l'expérience, les vaches ont légèrement perdu du poids, ce qui est représenté par la balance négative. La marge d'erreur du bilan (si on considère que le poids des vaches n'a pas varié), est toujours inférieure à 3% de l'azote ingéré. Un N balance de 12 grammes en moyenne par jour nous montre qu'il a été réalisé correctement sans avoir eu trop de perte lors de la collecte des excréments.

10) Analyse des efficacités azotées et ratios

	Moyenne T	Moyenne ST	Moyenne P1	Moyenne P2	p-value ration	p-value période	p-value interaction
Efficienc e N du lait	25.03	24.81	25.07	24.79	0.7512	0.7423	0.4165
N valorisé / N perdu	32.71	31.93	32.64	32.06	0.4594	0.5868	0.6031
N urinaire / N fécale	87.85	100.1	90.73	96.20	0.0050	0.2013	0.0001

Tableau 20 : Valeur statistique de l'efficacite et des ratios importants

L'efficacite N du lait se calcule en réalisant le ratio N du lait sur N ingéré. Selon le tableau 20, il n'y a pas d'impact significatif des facteurs ration et période sur ce paramètre.

Le ratio N valorisé sur N perdu se calcule en divisant le N du lait par la somme de N urinaire et N fécal. Il n'y a pas d'impact significatif des facteurs « ration » et « période ».

Le facteur « ration » a un impact hautement significatif sur le ratio N urinaire sur N fécal. Globalement, en présence de tanin dans la ration, ce ratio est plus faible de 12%. Le facteur période lui n'a pas d'impact significatif. L'interaction entre la période et la ration, illustrée en figure 16 oblige à analyser l'impact de la ration sur chacune des deux périodes.

Pour la P1, le facteur ration a une p-value de 0.4112 et est donc non significatif. Pour la P2, le facteur « ration » a une p-value < 0.0001 et est donc très hautement significatif. Pour la P2 le ratio est supérieur pour la ration ST de 25%.

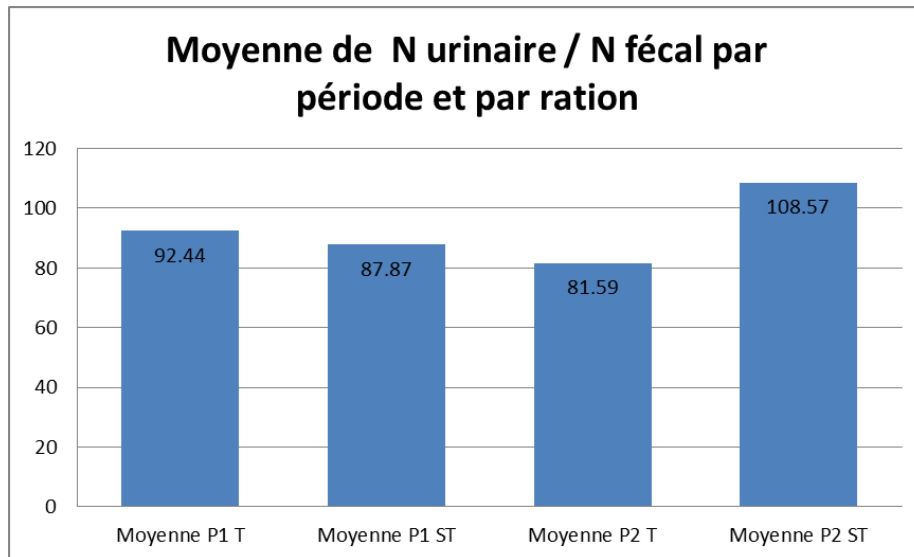


Figure 8 : Moyenne du ratio N urinaire sur N fécal par période et par ration

D) Discussions

1) Analyse de l'ensilage

Les ballots avec tanin ont une plus grande concentration en acides gras volatils par g de matière sèche. La concentration en acide lactique est aussi supérieure pour la ration avec tanin. Dans l'ensemble, la composition des acides gras à courte chaîne est fortement semblable quelle que soit la ration. Le ratio acide lactique sur acide total est de 0.8. Il est situé dans la moyenne haute pour de l'ensilage d'herbe, ce qui représente une bonne appétence du fourrage.

La composition des deux ensilages est très bonne, le pourcentage d'acide butyrique est inférieur à 0.1%, le pourcentage d'acide acétique est inférieur à 2%. Seul l'acide lactique est légèrement en dessous des concentrations standards (Jobin, 2009).

Cependant, les concentrations en acides gras à courte chaîne sont très faibles pour les deux ensilages. En cumulé, elles devraient être de plus ou moins 8-10% de la MS et elles ne représentent ici que 4-5% (Krizsan *et al.*, 2006). Ceci peut être expliqué soit par un séchage trop long avant l'enrubannage, soit par une protéolyse trop importante durant la conservation.

Le taux de MS élevé de l'ensilage, en moyenne 50%, réduit la mobilité des micro-organismes durant la fermentation et peut la ralentir à cause de la faible teneur en eau. Si les microorganismes sont ralentis, ils auront moins l'occasion de produire les acides gras à courte chaîne. Les 50% de matière sèche sont dans les valeurs maximales pour de l'ensilage, une valeur objective pour une conservation optimale serait de 30-35% (Lefebvre, 2015).

Le pourcentage d'ammoniac par rapport à l'azote total de l'ensilage d'herbe est faible, de l'ordre de 4-5%. On peut considérer que si le pourcentage est <5%, il s'agit d'une très bonne conservation et entre 5 et 10%, d'une bonne conservation (Crémer *et al.*, 2012). L'ensilage a donc été peu protéolysé. Une matière sèche élevée de l'ensilage est souvent corrélée à une faible teneur en ammoniac (Colombini *et al.*, 2009).

La valeur du pH est inférieure pour l'ensilage qui n'a pas reçu la solution de tanin et ce, de manière très hautement significative. Les valeurs sont toutes les deux hautes entre 4.8 et 5. Un pH haut, autour des 5, est dû à un ensilage sec, avec 50% de MS (Limin Kung, 2010). Plus le pH est proche de 4-4.5, plus l'ensilage sera de qualité.

2) Analyse de l'ingestion et de l'appétence

Les résultats nous montrent que la ration et la période n'ont pas eu d'impact significatif sur le pourcentage de refus.

Nous ne pouvons cependant pas conclure que l'ajout de tanins n'impacte pas l'appétence de la ration. En effet, le fait que la ration ne soit pas donnée ad libitum et que la ration soit mangée régulièrement et par la majorité des vaches dans son intégralité ne nous permet pas de tirer des conclusions concernant la satiété des vaches.

La seule interprétation que nous pouvons donner est que l'ajout de 1% de la matière sèche en tanin hydrolysable dans la ration n'impacte pas l'ingestion de la ration recommandée pour la vache en fonction de sa production.

Cette interprétation est corroborée par (Zimmer & Cordesse, 1996) qui ne détecte une diminution de l'ingestion que lorsque la concentration en tanin excède les 5% de la matière sèche. Le potentiel d'astringence de la ration ne semble donc pas avoir impacté le comportement de l'animal.

Il est aussi important de spécifier que la quantité d'azote ingérée n'est pas impactée par la ration. Nous travaillons donc dans des conditions iso-protéiques. Ces conditions étaient très importantes car cela nous permet d'analyser les résultats sans que ceux-ci soient impactés par la quantité d'azote ingérée.

3) Analyse du jus de rumen

Les valeurs de mesure du pH pour le jus de rumen semblent très hautes pour des vaches avec une production de 20 à 25 litres qui viennent de recevoir leur ration. Le jus de rumen a été collecté avec une sonde œsophagienne. Cette technique, bien que facilement utilisable, possède quelques défauts. Elle peut provoquer une sur-salivation et aussi une

contamination de l'échantillon avec la salive du ruminant. Cette contamination salivaire peut impacter la mesure du pH du jus de rumen en le rendant plus basique. Il me semble que ce biais a impacté nos mesures. Il n'a cependant pas d'impact sur la quantification de la concentration en acides gras à courte chaîne mais peut en avoir sur la quantification de l'ammoniac. Une alternative pour éviter ce type de désagrément est de ne pas utiliser les 200 premiers ml du prélèvement. Cela permet de réduire considérablement la concentration en ions bicarbonate de la solution (Lessire & Rollins., 2013).

Le facteur « ration » n'impacte pas la composition en acides gras à courte chaîne du jus de rumen. La proportion des différents AGV et acide lactique est liée à la concentration des différents microorganismes du rumen et de la ration reçue. La supposition de ne pas avoir de modification de la flore ruminale montre que les tanins dans le cadre de cette expérimentation ne l'ont que très peu impactée. Cela est probablement dû au fait que le tanin a été incorporé au moment de l'andainage et qu'il n'est donc plus disponible pour interagir avec les micro-organismes.

La teneur en ammoniac du jus de rumen n'est pas non plus impactée par la ration. L'objectif du tanin ajouté à celle-ci est de réduire la protéolyse des protéines dans le rumen afin de réduire les pertes ammoniacales. Une production similaire d'ammoniac pour les deux rations devrait s'illustrer par une production d'urée et des pertes azotées dans les urines également similaire quelle que soit la ration (Tan & Murphy, 2004). Le fait de ne pas avoir d'impact significatif dans ce cas montre que les protéines n'ont pas été protégées par le tanin de leur dégradation dans le rumen. Le fait de ne pas être plus résistant à la dégradation dans le rumen peut remettre en cause l'efficacité de la réaction de complexation dans le cadre de cette expérience. De plus, les valeurs des concentrations en ammoniac du jus de rumen sont élevées par rapport au standard. Une concentration élevée peut représenter une OEB élevée et donc un déficit en matières organiques fermentescibles (Valkeners et al., 2007). L'OEB de la ration, calculé avec les valeurs des prédictions du spectre proche infrarouge en post expérience, a une valeur de plus de 300 g (17 g/kg de MS), ce qui est effectivement fort élevé.

4) Analyse des prédictions de méthane

Les deux méthodes de prédiction nous donnent des valeurs proches mais non semblables. Dans les deux cas, ces prédictions n'ont pas été impactées par la ration. Elles sont

basées sur la composition en AGV du jus de rumen. Il est donc normal, si ces concentrations ne varient pas en fonction de la ration, que les prédictions en fassent de même.

La quantification de la production de méthane journalière n'est pas réalisable car les formules utilisées fonctionnent avec des productions moyennes journalières d'AGV et nous ne possédons que des concentrations ponctuelles. Cependant, ces données sont suffisantes pour comparer l'impact de la ration.

Normalement, le tanin devrait impacter la production de méthane en interagissant avec la flore du rumen (Kumar *et al.*, 2014). Or, lors de cette expérience, nous n'avons pas constaté de modification de la production de méthane. Ceci est une seconde piste qui me mène à l'interprétation suivante : les tanins n'ont pas modifié la flore méthanogène du rumen.

Il ne faut pas oublier ici qu'il s'agit de prédiction d'émission et non d'une quantification réelle des émissions de méthane. Il pourrait être intéressant de renouveler l'expérience avec une quantification directe. Une technique pour réaliser ceci serait la méthode du traceur de « sulphur hexafluoride » (SF₆) (Boadi *et al.*, 2001). Cette technique permettrait une quantification des émissions journalières et éviterait les biais liés au moment du prélèvement du jus de rumen.

5) Analyse des digestions apparentes

La digestibilité apparente de la matière sèche et de la matière organique n'a pas été impactée significativement par la ration. Si une trop grande diminution de la digestibilité de la MO et de la MS apparentes survient, cela va réduire la valeur énergétique de l'aliment et donc réduire les performances zootechniques et la production laitière du ruminant (Sauvant & Van Milgen., 1995). Une diminution aurait pu provenir d'une variation de la composition des microorganismes du rumen (Jasim *et al.*, 2016). Cependant, les valeurs de la digestibilité apparente sont très faibles en comparaison des prédictions ou des valeurs standards pour une ration équivalente. La digestibilité de la matière organique devrait être supérieure à 70% par rapport au 65% qui ont été calculés pour cette expérience (McDonald *et al.*, 2010).

Le fait de ne pas avoir obtenu d'impact significatif nous permet de dire que le tanin ajouté à l'ensilage au moment de l'andainage ne perturbe pas outre mesure la composition de la flore du rumen.

La digestibilité apparente de l'azote est impactée significativement par la ration. La ration avec tanin nous donne une valeur inférieure à celle de la ration témoin. Cela est dû au fait que cette digestibilité ne prend en compte que la quantité d'azote ingérée et la quantité d'azote dans les fèces. Nous constatons que les pertes fécales pour la ration avec tanin sont supérieures mais cette différence est compensée par une diminution des pertes urinaires. La diminution de la digestion apparente de l'azote ne signifie donc pas que l'efficacité azotée est inférieure mais simplement qu'il y a d'une migration des flux d'azote chez l'animal.

Une digestibilité de la MO de l'ordre de 65-66% est relativement faible, elle a donc été comparée à la prédiction infrarouge de la digestibilité de la MO de la ration.

La moyenne pondérée des prédictions de la digestibilité de la matière organique prévoit une valeur de 78%. Il y a donc une différence de 12% pour la digestion de la matière organique par rapport à la prédiction et ce que la ration soit avec ou sans tanin. La valeur prédite par l'analyse du spectre infrarouge a une marge d'erreur de 3%. La variabilité génétique peut elle aussi impacter la digestibilité mais n'a pas un effet suffisant pour justifier un tel écart.

La digestibilité de la matière organique (dMO) que nous avons calculée l'a été avec la formule suivante :

$$dMO = 1 - ((\%N \text{ fécales} * \text{quantité de MS des fèces}) / (\%N \text{ rations} * \text{quantité de MS de la ration}))$$

Les quantités de matière fécale et d'aliment ont été pesées avec précision et ne peuvent induire un tel écart. Les pourcentages d'azote proviennent de la méthode Dumas, plus précise que la méthode des prédictions infrarouge (Minet *et al.*, 2016). Par conséquent, cette forte différence provient d'une somme de multiples facteurs.

6) Analyse de la production laitière et de la composition du lait

Le tanin n'a pas eu d'impact sur la production laitière ni sur la production de lait standardisé (L4).

Les principales raisons pour lesquelles le tanin n'a pas eu d'impact sur la production laitière sont : une ingestion semblable (pas d'impact significatif sur le pourcentage de refus) pour les deux rations, des rations iso protéiques et une même perte d'azote (le cumul des pertes fécale et urinaire n'a pas été impacté significativement par la ration). De plus, la digestibilité de la MO n'a pas non plus été impactée par l'ajout de tanin. Dans ces conditions quasi similaires, il est donc normal que la ration avec tanin n'ait pas impacté la production de lait.

L'impact du tanin sur la production peut être positif ou négatif. En cas de trop grande concentration (supérieure à 5% de la MS de la ration), les tanins rendent la ration trop astringente et réduisent l'ingestion (Frutos *et al.*, 2004). Une concentration élevée peut aussi impacter la flore du rumen et réduire l'efficacité des microorganismes de celui-ci et, par conséquent, induire une diminution de la digestibilité de la MO, ce qui peut réduire l'apport énergétique de la ration et être un frein à la production laitière (Sauvant & Van Milgen., 1995). Une concentration en tanin trop faible n'impactera pas la production laitière. Une des difficultés de l'emploi des tanins est de trouver la bonne concentration pour jouir de leurs avantages sans être trop impacté par leurs effets néfastes (diminution de l'ingestion, lésion de la paroi du rumen,..). Aucun dosage optimal n'a pour l'instant été trouvé. Cela est dû à la forte diversité des types de tanins (Naumann *et al.*, 2017). Dans le cadre de cette expérience, il est difficile de savoir si la concentration utilisée a été suffisante au vu des résultats obtenus.

Le fait de travailler *in vivo* nous offre une représentation plus exacte du fonctionnement du tanin sur l'ensemble du passage de l'azote dans le système digestif mais nous contraint à une forte variabilité des résultats. Les différences des facteurs entre les vaches et pour une même vache, entre les jours d'expérience, (Figure 17 ; tableau 21) sont bien souvent supérieures à la valeur ajoutée que le tanin peut apporter. Une analyse statistique en post analyse, en moyennant les résultats par vache pour la semaine, afin de réduire le facteur jour, a donné des résultats semblables. Ceci nous permet de dire que le manque

d'impact du tanin n'est pas dû à la forte variabilité journalière de certains facteurs (comme les pertes en azote via l'urine).

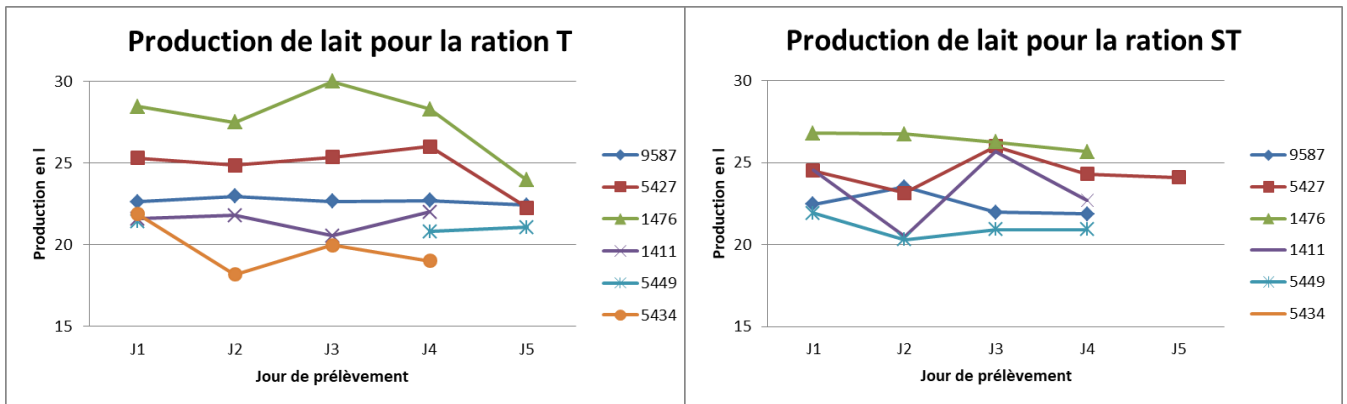


Figure 9 : Représentation de la variabilité de la production de lait journalière

	Vache	J1	J2	J3	J4	J5
T	9587	22.61	22.96	22.66	22.71	22.41
	5427	25.3	24.85	25.35	26	22.25
	1476	28.45	27.5	30	28.3	23.95
	1411	21.59	21.79	20.54	21.99	
	5449	21.41			20.81	21.06
	5434	21.86	18.16	19.96	19.01	
ST	9587	22.46	23.51	21.96	21.86	
	5427	24.5	23.15	26	24.3	24.1
	1476	26.8	26.75	26.25	25.65	
	1411	24.54	20.49	25.69	22.69	
	5449	21.91	20.31	20.91	20.91	
	5434	22.61				

Tableau 21 : Représentation de la variabilité de la production de lait journalière

La composition du lait n'a pas été impactée par la ration. Cela est dû au fait que quelle que soit la ration, au vu des résultats précédents, la vache a accès à autant de VEM et de DVE. La même concentration en TB et TP ainsi que la même production laitière mènent à une même production de lait standardisé.

Il est cependant intéressant de prendre en compte le ratio TB/TP. Celui-ci est un très bon indicateur pour mettre en évidence un problème dans la ration ou un trouble métabolique (Fayolle., 2015). La moyenne pour l'expérimentation est supérieure à 1.6. Cette valeur est extrêmement haute pour les standards. Lorsque le ratio TB/TP est supérieur à 1.5, cela met

potentiellement en évidence une balance énergétique négative (BEN) de la ration. Une telle valeur est aussi caractéristique d'une acétonémie (Hueur et al., 2000)(Van Der Drift et al., 2012). Pour confirmer cette suspicion, une estimation de la concentration du b-hydroxybutyrate, de l'acétone et du C18-1 cis 9 du lait a été réalisée à l'aide du spectre infrarouge du lait. Les valeurs obtenues correspondent à des moyennes pour des vaches laitières (Grelet et al., 2016). Pour vérifier les risques, les données ont été fournies à l'AWE, qui nous a rendu, en retour, un score d'acétonémie pour les différentes vaches en fonction de la période. Le risque est modéré pour toutes les vaches, à l'exception de la 5449 et de la 5427 en P1. Ces dernières ont un risque important pour cette période. Les valeurs du ratio TB/TP proches de 1.6 ne sont donc pas dues à une acétonémie.

Une BEN est cependant toujours envisagée au vu de certains résultats. Une correction des prédictions des valeurs alimentaires de la ration a été établie avec les valeurs des analyses proche infrarouge et ce, en prenant en compte la faible digestibilité de la matière organique.

	VEM	DVE g
Valeur initiale de la prédiction de la ration	18000	1380
Valeur corrigée de la prédiction de la ration	16100	1165
Besoin formule élémentaire pour 24l.	15870	1365
Besoin formule pour 24l avec un TB à 4.4 et un TP à 3.4.	16090	1390
Besoin formule pour 24l avec un TB à 4.56 et un TP à 2.75.	16441	1125

Tableau 22 : Prédications et besoins en VEM et DVE

Les besoins « formule élémentaire » sont calculés avec les formules suivantes :

$$\mathbf{VEM = 5264 + 442 * L4}$$

$$\mathbf{DVE = 116 + 52 * L4}$$

Ces formules sont très simplifiées et ne prennent pas en compte les valeurs du taux de matière protéique et de matière grasse séparément.

Les valeurs pour les deux derniers besoins proviennent des formules suivantes (avec pour le deuxième besoin, des valeurs standard en TP et TB et pour le troisième les valeurs réelles obtenues en TP et TB) :

$$\mathbf{VEM = (6.45*Poids+1265+(4.42*FCL*Prod))*(1+0.00165*(FCL*24-15))}$$

$$\mathbf{DVE = (Poids/10)+54+1.396*TP+0.000195*TP^2}$$

$$\mathbf{FCL = (0.337+0.116*TB+0.06*TP)}$$

Le premier jeu de formules provient des slides de mes cours de zootechnie à Gembloux Agro Bio-Tech avec Monsieur Beckers. Le seconde jeu de formules provient du « Livret de l'agriculture, l'alimentation de la vache laitière physiologie et besoins » (Cuvelier et al.,).

Il est intéressant de remarquer que la ration n'est pas déficiente en VEM comme il est initialement prévu dans l'expérience. La valeur DVE est quant à elle, légèrement déficiente pour produire 24 litres avec des valeurs standard en TB et TP.

Par contre, la corrélation entre l'apport de la ration et les besoins pour la production de 24 litres avec le taux de TP et TB réel est assez troublante. Il peut être intéressant de se demander si une valeur plus faible en DVE n'est pas la cause d'un TP faible. Le manque de protéines aurait donc provoqué une diminution du taux protéique du lait, plutôt que de réduire la production de lait en elle-même.

Le taux d'urée, bien que n'ayant pas été impacté significativement par la ration est haut en comparaison des valeurs standards. Les valeurs lors de cette expériences sont de 20-22mg/ dL et les valeurs moyennes à ne pas dépasser sont de +- 15mg/ dL. Ces valeurs nous permettent de constater que la transformation des protéines en ammoniac dans le rumen n'a pas été amoindrie.. En effet, un taux élevé d'urée dans le lait peut témoigner d'une ration trop riche en protéines digérées dans le rumen (Mulligan et al., 2004).

Vu que la ration est bien déficiente en DVE, il est possible que la digestion des protéines dans le rumen ait eu correctement lieu et donc que la part de la digestion microbienne soit importante. Cette possibilité est à l'encontre du résultat escompté et est applicable à la ration avec et sans tanin.

Il est néanmoins intéressant de se demander quelle aurait été la conséquence si le tanin de chêne avait bel et bien réduit la digestibilité des protéines de l'ensilage d'herbe dans le rumen, en augmentant le BRE. Le BRE représente la stabilité dans le rumen des protéines alimentaires. Il est fort probable que le tanin aurait également impacté d'autres facteurs comme la diminution des protéines microbiennes due à l'impact direct du tanin sur les microorganismes et la diminution de digestibilité de la MO. Mais la quantification de l'impact des autres facteurs n'étant pas réalisable, le choix a été fait de négliger les autres impacts. Une simulation a donc été réalisée en augmentant juste le BRE de 10%.

	VEM	BRE	DVBE	DVME	DVE	OEB	MAT
		%	g/Kg MS	g/Kg MS	g/Kg MS	g/Kg MS	%
Herbe standard	770	29.9	37	46.5	58.6	47	16.3
Herbe avec + 10% de BRE	770	39.9	56.9	44.7	76.8	30	16.3

Tableau 23 : Valeurs nutritionnelles de l'herbe avec et sans impact théorique des tanins

Le DVME représente la part microbienne des protéines digérée dans l'intestin grêle. Le DVBE représente la part des protéines qui n'a pas été digérée dans le rumen et qui le sera dans l'intestin grêle. Il est donc normal que le DVME diminue et que le DVBE augmente. Le fait intéressant est que l'augmentation de la quantité totale de DVE, lorsque qu'elle est ajoutée

à la valeur de la ration, nous permet d'arriver à une valeur DVE répondant au besoin de la production de 24 litres de lait avec une valeur standard en TB et TP (Tableau 22). La diminution de l'OEB nous permet aussi d'arriver à des valeurs plus correctes en OEB.

Cela nous permet de dire que si les tanins avaient diminué la digestion des protéines dans le rumen en passant d'un BRE de 29 à 39%, ils auraient dû théoriquement nous permettre d'obtenir la même quantité de lait mais avec une concentration plus élevée et plus standard en protéines.

7) Analyse des pertes fécales et urinaires

Il n'y a pas eu de différence significative pour le flux d'azote urinaire, en fonction de la ration, contrairement au flux d'azote fécal. Cependant, la différence des moyennes est supérieure pour les pertes via les urines (en moyenne 11g par jour de différence). Cela est dû au fait que la concentration en azote fécal est beaucoup plus constante pour une vache que la concentration en azote de l'urine. L'azote urinaire fluctue fort pour une même vache d'un jour à l'autre et même au sein d'une journée (Dong *et al.*, 2014).

Dans l'ensemble, par rapport à la ration sans tanin, les pertes urinaires sont inférieures mais celles-ci sont compensées à 3 grammes près par les pertes fécales. Comme vu précédemment, les pertes fécales supérieures vont provoquer une diminution de la digestion apparente de l'azote.

L'augmentation des pertes fécales peut provenir du fait que la réaction de complexation ne s'est pas entièrement défait en arrivant dans l'intestin grêle. Cela aura pour conséquence de continuer à réduire la digestibilité des protéines. Certains tanins ne rompent entièrement leur liaison de complexation avec les protéines qu'à un pH de 2. Le pH de la caillette étant de 2.5-3.5 (Dentinho & Bessa, 2016), il est possible que toutes les protéines n'aient pas été dissociées. Cela aura pour conséquence de réduire la digestion dans l'intestin grêle et donc d'augmenter les pertes d'azote fécal. Une autre possibilité est qu'après que la réaction de complexation ait été rompue dans la caillette, la réaction se reforme dans l'intestin grêle avant la digestion, en revenant à un pH de 8-9.

Dans les deux cas, la production d'ammoniac similaire dans le rumen conforte les pertes d'azote urinaires semblables. Le déséquilibre de la ration avec une carence légère (90%) en DVE est faible. Le fait que la ration soit en légèrement déficiente en protéines induit que même les vaches avec une ration sans tanin ont perdu peu d'azote via les urées. Ce qui peut rendre la différence non significative.

Bien que la somme des excréctions soit quasi similaire avec ou sans tanin, la répartition des pertes est, elle, plus intéressante pour la ration avec tanin. En effet, les pertes urinaires sont bien plus volatiles. L'azote des urines, si le pH augmente, se transforme en ammoniac volatil et peut se propager dans l'air (Sommer & Hutchings, 2001). L'azote des urines est aussi beaucoup plus mobile et peut plus rapidement être lessivé dans les sols que celui des fèces. L'azote des pissas est valorisé dans le sol ou dans les plantes à hauteur de 60%. 25% vont être perdus par lixiviation. Les pertes gazeuses sous forme d'ammoniac représentent 10% et 5% sous forme de N₂O. Alors que pour l'azote fécal, 80% sont valorisés dans le sol ou dans les plantes, 15% perdus par lixiviation et seulement 5% par perte gazeuse (Peyraud *et al.*, 2004). Ce résultat peut donner un attrait écologique à l'emploi de tanin hydrolysable de chêne ajouté à l'ensilage au moment de l'andainage.

8) Analyse de l'efficacité azotée du lait

Le flux d'azote ingéré par les vaches n'a pas été impacté par la ration, ce qui nous place dans des conditions iso-protéiques. La production laitière, elle non plus, n'a pas été impactée par la ration. Par conséquent, l'ajout de tanin au moment de l'andainage n'a pas eu d'impact significatif sur l'efficacité azotée du lait.

Le flux d'azote moyen du lait n'est pas non plus impacté. La somme des pertes urinaire et fécale nous donne un résultat quasi semblable quelle que soit la ration. Ce qui nous donne un ratio azoté valorisé sur azote excrété qui n'est pas significativement différent.

9) Conclusion

L'objectif de cette expérimentation était de trouver des voies d'amélioration de l'efficacité azotée des vaches laitières afin soit de consommer moins de protéines pour une même production laitière, soit de produire plus avec une même ration et cela dans le but de réduire les pollutions et de rendre les élevages plus rentables. Toutefois, même si l'ajout de

tanin peut impacter positivement les pollutions azotées via le ratio N urinaire sur N fécal, il ne permet pas de réduire les coûts de production ni d'augmenter la productivité. Il a donc peu d'attrait financier pour les producteurs. Dans ces conditions, il risque donc de n'être pas ou peu employé dans les exploitations laitières.

L'impact du tanin sur la composition de l'ensilage en acides gras à courte chaîne et sur l'augmentation des pertes azotées fécales nous prouve que les tanins ont eu un impact sur les protéines. Le choix de réaliser l'ajout de tanin durant l'andainage a favorisé une meilleure conservation du fourrage mais a limité l'impact des tanins uniquement aux protéines de l'ensilage d'herbe (qui représentent 45-50% des protéines totales).

La faible concentration de la ration en tanin (à 1% de la MS) et le moment de l'ajout du tanin ont fait que les tanins n'ont pas ou très peu impacté la flore du rumen. Ce qui a eu pour conséquence de réduire grandement l'impact potentiel des tanins. A cause de cela, peu de différences significatives ont pu être mises en évidence lors de cette expérience.

Dans ces conditions, il ne semble pas pertinent d'utiliser du tanin à cette concentration afin de réduire l'empreinte écologique des productions laitières et encore moins pour améliorer l'efficacité économique des fermes.

La littérature scientifique sur ce sujet nous montre une grande diversité de résultats. Les tanins regroupent une multitude de composés chimiques très variés. La définition même de tanin n'est pas encore correctement établie. Les méthodes de quantifications des tanins ne sont pas encore entièrement fiables (Heil *et al.*, 2002) et ne prennent généralement pas en compte toutes les variétés de tanins. Cette mixité et grande diversité ainsi qu'un large panel de concentrations font que l'impact des tanins est difficilement généralisable. Il est donc important me semble-t-il de poursuivre les recherches afin de mieux comprendre leur impact sur la zootechnie des ruminants. Il pourrait aussi être important de comparer les différents types de tanins car tous ne semblent pas agir pareillement à des concentrations semblables.

Le manque de différences significatives aurait aussi pu provenir d'un temps d'adaptation à la ration trop faible. En plus de la période de préadaptation de 10 jours, 2 semaines avec la ration T ou ST se sont déroulées avant la semaine de prélèvement. Sachant que (Hackmann *et al.*, 2015) nous dit qu'un temps d'adaptation du rumen à une nouvelle ration de 7 à 14 jours est suffisant pour analyser l'impact de la ration sur la digestibilité, le problème ne

proviendrait donc pas du temps d'adaptation. Néanmoins, cette piste de temps d'adaptation aurait pu être intéressante car on remarque qu'il y a parfois une interaction entre la période et la ration. Par exemple, le ratio N urinaire sur N fécale est beaucoup plus marqué lors de la seconde période.

Il serait donc intéressant de pouvoir réitérer cette expérimentation avec une comparaison de deux techniques d'incorporation du tanin soit, comme ici, incorporé lors de l'andainage de l'ensilage, soit ajouté à la ration juste avant la distribution au ruminant. Il pourrait aussi être intéressant de comparer les différentes concentrations. Toutefois, cette démarche demanderait un nombre de vaches important et donc des ressources en main-d'œuvre extrêmement conséquentes. Mais cette expérience pourrait nous apporter des résultats plus complets pour mieux appréhender l'impact de l'apport du tanin.

E. Bibliographie

Agle M., Hristov A.N., Zaman S., Schneider C., Ndegwa P.M. & Vaddella V.K., 2010. Effect of dietary concentrate on rumen fermentation, digestibility, and nitrogen losses in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 93, 4211-4222.

Aguerre M.J., Capozzolo M.C., Lencioni P., Cabral C. & Wattiaux M.A., 2016. Effect of quebracho-chestnut tannin extracts at 2 dietary crude protein levels on performance, rumen fermentation, and nitrogen partitioning in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 99 (6), 4476-4486.

Ali M., Mehboob H.A., Mirza M.A., Raza H. & Osredkar M., 2017. Effect of Hydrolysable Tannin Supplementation on Production Performance of Dairy Crossbred Cows. *J. Anim. Plant Sci.*, 27(4), 1088-1093.

Alves T.P., Dias K.M., Hans Dallastra L.J., Fonseca B.L. & Ribeiro-Filho H.M.N., 2017. Energy and tannin extract supplementation for dairy cows on annual winter pastures. *Semina : Ciencias Agrarias*, Londrina., 38 (2), 1017-1026.

Amyot A., 2003. Les additifs pour le foin et l'ensilage : mode d'action et recommandations d'utilisation pour chaque type de produit. Institut de recherche et de développement en agroenvironnement., 1-23.

Anon, 2011. Rapport de la cour des comptes transmis au Parlement wallon : la gestion durable de l'azote en agriculture. Cour des comptes., 1-74.

Aprianita A., Donkor O.N., Moate P.J. Williams S.R., Auldist M.J., Greenwood J.S., Hannah M.C., Wales W.J. & Vasiljevic T., 2014. Effects of dietary cottonseed oil and tannin supplements on protein and fatty acid composition of bovine milk. *J. Dairy Res.*, 81(2), 183-192.

Arriaga H., Pinto M., Calsamiglia S. & Merino P., 2009. Nutritional and management strategies on nitrogen and phosphorus use efficiency of lactating dairy cattle on commercial farms: An environmental perspective. *J. Dairy Sci.*, 92, 204-215.

Arrigo Y. & Dohme F., 2009. Esparcette et luzerne comme compléments pour les vaches au pâturage. *Revue suisse Agric.*, 41 (5), 283-288.

Beckers Y., 2013. L'équilibre des rations alimentaires des bovins : quelques pistes pour améliorer l'efficacité azotée. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 17 (S1), 243-250.

Bhatta R., Uyeno Y., Takenake A., Yabumoto Y., Nonaka I., Enishi O. & Kurihara M., 2009. Difference in the nature of tannins on in vitro ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *J. Dairy Sci.*, 92, 5512-5522.

Boadi D.A., Wittenberg K.M. & Kennedy A.D., 2001. Validation of the sulphur hexafluoride (SF6) tracer gas technique for measurement of methane and carbon dioxide production by cattle. *Can. J. Anim. Sci.*, 82 (2), 125-131.

- Bobbink R., Hornung M. & Roelofs G.M., 1998. The effects of air-borne nitrogen pollutants on species diversity in natural and semi-natural European vegetation. *Journal of Ecology.*, 86, 717-738.
- Brinkhaus A.G., Bee G., Silacci P., Kreuzer M. & Dohme-Meier F., 2016. Effect of exchanging *Onobrychis viciifolia* and *Lotus Corniculatus* for *Medicago sativa* on ruminal Fermentation and nitrogen turnover in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 99, 4384-4397.
- Broderick G.A., Grabber J.H., Muck R.E. & Hymes-Fecht U.C., 2017. Replacing alfalfa silage with tannin-containing birdsfoot trefoil silage in total mixed rations for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 100, 3548-3562.
- Calsamiglia S., Ferret A., Reynolds C.K., Kristensen N.B. & van Vuuren A.M., 2010. Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. *Animal.*, 4 (7), 1184-1196.
- Charmley E., 2001. Towards Improved silage quality - A Review. *Can. J. Anim. Sci.*, 81(2), 157-168.
- Cielsak A., Zmora P., Pers-Kamczyc E. & Szumacher-Strabel M., 2012. Effects of tannins source (*Vaccinium vitis idaea* L.) on rumen microbial fermentation in vivo. *Anim Feed Sci Technol.*, 176, 102-106.
- Cirkovic Velickovic T.D. & Stanic-Vucinic D.J., 2017. The Role of Dietary Phenolic Compounds in Protein Digestion and Processing Technologies to Improve Their Antinutritive Properties. *Food Sci Food Saf.*, 17, 82-103.
- Colombini S., Colombari G., Crovetto G.M., Galassi G. & Rapetti L., 2009. Tannin treated lucerne silage in dairy cow feeding. *Italian J. Anim. Sci.*, 8 (2), 289-291.
- Cremer S., Knoden D., Vander Vennet D. & Lambert R., 2012. Qualité des ensilages d'herbe en 2011 en province de Luxembourg. *Fourrages-Mieux.*, 1-11.
- Cuvelier C., Hornick J-L., Beckers Y., Froidmont E., Knapp E., Istasse L. & Dufrasme I. *Livret de l'agriculture, l'alimentation de la vache laitière physiologie et besoins.* Université de Liège et Centre Wallon de recherches Agronomiques., 1-27.
- Demeyer D. & Fievez V., 2000. Ruminants et environnement : la méthanogénèse. *Ann. Zootech.*, 49, 95-112.
- Dentinho M.T.P. & Bessa R.J.B., 2016. Effect of tannin source and pH on stability of tannin-protein and fibre complexes. *Revisita de Ciencias Agarias.*, 39 (1), 114-121.
- Dey A., Dutta N., Sharma K. & Pattanaik A.K., 2009. Response of dairy cows to dietary supplementation of condensed tannins through *Ficus infectoria* leaves. *Indian J. Anim. Sci.*, 79, 58-62.
- Dong R.L., Zhao G.Y., Chai L.L. & Beauchemin K.A., 2014. Prediction of urinary and fecal nitrogen excretion by beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 92, 4669-4681.

Dschaak C.M., Williams C.M., Holt M.S., Eun J.S., Young A.J. & Min B.R., 2011. Effects of supplementing condensed tannin extract on intake, digestion, ruminal fermentation, and milk production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 94, 2508-2519.

Driscoll C.T., Whitall D., Aber J., Boyer E., Castro M., Cronan C., Goodale C.L., Groffman P., Hopkinson C., Lambert K., Lawrence G. & Ollinger S., 2003. Nitrogen Pollution in the Northeastern United States : Sources, Effects, and Management Options. *BioScience.*, 53 (4), 357- 374.

Eugène M., Massé D., Chiquette J. & Benchaar C., 2008. Meta-analysis on the effects of lipid supplementation on methane production in lactating dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.*, 88 (2), 331-337.

Faurie B., 2015. Rapport : Les sucres et l'astringence : effet des polysaccharides présents dans le vin sur les interactions tanins-protéines. Thèse de doctorat de l'Université de Bordeaux, Ecole doctorale des science chimiques spécialité chimie-physique.

Fayolle L., 2015. Le lactose, indicateur de déficit énergétique chez la vache laitière ? Etude réalisée auprès de 162 élevages en Rhone-Alpes Auvergne thèse. Université Claude-Bernard Lyon 1, Médecine – Pharmacie Vetagro Sup.

Frutos P., Hervas G., Giraldez F.J. & Mantecon A.R., 2004. Review. Tannins and ruminant nutrition. *Span. J. Agric. Res.*, 2 (2), 191-202.

Gerber P.J., Steinfeld H., Henderson B., Mottet A., Opio C., Dijkman J., Falcucci A. & Tempio G., 2013. Tackling climate change through livestock - A global assessment of emissions and mitigation opportunitie. Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO)., 1-139.

Godon J.J., 2015. Chapitre 2 : Aspects Biochimiques et microbiologiques de la méthanisation. In : Moletta R., eds. La méthanisation 3^e édition. Lavoisier, Paris, 12-16.

Grelet C., Bastin C., Gelé M., Davière J.B., Johan M., Werner A., Reding R., Fernandez Pierna J.A., Colinet F.G., Dardenne P., Gendler N., Soyeurt H. & Dehareng F., 2016. Development of Fourier transform mid-infrared calibrations to predict acetone, b-hydroxybutyrate, and citrate contents in bovine milk through a European dairy network. *American Dairy Sci.*, 99, 4816-4825.

Griffiths W.M., Clarck C.E.F., Clark D.A. & Waghorn G.C., 2013. Supplementing lactating dairy cows fed hight-quality pasture with black wattle (*Acacia mearnsii*) tannin. *Animal.*, 7 (11), 1789-1795.

Groot J.C.J., Rossing W.A.H. & Lantinga E.A., 2006. Evolution of farm management, nitrogen efficiency and economic performance on Dutch dairy farms reducing external inputs. *Livest. Sci.*, 100 (2-3)., 99-110.

Hackmann T., 2015. Time required for adaptation of rumen fermentation and the rumen microbiome. *J. Anim. Sci.*, 93, 312-314.

- Heil M., Baumann B., Andary C., Linsenmair K.E. & McKey D., 2002. Extraction and quantification of “condensed tannins” as a measure of plant anti-herbivore defence ? Revisiting an old problem. *Naturwissenschaften.*, 89, 519-524.
- Henke A., Dickhoefer U., Westreicher-Kristen E., Knappstein K., Hasler M. & Susenbeth A., 2016. Effect of dietary Quebracho tannin extract on feed intake, digestibility, excretion of urinary purine derivatives and milk production in dairy cows. *Arch. Anim. Nutr.*, 71(1), 37-53.
- Heuer C., Van Straalen W.M., Schukken Y.H., Dirkzwager A. & Noordhuizen J.P.T.M., 2000. Prediction of energy balance in a high yielding dairy herd in early lactation: model development and precision. *Livestock Production Sci.*, 65, 91-105.
- Howarth R.W., 2008. Coastal nitrogen pollution : A review of sources and trends globally and regionally. *Harmful Algae.*, 8 (1), 14-20.
- Huhtanen P. & Hristov A.N., 2009. A meta-analysis of the effects of dietary protein concentration and degradability on milk protein yield and milk N efficiency in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 92, 3222-3232.
- Huyen N.T., Desrues O., Alferink S.J.J., Zandstra T., Verstegen M.W.A., Hendriks W.H. & Pellikaan W.F., 2016. Inclusion of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage in dairy cow rations affects nutrient digestibility, nitrogen utilisation, energy balance, and methane emissions. *J. Dairy Sci.*, 99, 3566-3577.
- Hymes-Fecht U.C., Broderick G.A., Muck R.E. & Grabber J.H., 2013. Replacing alfalfa or red clover silage with birdsfoot trefoil silage in total mixed rations increases production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 96, 460-469.
- Jasim U., Haque K.H., Jasimuddin K. & Mohammad K., 2016. Dynamics of microbial protein synthesis in the rumen – A Review. *Animals of Vet. And Anim. Sci.*, 2 (5), 116-131.
- Jayanegara A., Goel G., Makkar H.P.S. & Becker K., 2015. Divergence between purified hydrolysable and condensed tannin effects on methane emission, rumen fermentation and microbial population in vitro. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 209, 60-68.
- Jeronimo E., Pinheiro C., Lamy E., Dentinho M.T., Sales-Baptista E., Lopes O. & Silva F.C., 2014. Tannins in Ruminant Nutrition : Impact on Animal Performance and Quality of Edible Products In : Combs CA ed. *Tannins: Biochemistry, Food Sources and Nutritional Properties*. Nova Science Publishers Inc, USA : New York., 121-168.
- Jobin D., 2009. Différents paramètres de contrôle pour un ensilage à fermentation lactique réussi selon l'espèce fourragère et le type d'entreposage. Fiche technique : William Houde., 1-2.
- Jurgens K., Poppinga O. & Wohlgemuth M., 2017. Combien coûte la production de lait ? In *die land forscher* ed. *Coûts de la production laitière en Belgique, pour l'année 2016 4e partie, 2e édition*. Bal, Belgique, 1-18.
- Keim J.P. & Anrique R., 2011. Nutritional Strategies to Improve Nitrogen use Efficiency by Grazing Dairy Cows. *Chil. j. agric. res.*, 71 (4), 623-633.

Khanbabaee K. & Van Ree T., 2001. Tannins: Classification and Definition. *Nat. Prod. Rep.*, 18, 641-649.

Knapp E., Istasse L., Hornick J-L. & Dufrasne I., 2013. Amélioration des bilans d'excrétion d'azote dans deux exploitations laitières de la région wallonne par un suivi raisonné des rations. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 17(S1), 259-270.

Knapp J.R., Laur G.L., Vadas P.A., Weiss W.P. & Tricarico J.M., 2014. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *J. Dairy Sci.*, 97, 3231-3261.

Kriaa S. & Thewis A., 1999. Effet de l'addition des tanins de châtaigniers sur la rétention azotée et la digestibilité chez les ruminants ingérant des produits herbagers. *Tropicultura.*, 16 (17), 26-28.

Krizsan S.J., Westad F., Adnoy T., Odden E., Aakre S.E. & Randby A.T., 2006. Effect of volatile compounds in grass silage on voluntary intake by growing cattle. *Animal.*, 1, 283-292.

Kumar K., Chaudhary L.C. & Kumar Sanjay K., 2014. Exploitation of tannins to modulate rumen ecosystem and ruminants performance: A review. *Indian J. Anim. Sci.*, 84 (6), 609-618.

Kung L. & Shaver R., 2001. Interpretation and Use of silage Fermentation Analysis Reports. *Focus on Forage* ., 3 (13), 1-5.

Lamy E., Rawel H., Schweigert F.J., Silva F.C., Ferreira A., Costa A.R., Antunes C., Almeida A.M. Coelho A.V. & Sales-Baptista E., 2011. The Effect of Tannins on Mediterranean Ruminant Ingestive Behavior: The Role of the Oral Cavity. *Molecules.*, 16, 2766-2784.

Lapierre H. & Lobley G.E., 2001. Nitrogen Recycling in the Ruminant: A Review. *J. Dairy Sci.*, 84 (E. Suppl.), 223-236.

Lapierre H., Ouellet D. & Pellerin D., 2015. Réduire la protéine totale des rations laitières! Pourquoi le faire? Comment bien le faire?. *Journée D'information Scientifique - Bovins laitier et plantes fourragères.*, 1-3.

Lavrencic A., 2004. Effect of hydrolyzable tannin extract on bovine milk production and composition. *Grass. Sci. Eur.*, 11, 586-589.

Lefebvre G., 2015. La conservation des ensilages : nouvelles réalités, nouveaux outils. *CRAAQ colloque sur les plantes fourragères.*, 1-16.

Lessire F. & Rollin F., 2013. L'acidose subaiguë du rumen : une pathologie encore méconnue. *Ann. Méd. Vét.*, 157, 82-98.

Limin Kung J., 2010. Understanding the biology of silage preservation to maximize quality and protect the environment. *California Alfalfa & Forage Symposium and Corn/Cereal Silage Conference.*, 2-14.

- Liu H.W., Zhou D.W. & Li K., 2013. Effects of chestnut tannins on performance and antioxidative status of transition dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 96 (9), 5901-5907.
- Mathot M., Vermeiren E. & Lambert R., 2009. Indices de nutrition minérale et ensilage d'herbes : évaluation et validation de leur utilisation pour la détection des déficients en prairies. Rapport final de la recherche collective subvention 2741/1. Université catholique de Louvain.
- Matta C., Joly-Pottuz L., De Barros Bouchet M.I. & Martin J.M., 2008. *Physical Review.*, 78 (B), 1-8.
- McDonald P., Edwards R.A., Greenhalgh J.F.D., Morgan C.A., Sinclair L.A. & Wilkinson R.G., 2010. *Animal Nutrition*. 7^e éd. London : Pearson.
- McMahon L.R., McAllister T.A., Berg B.P., Majak W., Acharya S.N., Popp J.D., Coulman B.E., Wang Y. & Cheng K.J., 2000. A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. *Can J. Plant Sci.*, 80 (3) , 469-485.
- Min B.R. & Hart S.P., 2003. Tannins for suppression of internal parasites. *J. Anim. Sci.*, 81 (E. Suppl. 2), 102-109.
- Min B.R., Pinchak W.E., Anderson R.C., Fulford J.D. & Puchala R., 2006. Effects of condensed tannins supplementation level on weight gain and in vitro and in vivo bloat precursors in steers grazing winter wheat. *J. Anim. Sci.*, 84, 2546-2554.
- Min B.R., Barry T.N., Attwod G.T. & McNabb W.C., 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 106 , 3-19.
- Minet O., Ferber F., Jacob L., Lecler B., Agneessens R., Cugnon T., Decruyenaere V., Genot V., Gofflot S., Pitchugina E., Planchon V., Renneson M., Sinnaeve G., Wavreille B., Dardenne P., Baeten V., 2016. La spectrométrie proche infrarouge une technologie rapide, précise et écologique pour déterminer la composition et la qualité des produits agricoles et alimentaires. *Requasud.*, 1-32.
- Moate P.J., Clarke T., Davis L.H. & Laby R.H., 1997. Rumen gases and bloat in grazing dairy cows. *J. Agric. Sci.*, 129, 459-469.
- Monfreda C., Wackernagel M. & Deumling D., 2003. Establishing national natural capital accounts based on detailed Ecological Footprint and biological capacity assessments. *Land use policy.*, 21, 231-246.
- Morgavi D.P., Eugène M., Martin C. & Doreau M., 2011. Reducing methane emissions in ruminants: is it an achievable goal?. In Ranimma M.J, Ben Salem H. & Morand-Fehr P., eds. *Challenging strategies to promote the sheep and goat sector in the current global context (Options Méditerranéennes : Série A.Séminaires Méditerranéens; n.9 9)*. Zaragoza : CIHEAM / CSIC / Universidad de León / FAO, 65-73.
- Moss A.R., Jouany J-P. & Newbold J., 2000. Methane production by ruminants : its contribution to global warning. *Ann. Zootech.*, 49, 231-253.

Mulligan F.J., Dillon P., Callan J.J., Rath M. & O'Mara F.P., 2004. Supplementary concentrate type affects Nitrogen Excretion of Grazing Dairy Cows. *J. Dairy Sci.*, 87, 3451-3460.

Naumann H.D., Tedeschi L.O., Zeller W.E. & Huntley N.F., 2017. Invited Review : The role of condensed tannins in ruminant animal production : advances, limitations and future directions. *R. Bras. Zootec.*, 46 (12), 929-949.

Nevens F., Verbruggen I., Reheul D. & Hofman G., 2006. Farm gate nitrogen surpluses and nitrogen use efficiency of specialized dairy farms in Flanders: Evolution and future goals. *Agricultural Systems.*, 88, 142-155.

Payet N., Nicolini E., Rogers K., Saint Macary H. & Vauclin M., 2009. Evidence of soil pollution by nitrates derived from pig effluent using ^{18}O and ^{15}N isotope analyses. *Agron. Sustain. Dev.*, 30, 743-751.

Peyraud J.L. 2016. L'élevage contribue à la production durable de protéines. *Viandes et Produits Carnés* du 21 Novembre 2016., 1-10.

Peyraud J.L., Cellier P., Donnars C., Aarts F., Beline F., Bockstaller C., Bourblanc M., Delaby L., Dourmad J.Y., Dupraz P., Durand P., Faverdin P., Fiorelli J.L., Gaigne C., Kuikman P., Langlais L., Goffe L., Morvan T., Nicourt C., Parnaudeau V., Rechauchere O., Rochette P., Vertes F. & Veysset P., 2004. Les flux d'azote en élevage de ruminants. *Renc. Rech. Ruminants.*, 19, 41-48.

Peyraud J.L., Vérité R. & Delaby L., 1995. Rejets azotés chez la vache laitière : effets du type d'alimentation et du type d'alimentation et du niveau de production des animaux. *Fourrages.*, 142, 131-144.

Piluzza G., Sulas L. & Bullitta S., 2013. Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability : a review. *Grass Forage Sci.*, 69 (1), 1-17.

Ramin M. & Huhtanen P., 2013. Development of equations for predicting methane emissions from ruminants. *J. Dairy Sci.*, 96, 2476-2493.

Reynolds C.K. & Kristensen N.B., 2014. Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: An asynchronous symbiosis. *J. Anim. Sci.*, 86 (E. suppl.), 293-305.

Rotz C.A. & Muck R.E., 1994. Changes in forage quality during harvest and storage. In : Fahey G.C. ed. *Forage Quality, Evaluation, and Utilization*. American Society of Agronomy : USA, 828-868.

Salawu M.B., Acamovic T., Stewart C.S., Hvelplund T. & Weisbjerg M.R., 1999. The use of tannins as silage additives: effects on silage composition and mobile bag disappearance of dry matter and protein. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 82 (3-4), 243-259.

Sauvant D. & Van Milgen J., 1995. Les conséquences de la dynamique de la digestion des aliments sur le métabolisme ruminal et les performances animales. *Inra Prod. Anim.*, 8 (5), 353-367.

- Schofield P., Mbugua D.M. & Pell A.N., 2001. Analysis of condensed tannins : a review. *Anim. Feed Sci. and Tech.*, 91, 21-40.
- Seo J.K., Yang J., Kim H.J. Upadhaya S.D., Cho W.M. & Ha K., 2010. Effects of Synchronization of Carbohydrate and Protein Supply on Ruminal Fermentation, Nitrogen Metabolism and Microbial Protein Synthesis in Holstein Steers. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 23 (11), 1455-1461.
- Sommer S.G. & Hutchings N.J., 2001. Ammonia emission from field applied manure and its reduction invited paper. *Eur. J. Agron.*, 15, 1-15.
- St-Pierre N.R. & Thraen C.S., 1999. Animal Grouping strategies, Sources of Variation, and Economic Factors Affecting Nutrient Balance on Dairy Farms. *J. Anm. Sci.*, 77 (Suppl. 2/J), 72-83.
- Tamminga S., Brandsma G.G., Dijkstra J., van Duinkerken G., van Vuuren A.M. & Blok M.C., 2007. Protein evaluation for ruminants : The DVE/OEB 2007 System. Report nr.53. Group Animal Nutrition, Wageningen University, Wageningen ; CVB, Product Board Animal Feed, Lelystad ; Animal Sciences Group, Wageningen UR, Lelystad.
- Tamminga S., 1981. Nitrogen and amino acid metabolism in dairy cows. thèse de doctorat : Landbouwhogeschool de Wageningen.
- Tan Z. & Murphy M.R., 2004. Ammonia production, ammonia absorption, and urea recycling in ruminants. A review. *J. Animal Feed Sci.*, 13, 389-404.
- Valkeners D., Théwis A., Van Laere M. & Beckers Y., 2007. Effect of rumen-degradable protein balance deficit on voluntary intake, microbial protein synthesis, and nitrogen metabolism in growing double-muscled Belgian Blue bulls fed corn silage-based diet. *J. Anim. Sci.*, 86, 680-690.
- Van Der Drift S.G.A., Jorritsma R., Schonewille J.T., Knijn H.M. & Stegeman J.A., 2012. Routine detection of hyperketonemia in dairy cows using fourier transforminfrared spectroscopy analysis of B-hydroxybutyrate and acetone in milk in combinaison with test-day information. *J.Dairy Sci.*, 95, 4886-4898.
- Vermeir I. & Verbeke W., 2006. Sustainable Food Consumption : Exploring the consumer attitude - Behaviour gap. *J. Agric. Environ. Ethics.*, 19, 169-194.
- Vermeir I. & Verbeke W., 2007. Sustainable food consumption among young adults in Belgium: Theory of planned behaviour and the role of confidence and values. *Ecological Economics.*, 64 (3), 542-553.
- Wackernagel M., Onisto L., Bello P., Linares A.C., Lopez Falfan I.S., Garcia J.M., Suarez Guerrerri A.I. & Suarez Guerrero M.G., 1999. National natural capital accounting with the ecological footprint concept. *Ecological Economics.*, 29, 375-390.

Wackernagel M. & Yount J.D., 1998. The Ecological Footprint : An Indicator of Progress Toward Regional Sustainability. *Environ. Monit. Assess.*, 51 (1-2), 511-529.

Woodward S.L., Laboyrie P.J. & Jansen E.B.L., 2000. Lotus Corniculatus and Condensed Tannins-Effects on Milk Production by dairy Cows. *Asian-Aust. Anim. Sci.*,13 (Suppl. A)1, 521-525.

Yang J.Y., Seo J., Kim H.J., Seo S. & Ha J.K., 2010. Nutrient Synchrony : Is it a suitable strategy to improve nitrogen utilization and animal performance ?. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 23 (7), 972-979.

Zimmer N. & Cordesse R., 1996. Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *INRA Prod. Anim.*, 9 (3), 167-179.

F. Annexes :

1) Préparation de l'ensilage avec tanin :



Figure 18 : Préparation de la solution de tanin hydrolysable à pulvériser



Figure 19 : Pulvérisation de la solution à base de tanin hydrolysable sur l'ensilage

2) Préparation des poches à urine :

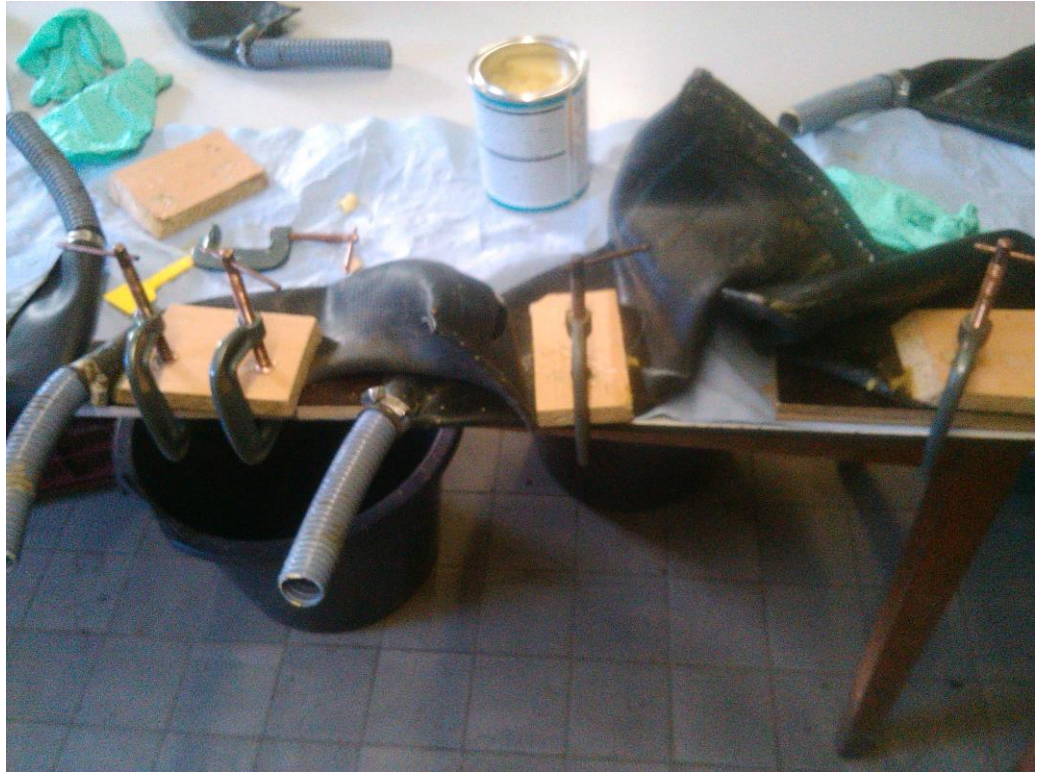


Figure 20 : Confection des poches à urine



Figure 21 : Poche à urine avant fixation



Figure 22 : Poche à urine fixée

3) Equipement de traite au « métabolisme »



Figure 23 : Machine de traite portative