

FACULTÉ UNIVERSITAIRE DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DE GEMBLoux

**Quantification de la production de méthane
par le taurillon Blanc Bleu Belge culard en Wallonie**

Recherches subventionnées par la Direction Générale de l'Agriculture
du Ministère de la Région wallonne

Dossier D31-1074

Rapport de synthèse
1 novembre 2004 – 28 février 2006

Damien LAMBOTTE – Yves BECKERS – André THEWIS
Département des Sciences Agronomiques
Unité de Zootechnie

©, Unité de Zootechnie, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux
Passages des Déportés, 2 - B 5030 Gembloux (Belgique)

Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être
réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur.

Tables des matières

I. Introduction	1
1. Motivations environnementales, économique et sociales	1
1.1. <i>Protocole de Kyoto</i>	1
1.2. <i>Importance du méthane parmi les GES</i>	1
1.3. <i>Importance des ruminants dans les émissions anthropiques de méthane</i>	2
1.4. <i>Origine du méthane</i>	2
2. Objectifs du projet	3
3. Méthodologie choisie	3
II. Expérimentations	4
1. Expériences préliminaires	4
1.1. <i>Introduction</i>	4
1.2. <i>Méthodologie</i>	5
1.3. <i>Résultats et discussion</i>	6
1.4. <i>Conclusions</i>	7
2. Mise en place du dispositif de perfusion et d'échantillonnage.....	8
2.1. <i>Matériel et méthodologie développée</i>	8
3. Choix d'un débit de perfusion.....	10
3.1. <i>Introduction</i>	10
3.2. <i>Méthodologie</i>	10
3.3. <i>Résultats et discussion</i>	11
3.4. <i>Conclusions</i>	13
4. Choix d'une fréquence d'échantillonnage	14
4.1. <i>Introduction</i>	14
4.2. <i>Méthodologie</i>	14
4.3. <i>Résultats et discussion</i>	16
4.4. <i>Conclusions</i>	19
5. Effet du niveau d'ingestion sur la production de méthane par le taurillon BBB culard 20	
5.1. <i>Introduction</i>	20
5.2. <i>Méthodologie</i>	20
5.3. <i>Résultats et discussion</i>	21
5.4. <i>Conclusions</i>	23

6. Evaluation de l'influence de la teneur en amidon de la ration sur la production ruminale de méthane chez le taurillon BBB culard.....	24
6.1. <i>Introduction</i>	24
6.2. <i>Méthodologie</i>	24
6.3. <i>Résultats et discussion</i>	28
6.4. <i>Conclusions</i>	33
7. Discussion générale des résultats obtenus pour l'évaluation de la production ruminale de méthane	35
III. Conclusions	39
IV. Références bibliographiques	40
V. Annexes	42
1. Les méthodes de dosage.....	42
1.1. <i>Matière sèche, cendres totales et matière organique</i>	42
1.2. <i>Matières azotées totales</i>	42
1.3. <i>Extrait éthéré</i>	42
1.4. <i>Constituant pariétaux</i>	42
1.5. <i>Energie brute</i>	43
2. Evolution des débits moyens de production de méthane en fonction du régime distribué (annexe au chapitre 6).....	43

I. Introduction

Ce rapport comprend la synthèse des résultats obtenus dans le cadre de la convention « Quantification de la production de méthane par le taurillon Blanc Bleu Belge culard en Wallonie » financé par la Direction Générale de l'Agriculture du Ministère de la Région wallonne. Ce projet s'inscrit, de manière générale, dans la problématique des émissions de gaz à effet de serre (GES) d'origines agricoles. Plus particulièrement, il vise à améliorer les estimations des émissions des GES provenant des fermentations entériques des bovins wallons producteurs de viande.

1. Motivations environnementales, économique et sociales

1.1. Protocole de Kyoto

En ratifiant le Protocole de Kyoto (1997), la Belgique s'est engagée à réduire ses émissions de GES de 7,5 % par rapport à celle de 1990 (année de référence). Suite à la signature du protocole par la Russie en février 2005, celui-ci est officiellement entré en vigueur et contraint les pays signataires à remplir leurs engagements.

Dans ce cadre, chacune des parties au Protocole de Kyoto (1997) doit mettre en place un système national d'estimation de sa production de GES (art. 5) et rechercher les améliorations à apporter à la qualité des coefficients d'émissions utilisés, de manière à permettre de réduire les incertitudes concernant le système climatique (art. 10).

1.2. Importance du méthane parmi les GES

Le méthane (CH₄) est, en ordre d'importance, le second GES après le dioxyde de carbone (CO₂). En effet, à volumes égaux, son potentiel sur l'effet de serre est de 21 fois supérieur à celui du CO₂. On estime donc qu'une réduction de 10 % de la production de méthane aurait les mêmes effets qu'une diminution équivalente des émissions de CO₂, même si ce dernier est présent dans l'atmosphère en quantité beaucoup plus grande (Chynoweth, 1996). Les sources de méthane anthropiques sont donc d'excellentes candidates pour des actions visant à réduire l'effet de l'homme sur le climat.

1.3. Importance des ruminants dans les émissions anthropiques de méthane

Les fermentations entériques des animaux de ferme représentent la source de méthane la plus importante dans notre pays (tableau 1). En effet, de l'ordre de 75 % de la production de méthane en Belgique provient de l'agriculture et les fermentations entériques constituent environ 61 % des émissions agricoles belges (UNFCCC, 2005).

Tableau 1 : Importance des fermentations entériques dans les productions anthropiques de méthane en 2002 (1000 tonnes d'équivalents CO₂). D'après les inventaires nationaux des GES (UNFCCC, 2005).

Méthane émis	Belgique	Union européenne
Fermentations entériques	4 161	134 638
Total Agriculture	6 822	202 913
Total Anthropique	9 131	358 521

Les ruminants sont, de loin, les plus gros producteurs de méthane d'origine digestive. Le rumen est, en effet, le siège de fermentations anaérobies qui leur confèrent la capacité de valoriser des aliments riches en fibres, mais qui libèrent de grandes quantités de méthane. Le cheptel ruminant wallon est composé principalement de bovins (1 364 222 animaux (INS, 2004)). Les émissions de ces derniers sont donc prépondérantes par rapport aux autres sources de méthane en Région wallonne.

1.4. Origine du méthane

Les émissions de méthane sont une conséquence directe de la dégradation anaérobie des glucides (fibres et amidon *e.g.*) dans le rumen (Fig. 2). Ces glucides sont décomposés en sucres simples puis fermentés par les micro-organismes du rumen, ce qui aboutit à la production d'acides gras volatils (acétate, propionate, butyrate *e.g.*), de CO₂ et d'hydrogène (H₂). Finalement, l'utilisation du CO₂ et de l'H₂ par les bactéries méthanogènes aboutit à la production de CH₄.

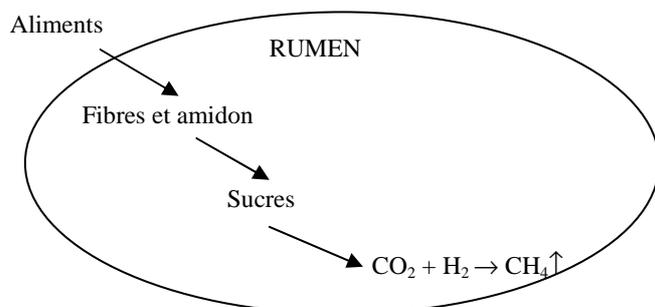


Figure 1 : Dégradation anaérobie des aliments dans le rumen.

2. Objectifs du projet

Le premier objectif de ce travail était de mettre en place une méthode simple et économique permettant de mesurer la méthanogenèse ruminale chez des taurillons BBbc. Par la suite, ce dispositif devait permettre de mesurer la méthanogenèse en routine chez des animaux en croissance nourris avec des rations proches de celles utilisées en Région wallonne.

3. Méthodologie choisie

La méthodologie choisie est basée sur celle développée par Moate *et al.* (1997). Elle consiste à perfuser, en continu dans le rumen, de l'éthane utilisé comme marqueur de la phase gazeuse et à y prélever, à intervalles réguliers, des échantillons de gaz. Cette perfusion, et l'échantillonnage qui y fait suite, sont réalisés sur des animaux porteurs d'une canule ruminale permanente. Les échantillons de gaz sont analysés par chromatographie en phase gazeuse pour déterminer la concentration en méthane [CH₄] et en éthane [C₂H₆]. On peut alors déterminer le débit instantané auquel le méthane est produit dans le rumen en appliquant la formule suivante :

$$\text{Débit CH}_4 = \text{débit C}_2\text{H}_6 \times [\text{CH}_4] / [\text{C}_2\text{H}_6]$$

Un échantillonnage réalisé à intervalle régulier au cours de la journée permet, au final, de calculer la production moyenne de méthane par jour. Le choix de l'éthane est motivé par sa proche parenté chimique avec le méthane qui lui confère des propriétés similaires (solubilité dans la phase liquide du rumen et comportement chromatographique). De plus, il n'est ni produit ni consommé dans le rumen.

II. Expérimentations

1. Expériences préliminaires

1.1. Introduction

Le premier aspect de ce travail a été de développer une technique d'échantillonnage des gaz produit dans le rumen chez les taurillons BBBC de manière à pouvoir estimer la production ruminale de méthane. Or, celle-ci varie au cours de la journée, suite à la prise d'aliment, qui relance à chaque fois les fermentations microbiennes à l'origine de la production de méthane. Vu les grandes quantités de gaz produites dans le rumen (plusieurs centaines de litres par jour), il n'est pas possible de collecter l'entièreté des gaz, à l'instar des travaux réalisés sur des moutons par Fievez *et al.* (2002). L'existence de ces variations cycliques nécessite donc de pouvoir prélever régulièrement des échantillons au cours de la journée.

Par ailleurs, les échantillons collectés doivent pouvoir être stockés avant analyse. Classiquement, l'échantillonnage de gaz se fait avec soit avec des sachets en Téflon®, soit avec des seringues en verre (étanche aux gaz et munies d'une vanne), soit avec des ampoules en verre. Ces matériels sont réutilisables mais nécessitent un investissement certain ainsi qu'un entretien régulier. Or, plusieurs travaux, dont ceux de Cook *et al.* (2004), utilisent des tubes en verre sous vide partiel (Vacutainer®, Becton Dickinson) pour prélever et stocker des échantillons de gaz (provenant de sol pour Cook *et al.* (2004)). Ces tubes, habituellement utilisés pour prélever des échantillons de sang, se remplissent simplement en perçant le bouchon avec une aiguille, le vide partiel à l'intérieur provoquant l'aspiration de l'échantillon. En comparaison des autres moyens d'échantillonnage, ceux-ci présentent l'avantage de permettre le prélèvement d'un grand nombre d'échantillons à faible coût. Par ailleurs, ils sont peu encombrants, facilement transportables et permettent d'avoir un certain confort par le nombre important d'échantillons qui peuvent être stockés sans poser de problème dans la rotation du matériel. Par ailleurs, ils sont à usage unique, ce qui évite les problèmes d'usure ou de casse. Le modèle utilisé est en verre, ne contient ni additif ni revêtement en silicone, et d'une capacité de 10 ml. Ces tubes ont donc été testés avec un gaz de référence avant de les utiliser pour nos échantillonnages de gaz du rumen.

1.2. Méthodologie

a) Analyse des échantillons de gaz

Les échantillons de gaz sont analysés afin de mesurer leurs concentrations en méthane (CH_4) et en éthane (C_2H_6). Ces analyses sont réalisées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (CPG - Carlo Erba HRGC 5160) équipé d'une colonne Q-Plot de 30 m et de 0,53 mm de diamètre (Resteck), d'un injecteur split et d'un détecteur FID (Flamme Ionization Detector). L'hélium est utilisé comme gaz vecteur. L'appareil est calibré au préalable en utilisant un mélange de référence (24,02 % CH_4 , 2,99 % C_2H_6 dans de l' N_2 , Air Liquide, Belgique). Les injections se font manuellement à l'aide d'une seringue en verre étanche aux gaz de 25 μl munie d'une vanne (SGE, Australie).

b) Utilisation des tubes Vacutainer

La bonbonne contenant le mélange de référence est munie d'un détendeur à deux étages lui-même équipé d'une pièce comportant un septum. Ce dernier permet de prélever une aliquote de gaz de référence grâce à une seringue étanche au gaz pour le calibrage du CPG mais également de remplir les tubes Vacutainer en utilisant une aiguille double. Cette dernière permet de percer en même temps le septum et le bouchon en caoutchouc des tubes Vacutainer.

c) Échantillonnage et stockage des échantillons

Dans un premier temps, 3 tubes ont été remplis avec le mélange de référence puis analysés à trois reprises, afin de tester la possibilité de les utiliser pour prélever des échantillons de gaz (test 1). Les résultats sont comparés à ceux obtenus lors de l'échantillonnage direct du gaz de référence à l'aide de la seringue. Par la suite, 12 tubes ont été remplis avec le mélange de référence. Deux tubes différents ont été analysés à deux reprises après 0, 3, 6, 9, 12 et 24 h de stockage, ce qui constitue un test de conservation à « court terme » (test 2).

Enfin, 12 tubes ont été remplis avec le mélange de référence. Deux tubes différents ont été analysés à deux reprises après 0, 12, 24, 48, 72 et 96 h de stockage, ce qui constitue un test de conservation à « long terme » (test 3).

d) Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques sont réalisées avec le programme MINITAB v.13.2.

Le test 1 est analysé selon une analyse de la variance à un critère de classification (ANOVA 1), avec comme facteur fixe l'échantillon. La structuration des moyennes est réalisée selon le test de Dunnett, qui compare les moyennes à un témoin (Dagnelie, 1975).

Les tests 2 et 3 sont analysés dans un premier temps selon un modèle mixte hiérarchisé à deux critères de classification : $Y = \text{Temps} + \text{Vacutainer (Temps)} + e$. L'effet « Vacutainer (Temps) » n'étant pas significatif, le modèle est simplifié en ANOVA 1. Comme précédemment, la structuration des moyennes est réalisée selon le test de Dunnett, la mesure au temps 0 étant le témoin (pas de conservation).

1.3. Résultats et discussion

Comme le montre le tableau ci-dessous, l'utilisation des Vacutainer entraîne une dilution très hautement significative de l'échantillon (diminution des concentrations en CH_4 et C_2H_6). Il est probable que le vide partiel dans les Vacutainer ne permet de remplir complètement le volume du tube. Par conséquent, il subsiste dans le tube un résidu de gaz dépourvue de méthane et d'éthane. Néanmoins, les résultats montrent que le rapport entre les concentrations $[\text{CH}_4]/[\text{C}_2\text{H}_6]$ dans le Vacutainer est identique à celui du gaz de référence. Cette caractéristique est nécessaire pour pouvoir appliquer la méthode de calcul du débit de CH_4 .

Tableau 2 : Comparaison entre le mélange de référence et trois Vacutainer remplis avec le mélange de référence pour les concentrations en CH_4 et C_2H_6 (% V/V).

Echantillons	Tube			Témoin	SEM ⁽¹⁾	Effet ⁽²⁾ « Vacutainer »	Intervalle de confiance du témoin (Dunnett)
	1	2	3				
$[\text{CH}_4]$	19,40	21,10	20,00	22,35	0,35	***	21,18 - 23,53
$[\text{C}_2\text{H}_6]$	2,43	2,62	2,50	2,79	0,04	***	2,67 - 2,91
$[\text{CH}_4]/[\text{C}_2\text{H}_6]$	8,00	8,03	8,01	8,01	0,01	0,845	7,93 - 8,10

⁽¹⁾ Erreur standard de la moyenne ; ⁽²⁾ *** $p \leq 0,001$; ^{a, b, c} Au sein d'une même ligne, les moyennes suivies d'une lettre différente sont significativement différentes.

Par ailleurs au niveau de la possibilité de stockage des échantillons, le test 2 n'a montré aucune différence significative entre les échantillons de référence (stockage inférieur à une heure) et ceux conservés entre 3 et 24 h. Ceci a amené le test 3 afin de voir s'il était possible de les stocker plus longtemps.

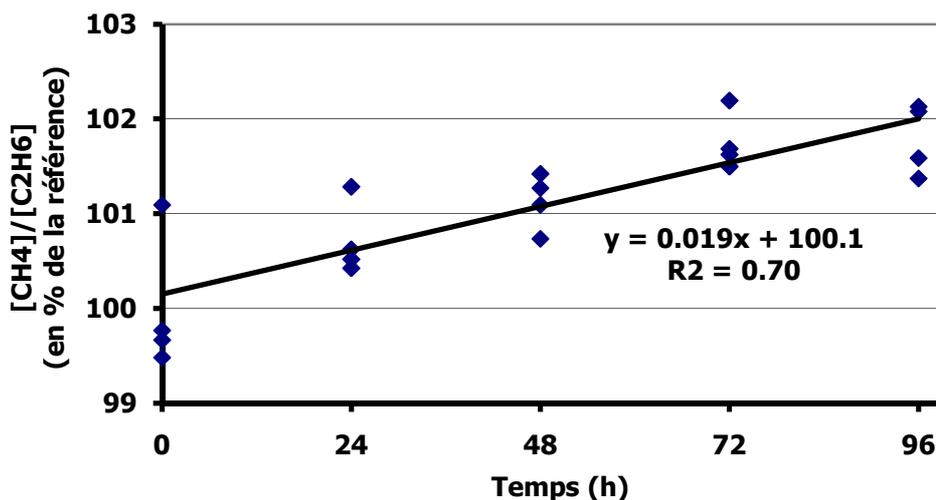


Figure 2 : Evolution du rapport des concentrations $[CH_4]/[C_2H_6]$ par rapport aux témoins en fonction du temps (heures).

Comme le montre la figure 2, le rapport entre les concentrations $[CH_4]/[C_2H_6]$ augmente avec le temps. Cette augmentation entraîne une différence significative ($p < 0,05$) par rapport aux références au-delà de 24 h de stockage.

1.4. Conclusions

Suite à ces résultats, les tubes en verre Vacutainer® ont été retenus pour la prise d'échantillons de gaz vu la possibilité de prélever des échantillons et vu leur capacité à conserver l'échantillon pendant une durée de 24 h sans induire de différence significative dans le rapport des concentrations $[CH_4]/[C_2H_6]$. Cette période de 24 h correspond également à la durée limite de conservation conseillée par les fabricants pour les sacs en Téflon®. Néanmoins, cette limite de 24 h induit la nécessité d'analyser les échantillons au fur et à mesure de leur prélèvement, ce qui limite le nombre d'échantillons qui peuvent être collectés sur une journée.

2. Mise en place du dispositif de perfusion et d'échantillonnage

Le dispositif de perfusion et d'échantillonnage des gaz dans le rumen est inspiré du système développé par Fievez (2002). Pour rappel, les taurillons utilisés au cours des expérimentations sont munis d'une canule permanente au rumen. Lors des mesures de la méthanogenèse ruminale, cette canule est fermée par un bouchon en caoutchouc qui permet la perfusion de l'éthane en continu ainsi que le prélèvement des échantillons.

2.1. Matériel et méthodologie développée

Pour chaque animal, l'éthane (99,95 %, Air Liquide, Belgique) est envoyé vers le rumen à un débit constant grâce à un contrôleur de débit massique (GFC 17, Aalborg, Etats-Unis). Il est ensuite perfusé grâce à un tube en PVC (4x6 mm) qui traverse le bouchon en caoutchouc qui ferme la canule ruminale (figure 3).

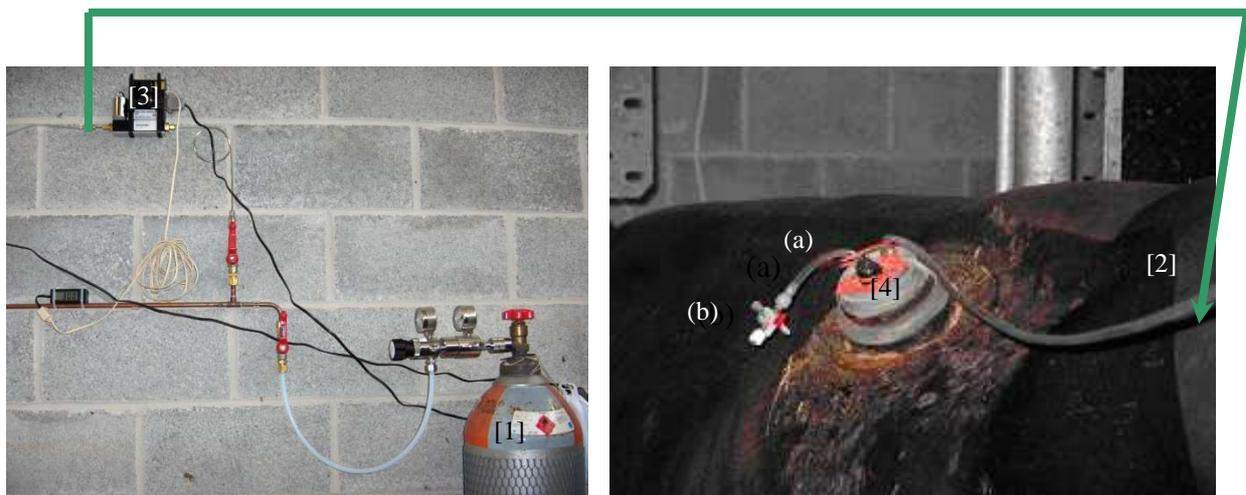


Figure 3 : Système de perfusion de l'éthane et d'échantillonnage ; bonbonne d'éthane [1], parcours du gaz depuis la bonbonne jusque dans le rumen (flèche verte) via le tube en PVC [2], après passage à travers le contrôleur de débit massique [3]; détail du bouchon en caoutchouc disposé au niveau de la canule [4] : tube d'échantillonnage (a), robinet à trois voies (b).

Par ailleurs, ce même bouchon est traversé par un tube en PVC rigide (15x16 mm) recourbé vers la partie supérieure du rumen (sac dorsal), afin d'avoir accès à la phase gazeuse. Celui-ci sert de guide à un tube en PVC souple (4x6 mm) utilisé pour l'échantillonnage. En effet, ce tube est raccordé à un robinet à trois voies. Lors de l'échantillonnage, ce robinet est relié d'une part à une seringue en plastique de 100 ml, et d'autre part à une aiguille. Ce système

permet d'avoir accès à tout instant à la phase gazeuse du rumen sans qu'il soit en contact avec l'air extérieur (figure 4).

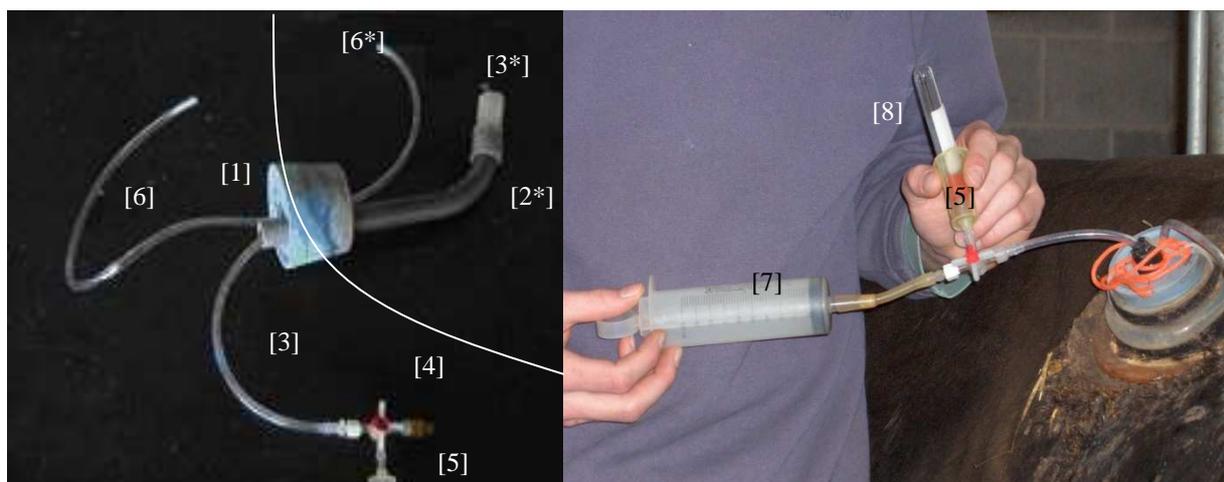


Figure 4 : A gauche, détail du bouchon en caoutchouc disposé au niveau de la canule : bouchon en caoutchouc [1], tube en PVC rigide [2] dans lequel passe le tube d'échantillonnage [3], raccordé à son extrémité à un robinet à trois voies [4] muni d'une aiguille et d'un porte aiguille [5]. Tube en PVC souple par lequel arrive l'éthane [6]. * : partie située à l'intérieur du rumen. A droite, procédure d'échantillonnage : [7] seringue en plastique, [8] tube Vacutainer percé avec une

La prise d'échantillon se fait en 5 étapes : 1° mettre en communication le rumen et la seringue ; 2° aspirer une fraction des gaz du rumen dans la seringue ; 3° mettre en communication la seringue avec l'aiguille ; 4° percer le septum d'un tube Vacutainer avec l'aiguille ; 5° fermer le robinet. Ce dispositif répond à plusieurs contraintes. Tout d'abord, le rumen étant un milieu sans oxygène, il ne peut être en contact avec l'atmosphère, sous peine d'en perturber le fonctionnement. Par ailleurs, le rumen contient une part importante de liquide et de particules alimentaires qui sont susceptibles de rentrer dans le tube d'échantillonnage suite aux mouvements de l'animal et de ceux de la paroi ruminale. D'où l'utilité de la seringue qui permet, par va-et-vient du piston de dégager le tube d'échantillonnage si nécessaire. Enfin, l'utilisation de la seringue permet de s'assurer que la prise d'échantillon a bien lieu grâce au mouvement du piston de la seringue lorsque le gaz rentre dans le tube Vacutainer. Néanmoins, ce système présente un point faible au niveau de l'aiguille qui permet l'échantillonnage. En effet, celle-ci peut s'obstruer facilement si une particule ou une goutte de jus de rumen reste bloquée dans le dispositif à proximité à proximité de l'aiguille. Ceci nécessite donc un contrôle de la part du manipulateur.

3. Choix d'un débit de perfusion

3.1. Introduction

La mesure de la méthanogenèse ruminale nécessite de perfuser de l'éthane à débit continu dans le rumen. Néanmoins, il n'est pas possible de déterminer à priori quel débit utiliser. Le choix du débit est lié à la contrainte analytique. En effet, le mélange de référence utilisé pour le calibrage du CPG titre 2,99 % de C₂H₆. Par ailleurs, l'appareil est calibré en injectant des volumes croissants (de 10 à 25 µl) du gaz de référence avec une seringue en verre étanche au gaz (SGE, Australie). Ceci permet, en injectant des volumes d'échantillon de gaz adaptés (10 à 25 µl), de titrer des concentrations dans une gamme allant de 1,2 à 7,5 % en éthane. Partant de ces concentrations, il importe que la concentration en éthane dans les échantillons de gaz de rumen prélevé soit toujours comprise entre les valeurs extrêmes. L'objectif de cette expérience est de définir le débit de perfusion d'éthane qui respecte cette condition.

3.2. Méthodologie

a) Animaux et régime

L'expérience est effectuée sur trois taurillons BBBc (493 ± 29,6 kg) en stabulation entravée selon un dispositif en carré latin. Le dispositif de perfusion et d'échantillonnage leur est appliqué deux jours avant. En effet, l'application du dispositif au niveau de leur canule (remplacement du bouchon de la canule par le dispositif) implique une entrée inévitable d'oxygène dans le rumen qui peut momentanément modifier les conditions dans le rumen.

Les animaux sont nourris à 8h30 et 20h30 avec une ration à base d'ensilage de pulpes de betterave surpressées complétée par du JB25 (SCAM) et de la paille hachée (5 cm). Ces trois aliments sont apportés à hauteur, respectivement, de 54,5, 43 et 2,5 % par rapport à la matière sèche (MS) totale distribuées. Le niveau d'ingestion est limité à 70 g MS/kg PM.

La teneur en MS de la pulpe de betterave étant variable d'un jour à l'autre, elle est évaluée quotidiennement par séchage d'un échantillon dans un four à micro-ondes grâce à un programme préétabli, avant la préparation journalière des rations. Conjointement, la teneur en MS est contrôlée par séchage d'un échantillon dans une étuve à 60 °C pendant 48 h afin de déterminer les quantités de MS réellement ingérées par les animaux.

Les aliments sont échantillonnés et analysés pour déterminer leur teneur en matière sèche (MS), matière organique (MO), matières azotées totales (MAT), en parois cellulaires (NDF : Neutral Detergent Fiber ; ADF : Acid Detergent Fiber) et en matières grasses (EE : Extrait Ethéré). Les méthodes analytiques sont présentées en annexe 1.

b) Perfusion et échantillonnage

Trois débits sont testés : 12, 15 et 18 ml/min sur trois jours. La perfusion d'éthane dans le rumen se fait de manière continue au cours de la période d'échantillonnage et commence une demi-heure avant le premier prélèvement qui a lieu juste avant le repas du matin (8h30, t = 0) et ensuite à 1 - 1,5 - 2 - 3 - 8,5 - 12 h.

c) Analyse statistique

L'analyse statistique, réalisée avec le programme MINITAB v.13.2, est basée sur un dispositif en carré latin en utilisant le modèle linéaire généralisé, un facteur fixe (débit) et deux facteurs aléatoires (jour et animal). La structuration des moyennes est réalisée selon la méthode de Newman et Keuls (Dagnelie, 1975).

3.3. Résultats et discussion

a) Composition chimique des aliments

Les aliments utilisés au cours des expériences présentées aux points 3, 4 et 5 étant les mêmes, leurs valeurs moyennes sont présentées ici sur base des valeurs obtenues pour les différents échantillons récoltés. La composition chimique (matière sèche, matière organique, matières azotées totales, parois cellulaires (NDF et ADF) et extrait éthéré) des aliments distribués aux animaux est présentée dans le tableau 3.

Tableau 3 : Teneur en MS (g/kg MF) et composition chimique des aliments (g/kg MS).

Constituants/Aliments	Pulpes de betterave	JB25	Paille de froment
MS	226	877	876
MO	899	908	940
MAT	95	271	35
NDF	278	248	780
ADF	194	149	546
EE	26	40	12

b) Concentration en éthane dans les échantillons

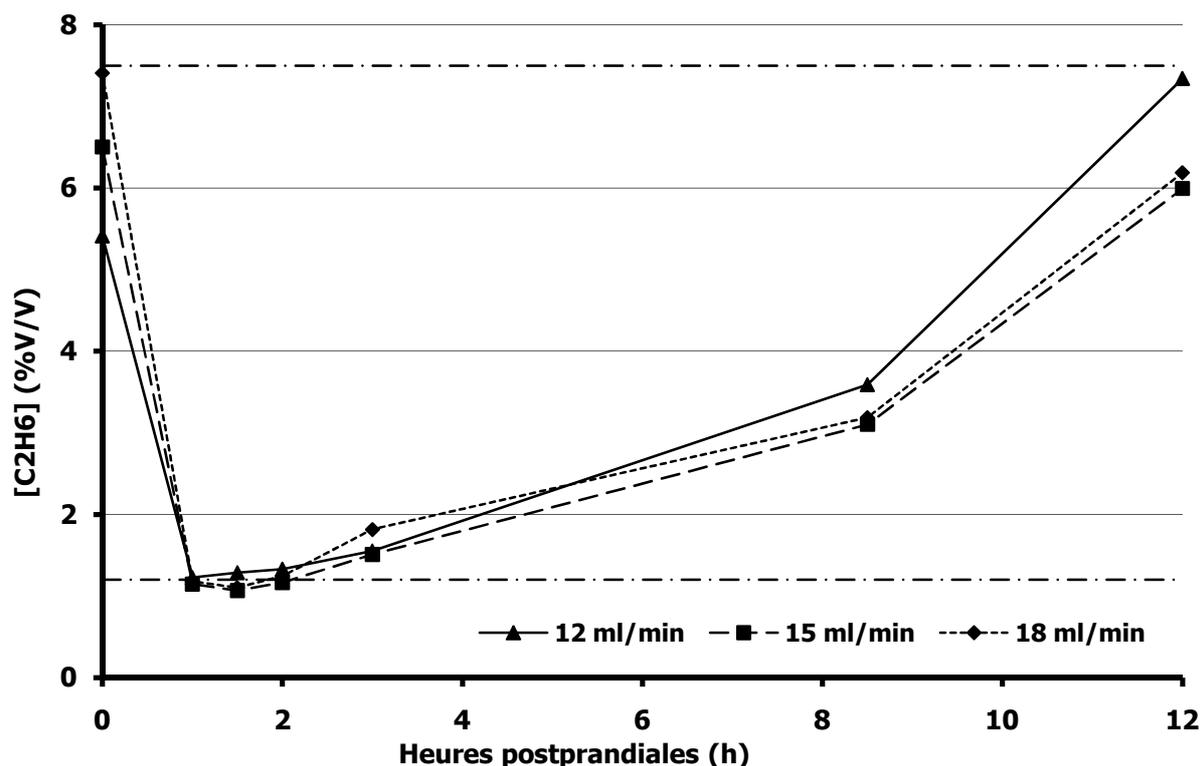


Figure 5 : Evolution de la concentration moyenne en C₂H₆ (% V/V) dans les échantillons de gaz en fonction du temps après la distribution du repas (t = 0).

Comme le montre la figure 5, la concentration en éthane dans les échantillons est fortement variable dans le temps, avec un maximum atteint juste avant la distribution des repas (0 et 12 h). La diminution de la concentration en éthane dans les échantillons après la distribution du repas est bien sûr liée au démarrage des fermentations qui fait suite à l'arrivée des aliments dans le rumen.

Les concentrations en C₂H₆ ont été comparées en fonction du débit utilisé. En toute logique, la concentration en éthane dans les échantillons devrait augmenter avec le débit utilisé. Or, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence (voir tableau 4). Cette tendance est probablement masquée par les variabilités inter et intra-animale dans les fermentations ruminales, et par le faible nombre d'échantillons prélevés. Par ailleurs, des différences dans les concentrations (à débit égal) peuvent également être liées à l'échantillonnage, car, comme on l'a vu précédemment, celui-ci conserve le rapport entre les concentrations mais pas nécessairement les concentrations elles-mêmes. Enfin, il est apparu que des fuites de gaz peuvent avoir lieu par les côtés de la canule, ce qui peut influencer les concentrations en gaz dans les échantillons.

Par ailleurs, ces résultats confirment que le débit d'éthane utilisé n'a pas d'influence sur la production ruminale de méthane mesurée.

Tableau 4 : Influence du débit (ml C₂H₆/min) sur les concentrations en C₂H₆ (% V/V) dans le rumen au cours de la journée et sur la production de méthane mesurée (l/j).

Temps (h)	n	Débit (ml C ₂ H ₆ /min)			SEM ⁽¹⁾
		12	15	18	
0	3	5,41	6,50	7,41	0,78
1	3	1,23	1,14	1,18	0,22
1,5	3	1,29	1,07	1,10	0,20
2	3	1,33	1,16	1,24	0,10
3	3	1,55	1,51	1,82	0,32
8,5	3	3,59	3,10	3,19	1,01
12	3	7,34	5,99	6,19	0,83
CH ₄ (l/j)	3	140,5	149,9	136,0	22,9

⁽¹⁾ Erreur standard de la moyenne.

3.4. Conclusions

En ce qui concerne les concentrations limites dans les échantillons (1,2 et 7,5 % C₂H₆), aucun des trois débits ne garantis de rester dans cette fourchette pour tous les échantillons. Vu la dispersion des valeurs obtenues, il était difficile de choisir objectivement un débit particulier, le débit intermédiaire de 15 ml C₂H₆/min a donc été choisi pour les deux expériences suivantes.

Enfin, il a semblé qu'un délai de 30 min de perfusion avant le début des prélèvements pouvait parfois être insuffisant. En conséquence, ce délai a été adapté à 10 min à 30 ml C₂H₆/min suivi de 45 min à 15 ml C₂H₆/min

Les trois débits de perfusion d'éthane dans le rumen permettent de produire des échantillons de gaz de rumen dont les concentrations en éthane sont variablement situées dans la gamme de calibrage. Les échantillons prélevés entre 1 et 2 h après la distribution du repas génèrent toutefois les concentrations les plus faibles en éthane, proches de la limite de calibrage. Pour les expériences futures, le débit moyen de perfusion de 15 ml/min sera utilisé et le délai entre le début de la perfusion et la prise d'échantillon sera porté à 45 min, elle-même précédée d'une période de 10 min au cours de laquelle l'éthane sera perfusé à 30 ml/min.

4. Choix d'une fréquence d'échantillonnage

4.1. Introduction

La production de méthane dans le rumen se fait de manière cyclique. En effet, celle-ci est conditionnée en premier lieu par la disponibilité en nutriment pour les micro-organismes. De ce fait, lorsque l'animal ingère la partie principale de sa ration, une grande quantité de nutriment devient disponible et entraîne une production importante de méthane (pic principal). Ensuite, le milieu s'appauvrit au fur et à mesure que les micro-organismes dégradent les nutriments, ce qui induit une diminution de la méthanogenèse jusqu'au repas suivant. Mais celle-ci peut être relancée lorsque l'animal rumine ou lorsqu'il ingère le reste de sa ration, ce qui provoque des pics de fermentation plus courts et/ou moins intenses que le pic principal. Il est donc important d'adapter l'échantillonnage des gaz du rumen de manière à obtenir une bonne estimation de la production de méthane au cours de la journée.

4.2. Méthodologie

a) Animaux et régimes

L'expérience est effectuée sur quatre animaux ($523,8 \pm 28,2$ kg) en stabulation entravée. Le dispositif de perfusion et d'échantillonnage est remis en place deux jours avant l'expérience. Ils sont alimentés de la même manière que lors de l'expérience précédente (*cf.* point 3.2.)

Afin que la fréquence d'échantillonnage choisie corresponde à la production de méthane durant la journée, et que par conséquent un seul pic de méthane n'apparaisse au cours de la journée, les quantités d'aliments non ingérées par l'animal dans les 90 minutes après la distribution du repas sont retirées. Les refus sont échantillonnés puis séchés à l'étuve à 60 °C pendant 48 h, afin de déterminer la MS réellement ingérée (MSi) par l'animal. Les animaux sont préalablement adaptés à ce type de distribution des repas.

b) Perfusion et échantillonnage

La perfusion d'éthane dans le rumen se fait de manière continue au cours de la période d'échantillonnage. Sur base de l'expérience précédente, le débit est fixé à 30 ml/min durant 10 minutes puis diminué à 15 ml/min. Le premier échantillon est prélevé 55 min. après le début de la perfusion, juste avant de distribuer le repas du matin ($t = 0$) et se fait ensuite à 0,5 - 1 - 1,5 - 2 - 2,5 - 3 - 4 - 6 - 8 - 10 - 12 h. L'opération est répétée sur six jours différents.

c) Calcul de la méthanogenèse ruminale

Comme expliqué précédemment (*cf.* point 1.2.), les échantillons de gaz sont analysés par chromatographie en phase gazeuse pour déterminer la concentration en méthane [CH₄] et en éthane [C₂H₆]. On peut alors déterminer le débit instantané (l/h ; à 1,01 atm et 21,1 °C) auquel le méthane est produit dans le rumen en appliquant la formule suivante :

$$(\text{Débit CH}_4)_i = (\text{débit C}_2\text{H}_6 \times [\text{CH}_4]_i / [\text{C}_2\text{H}_6]_i)_i.$$

La production journalière (en l) est alors calculée par :

$$CH_4 \text{ journalier} = 2 \times \sum_{i=0}^n \left[\frac{(\text{Débit CH}_4)_i + (\text{Débit CH}_4)_{i+1}}{2} \right] \times [T_{i+1} - T_i]$$

où T_i est le moment de prélèvement de l'échantillon i.

d) Analyse statistique

L'analyse statistique est une ANOVA 2 mixte réalisée avec le programme MINITAB v.13.2. avec un facteur fixe (jour) et un facteur aléatoire (animal). La structuration des moyennes est réalisée selon la méthode de Newman et Keuls (Dagnelie, 1975).

Afin de déterminer si une fréquence d'échantillonnage moins importante peut toujours fournir des résultats satisfaisants, un test d'égalité de deux moyennes est réalisé. La production moyenne, déterminée d'après les 12 prélèvements, est comparée successivement aux différentes moyennes lorsqu'un moment de mesure, ou des combinaisons de moments, sont soustraits de l'ensemble. Le test de l'hypothèse nulle (m₁ = m₂) se réalise en calculant les différences absolues :

$$d_1 = x_{11} - x_{21}$$

.

.

.

$$d_n = x_{1n} - x_{2n}$$

et la quantité :

$$t_{obs} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{SCE_d}{n(n-1)}}}$$

On rejette l'hypothèse nulle lorsque : $t_{obs} \geq t_{1-\alpha/2}$

4.3. Résultats et discussion

a) Production de méthane et ingestion

L'expérience réalisée sur 4 animaux durant 6 jours a permis de collecter 22 mesures (2 manquantes pour l'animal 1, jours 5 et 6) de la production de méthane. Les courbes moyennes de fermentation sont illustrées par la figure 6. Comme prévu, les profils de fermentations présentent globalement un pic principal, suivi d'une diminution progressive de la méthanogénèse.

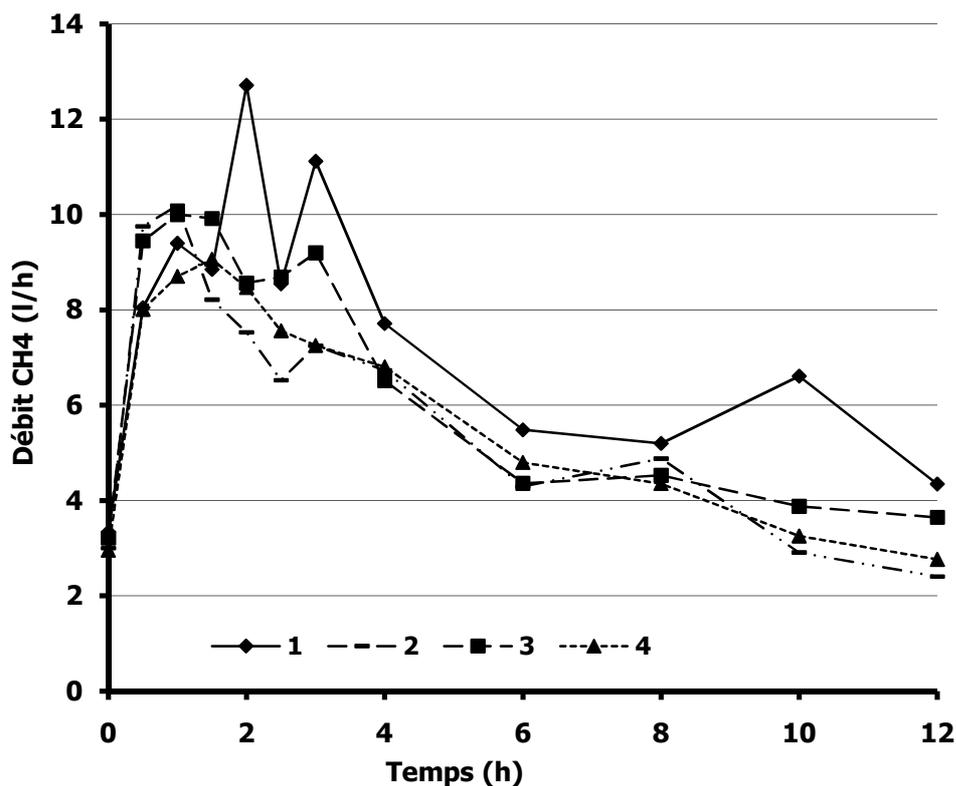


Figure 6 : Evolution du débit de méthane (l/h) en fonction du temps et de l'animal.

Comme le montre le tableau 5, il y a des différences très hautement significatives entre les animaux au niveau de la production journalière de méthane ainsi qu'au niveau de l'ingestion. Mais il n'existe aucune corrélation significative entre ces deux paramètres. Il est à noter que seul l'animal 2 a laissé des refus, ce qui explique son ingestion nettement inférieure aux autres.

Tableau 5 : Productions de méthane et quantités ingérées selon l'animal.

	n	Animal				SEM ⁽¹⁾	Effets ⁽²⁾	
		1	2	3	4		Animal	Jour
CH ₄ (l/j)	22	166,9 ^a	127,4 ^b	139,9 ^b	129,7 ^b	3,6	***	0,661
MSi ⁽³⁾ (kg/j)	24	7,70 ^a	6,70 ^c	7,09 ^b	7,68 ^a	0,09	***	0,587
CH ₄ (l/kg MSi)	22	21,8 ^a	19,1 ^b	19,7 ^{ab}	16,9 ^c	0,5	**	0,573

⁽¹⁾ Erreur standard de la moyenne ; ⁽²⁾ *** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; ⁽³⁾ Matière sèche ingérée. ^{a, b, c} Au sein d'une même ligne, les moyennes suivies d'une lettre différente sont significativement différentes ($p \leq 0,05$).

b) Réduction de la fréquence d'échantillonnage

Lors de cette expérience, des séries de 12 échantillons ont été prélevés chaque jour sur chaque animal. Or, ces échantillons doivent être analysés dans les 24 h qui suivent leur prélèvement. Par ailleurs, il faut compter environ 6 à 7 h uniquement pour réaliser ces analyses. Il serait donc intéressant de pouvoir réduire le nombre d'échantillon à analyser quotidiennement afin de libérer du temps pour d'autres postes de travail (soin aux animaux, autres analyses, etc.). Par ailleurs, cette réduction se fait aussi au bénéfice du bien-être des animaux car ceux-ci doivent être debout pour que le prélèvement de gaz puisse se faire correctement. Les 22 séries de mesures réalisées donnent une production moyenne de méthane égale à 138,6 l/j.animal. Le tableau 6 montre l'influence (différence relative \bar{d} (%)) que peut avoir le retrait d'un échantillon sur la série des 12 prélevés pour le calcul de la production de méthane journalière moyenne. Le premier et le dernier échantillon de la série ne peuvent être enlevés puisqu'ils sont indispensables au calcul de cette même production.

Tableau 6 : Valeurs des variables t de Student et différences relatives observées lorsqu'un échantillon est soustrait de l'ensemble des 12 échantillons prélevés.

Echantillon (n°)	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Temps après le repas (h)	0,5	1	1,5	2	2,5	3	4	6	8	10
t _{obs} (t _{th} = 2,08)	8,35	1,75	0,72	1,16	2,42	1,88	0,81	4,52	1,25	0,02
\bar{d} (%)	-1,8	-0,5	0,2	-0,4	0,7	-1,1	0,7	3,2	-1,1	0,0
V (%) ⁽²⁾	12,8	12,6	12,8	12,3	12,8	12,3	13,2	12,3	13,6	11,4

⁽¹⁾ t_{obs} : valeurs t de Student à comparer avec t_{th} = 2,08 ; ⁽²⁾ Coefficient de variation.

Ainsi, la suppression de l'échantillon n° 2, 6 ou 9 entraînerait l'obtention d'une moyenne significativement différentes de 138,6 l/j.animal (t_{obs} > t_{th}), ce qui ne signifie pas pour autant une différence de grande amplitude, comme dans le cas de l'échantillon n° 6. Par ailleurs, il est possible de supprimer jusqu'à quatre échantillons, pour autant que l'ensemble des échantillons soit bien réparti sur la période de 12 h. Ceci permet également de garder une idée

de la manière dont évoluent les fermentations. Plusieurs combinaisons sont présentées à titre d'exemple dans le tableau ci-dessous. Il faut savoir également que le fait de supprimer des échantillons influence la dispersion des valeurs, comme le montre le coefficient de variation ($V (\%) = 100 \cdot \text{écart-type} / \text{moyenne}$).

Tableau 7 : Valeurs des variables t de Student et différences relatives observées pour différentes combinaisons d'échantillons soustraits de l'ensemble des 12 échantillons prélevés.

Combi. ⁽¹⁾	t _{obs} ⁽²⁾	\bar{d} (%)	V ⁽³⁾ (%)	Combi.	t _{obs}	\bar{d} (%)	V (%)	Combi.	t _{obs}	\bar{d} (%)	V (%)
3, 5	1,65	-1,6	14,6	3, 5, 7	0,16	-0,2	13,5	3, 5, 7, 11	1,29	-2,0	10,3
3, 8	0,29	0,3	13,9	3, 5, 8	0,85	1,0	14,5	3, 5, 8, 10	0,84	-1,3	15,8
3, 11	0,40	-0,4	10,6	3, 5, 11	0,69	-0,9	10,3	3, 5, 8, 11	0,11	-0,2	11,5
4, 7	1,29	-0,9	12,5	3, 8, 11	0,27	0,3	11,7				
4, 8	1,05	0,9	14,1	4, 7, 11	0,65	-0,9	11,0				
5, 8	0,29	0,3	13,4	4, 8, 11	1,02	0,9	11,8				
5, 10	1,84	-1,6	13,8								
5, 11	0,35	-0,4	10,2								
8, 11	0,73	0,8	11,6								

⁽¹⁾ Combi. : n° des échantillons non utilisés pour le calcul de la production de méthane journalière.

⁽²⁾ t_{obs} : valeurs t de Student à comparer avec t_{th} = 2,08 ; ⁽³⁾ Coefficient de variation.

Ceci peut donc avoir une répercussion sur la précision de la méthode et sur le nombre de mesures nécessaires, en théorie, pour mettre en évidence des différences significatives entre différents traitements (voir point suivant). Enfin, un nombre réduit d'échantillon risque de rendre les mesures journalières plus sensibles à la perte d'un échantillon ou à une mesure exceptionnelle de débit.

Il est également possible de remplacer le dernier échantillon de la journée (n° 12) par le premier. En effet, cela correspond à deux moments équivalents dans le cycle des fermentations. Dans cette expérience, cela n'engendrerait aucune différence significative (t_{obs} = 0,33; \bar{d} = -0,1%).

c) Précision de la méthode

La relation suivante $n = \frac{21V^2}{\delta_r^2}$, permet de déterminer la différence δ_r , exprimée en % de la

moyenne générale, qui peut être mise en évidence à partir de l'effectif n , lorsque les risques d'erreur valent $\alpha = 0,05$ et $\beta = 0,1$.

Dans cette relation, n est le nombre de mesures et V désigne le coefficient de variation, exprimé en pour-cent de la moyenne (Dagnelie, 1975).

Un calcul théorique basé sur la valeur de V (12,6 %) mesuré au cours de cette expérience montre que 133, 33 et 22 mesures par traitement sont requises pour mettre en évidence une différence de 5, 10 et 12 %, respectivement, entre les traitements. Ces chiffres mettent en évidence les limites de la méthode.

En ce basant sur les travaux de Benchaar *et al.* (2001), les stratégies alimentaires étudiées (niveau d'ingestion, proportion et nature du concentré, ...) induisent des différences de production de méthane comprise entre 7 et 40 %. Les résultats de notre expérience montrent qu'il serait dès lors nécessaire de réaliser 8 observations par traitement pour mettre en évidence une différence relative de 20 %. Sachant que la variabilité animale surpasse la variabilité journalière, la préférence sera toujours de maximiser le nombre d'animaux objets des mesures au détriment du nombre de jours de mesure.

4.4. Conclusions

Cette expérience a permis de confronter la méthodologie de mesure aux principales sources de variation. Les résultats mettent en évidence l'importance de la variabilité animale lors de la mesure de la méthanogenèse alors que la variabilité journalière paraît secondaire. Actuellement, le débit journalier de méthane est calculé sur base de 12 prélèvements de gaz du rumen. La fréquence d'échantillonnage pourrait être réduite sans altérer la qualité de la mesure.

Ces sources de variation et la précision de la méthode seront prises en considération lors de l'établissement des protocoles expérimentaux futurs.

5. Effet du niveau d'ingestion sur la production de méthane par le taurillon BBB culard

5.1. Introduction

L'objectif de cette expérience est d'étudier l'influence du niveau d'ingestion d'une ration sur la quantité de méthane produite par des taurillons BBB culard en croissance. Classiquement, une augmentation du niveau d'ingestion de la ration induit une diminution de la production de méthane selon les données de la littérature.

5.2. Méthodologie

a) Animaux et régimes

L'expérience est effectuée sur trois animaux ($535,0 \pm 27,6$ kg). Trois niveaux d'ingestion sont testés : 55, 65 et 75g MS/kg PM sur trois périodes de 6 jours. Pour chaque animal et chaque niveau d'ingestion, 2 jours de mesure sont prévus après une période d'adaptation de 4 jours. Les animaux sont pesés avant chaque période, de manière à adapter leur ration. Les rations sont les mêmes que pour les deux expériences précédentes, seules changent les quantités d'aliments distribuées.

b) Perfusion et échantillonnage

Les conditions de perfusion, d'échantillonnage et d'analyses sont celles décrites précédemment.

c) Analyse statistique

L'analyse statistique, réalisée avec le programme MINITAB v.13.2, est basée sur un dispositif en carré latin en utilisant le modèle linéaire généralisé, avec un facteur fixe (niveau d'ingestion) et deux facteurs aléatoires (jour et animal). Les interactions sont regroupées avec l'effet résiduel. La structuration des moyennes est réalisée selon la méthode de Newman et Keuls (Dagnelie, 1975).

5.3. Résultats et discussion

a) Composition chimique des aliments

(cf. *infra*)

b) Production de méthane et ingestion

Tableau 8 : Moyennes pour la production de méthane et l'ingestion.

	Niveau d'ingestion (g MS/kg PM)			SEM ⁽¹⁾	Effets ⁽²⁾	
	55	65	75		Ingestion	Animal
MSi ⁽³⁾ (kg/j)	6,12 ^c	7,30 ^b	8,41 ^a	0,23	***	***
CH ₄ (l/j)	163,4	157,2	162,1	4,8	0,771	*
CH ₄ (l/kg MSi)	26,8 ^a	21,6 ^b	19,3 ^b	1,0	***	**

⁽¹⁾ Erreur standard de la moyenne ; ⁽²⁾ *** p ≤ 0,001 ; ** p ≤ 0,01 ; * p ≤ 0,05 ; ⁽³⁾ Matière sèche ingérée. ^{a, b, c} Au sein d'une même ligne, les moyennes suivies d'une lettre différente sont significativement différentes (p ≤ 0,05).

Durant cette expérience, les taurillons ont reçus des quantités significativement différentes de la ration expérimentale (tableau 8), mais la production journalière de méthane (l/j) est restée identique. Nos résultats ne montrent donc pas de relation entre la quantité ingérée et la production totale de méthane par jour, contrairement aux résultats obtenus par Boadi et Wittenberg (2001) pour des génisses nourries avec des fourrages de diverses qualités. Ainsi, la production journalière de méthane était linéairement corrélées (r = 0,80 ; p ≤ 0,001) à l'ingestion pour les animaux alimentés *ad libitum*. Par contre, cette corrélation était moins bonne (r = 0,40 ; p = 0,034) pour les animaux alimentés de manière restreinte, comme dans notre expérience. D'après Boadi et Wittenberg (2001) la production de méthane peut être influencée par l'ingestion mais également par des facteurs liés à l'animal, tels que le comportement alimentaire, la capacité du rumen ou le taux de passage des digesta (Van Soest, 1982 ; cité par Boadi et Wittenberg, 2001).

En termes de production journalière de méthane, nos résultats montrent que l'augmentation de l'ingestion compense complètement la diminution du temps de séjour de l'aliment dans le rumen.

Enfin, il faut aussi tenir compte du fait que cette méthode ne permet pas de quantifier le méthane d'origine intestinale. L'augmentation du niveau d'ingestion est susceptible aussi de déplacer en partie les fermentations microbiennes du rumen vers le gros intestin. D'après Murray (1976), le méthane produit dans le gros intestin représente 13 % de la production totale chez des moutons à l'entretien nourris avec de la luzerne hachée. Mais aucune mesure de ce genre n'a été réalisée chez les bovins.

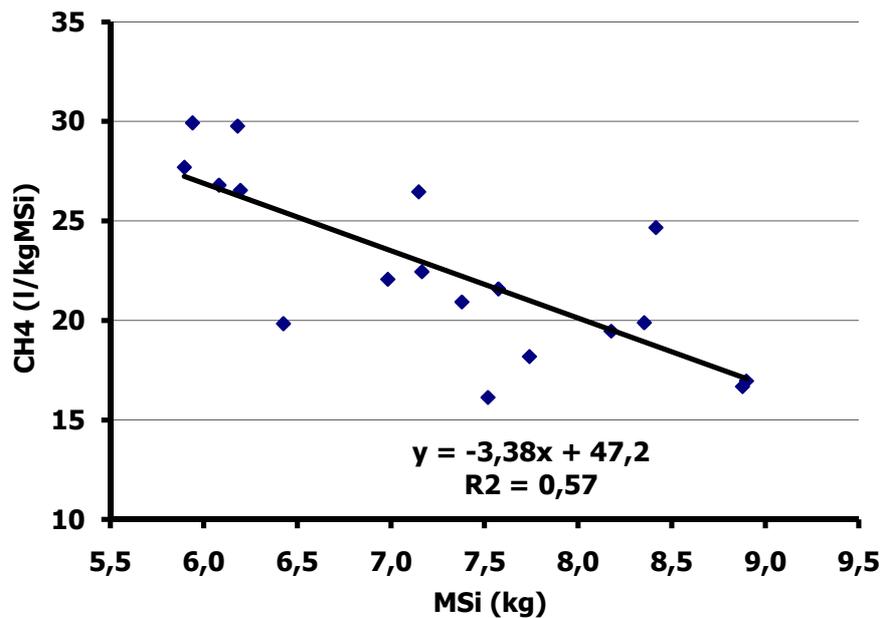


Figure 7 : Régression linéaire entre la production de CH₄ (l/kg MSi) et l'ingestion (kg MSi).

Nos résultats montrent cependant que la production de méthane exprimée par kg de MS ingérée diminue avec le niveau d'ingestion selon la relation *production de méthane* (l/kg MSi) = 47,2 - 3,38 × *ingestion* (kg MSi) ($p < 0,001$) (Figure 7). Cette diminution a déjà été mise en évidence par Blaxter et Clapperton (1962), Johnson et Johnson (1995) et Yan *et al.* (2001). Elle est également prévue par les modèles mathématiques de Benchaar *et al.* (2001).

c) Réduction de la fréquence d'échantillonnage

Lors du chapitre précédent, il était proposé de réduire la fréquence d'échantillonnage en suivant divers scénarios. Trois de ceux-ci, qui permettraient de réduire les échantillons à huit par animal, ont été testés sur les résultats obtenus lors de cette expérience-ci. Pour rappel, ils consistaient à supprimer les échantillons 3 - 5 - 7 - 11, 3 - 5 - 8 - 10 ou 3 - 5 - 8 - 11. Or, chacune de ces combinaisons entraîne une sous-estimation significative pour au moins une des moyennes, celles-ci allant de 6 à 10 % de la moyenne.

Par contre, la suppression des échantillons n° 4 et 6, accompagné du remplacement de l'échantillon n° 12 par le n° 1 (4, 6, 12→1) semble intéressant. En effet, si on reprend les données de l'expérience précédente, cela donne une sous-estimation non significative de la moyenne de 0,8 % ($t_{\text{obs}} = 1,58$; $t_{\text{th}} = 2,08$; $V = 12,6$ %). Quand aux moyennes de cette expérience, présentées dans le tableau ci-dessous, elles ne sont pas influencées significativement non plus, avec une faible influence sur la dispersion des valeurs (V).

Tableau 9 : Effet de la suppression des échantillons n° 4 et 6 et du remplacement de l'échantillon n° 12 par le n° 1 sur le calcul des valeurs moyennes de production de CH₄ (l/j) pour trois niveaux d'ingestion.

Combi. ⁽¹⁾	Ingestion (g/kg PM)	t_{obs} ($t_{\text{th}} = 2,571$) ⁽²⁾	\bar{d} (%)	V_0 ⁽³⁾ (%)	$V_{4,6,12\rightarrow 1}$ ⁽³⁾ (%)
4, 6, 12→1	55	0,68	-0,4	11,0	10,3
	65	0,54	-0,4	12,7	12,8
	75	1,51	-2,1	13,5	13,2

⁽¹⁾ Combi. : numéro des échantillons non utilisés pour le calcul de la production de méthane journalière.

⁽²⁾ t_{obs} : valeurs t de Student à comparer avec t_{th} ; ⁽³⁾ Coefficient de variation avec 12 échantillons ;

⁽⁴⁾ Coefficient de variation avec 9 échantillons (n° 4 et 6 supprimés et n° 12 remplacé par le n° 1).

5.4. Conclusions

La méthode développée jusqu'ici a permis de mettre en évidence une relation, $\text{CH}_4 = 47,2 - 3,38 I$ (kg MSi) ($p < 0,001$), qui montre que la production de méthane (l/kg MSi) diminue lorsque l'ingestion des animaux augmente, ce qui est en accord avec les résultats présentés dans la littérature (Blaxter et Clapperton, 1962 ; Johnson et Johnson, 1995 ; Yan *et al.*, 2000 ; Benchaar *et al.*, 2001).

Nos calculs montrent aussi qu'une réduction de la fréquence d'échantillonnage risque de conduire à une mauvaise estimation de la production de méthane ruminal. Néanmoins, il est possible de supprimer deux échantillons en matinée, ainsi que de substituer le premier et le dernier échantillon de la série puisqu'ils correspondent tous les deux à un même moment du cycle de fermentation lié à la distribution des repas. La suppression de ces échantillons se fait au bénéfice du bien-être des animaux et représente un gain de temps pour d'autres postes de travail.

6. Evaluation de l'influence de la teneur en amidon de la ration sur la production ruminale de méthane chez le taurillon BBB culard

6.1. Introduction

Il existe plusieurs moyens pour diminuer la production de méthane par les ruminants. Outre l'utilisation d'additifs (type Monensin) ou de lipides dans la ration et le traitement des fourrages (hachage et pelletage), une autre voie possible est l'utilisation de concentrés riches en amidon. En effet, le type de glucide (fibres, amidon, pectines,...) fermenté influence la production de méthane, probablement via un effet sur le pH ruminal et la population microbienne. Ainsi, la complémentation ou la substitution de fourrage avec du concentré riche en amidon se traduit souvent par une diminution de la production de méthane. Bien que l'ensilage de pulpes de betterave surpressées ne soit pas un fourrage en soit, nous avons voulu tester l'effet d'un remplacement de cet ensilage par des concentrés, dont de l'épeautre qui contient environ 40 % d'amidon.

6.2. Méthodologie

a) Animaux

L'expérience est conduite sur trois taurillons en croissance ($314,2 \pm 4,6$ kg) munis préalablement d'une canule permanente au niveau du rumen. L'expérimentation est divisée en trois périodes comprenant à chaque fois une période d'adaptation au régime de 21 jours (14 jours en box paillés individuels + 7 jours en stabulation entravée). Celle-ci est suivie d'une période de mesure comprenant le bilan alimentaire, pendant lequel les animaux sont sur grille, ce qui permet la collecte des urines et la récolte quantitative des matières fécales (6 jours de prélèvement) ; ensuite, les taurillons restent 9 jours en stabulation entravée pour mesurer la méthanogenèse ruminale (6 jours de prélèvement) et mesurer le pH de la phase liquide du rumen (1 jour). Les animaux ont, à tout moment, accès à de l'eau de boisson.

b) Régimes

Les trois régimes testés sont constitués en faisant varier le rapport entre ensilage de pulpes de betterave surpressées et concentrés. Comme le montre le tableau 10, la différence principale entre les régimes réside dans leur teneur en amidon (13 à 281 g/kg MS), apportés par de l'épeautre aplati. Néanmoins, les trois compléments ont été formulés sur base des tables alimentaires (CVB, 2000), de manière à ce que les régimes soient iso-DVE (94 g/kg MS), iso-VEVI (1050 /kg MS) et iso-OEB (0 g/kg MS). Une certaine quantité de paille est également apportée afin d'apporter un peu de structure à la ration, et de réduire les risque d'acidose lactique. En effet, les pulpes de betterave peuvent induire cette pathologie de par leur richesse en glucides rapidement fermentescibles. Le détail de la composition des régimes est donné dans le tableau ci-dessous.

Tableau 10 : Composition centésimale, teneur en amidon et valeurs nutritionnelles (valeurs cibles) des trois régimes (g/kg MS, sauf indication contraire).

Composition centésimale	Régimes		
	A ^o	A ⁺	A ⁺⁺
Pulpes de betterave	657	446	236
Paille de froment	112	83	53
Mélanges concentrés			
Epeautre aplati	0	267	534
Tourteau de lin	117	96	75
Tourteau de tournesol	57	45	32
Luzerne (17 % MAT)	0	19	39
Huile	18	9	0
CMV (8 % Ca, 12 % P)	26	25	25
Urée	10	7	3
Sel de cuisine	3	3	3
Teneur en amidon et valeurs alimentaires (CVB, 2000)			
Amidon	13	147	281
VEVI (/kg MS)	1050	1050	1050
DVE	94	94	94
OEB	0	0	0

Les taurillons sont alimentés deux fois par jour à intervalle de 12 heures (8h30 et 20h30) à un niveau d'ingestion proche de l'*ad libitum* (75 g de MS/PM). L'ensilage de pulpes de betterave

surpressées est désilé chaque jour pour préparer les rations distribuées aux repas du soir et du lendemain matin. Les quantités d'ensilage distribuées sont ajustées et contrôlées quotidiennement, comme décrit au paragraphe 3.2.a. Les échantillons d'ensilage sont échantillonnés et cumulés par période de mesure. Lors de chaque réalisation des trois compléments d'aliments concentrés, ceux-ci sont échantillonnés de manière à obtenir des échantillons représentatifs pour la période considérée. Les échantillons sont conservés à température ambiante en laboratoire. Par après, ils sont moulus finement (Cyclotec, tamis de 1 mm) et analysés pour déterminer leurs teneurs en MS, MO, N, NDF et en énergie brute (EB) sont ensuite dosées suivant les méthodes classiques.

c) Bilan digestif et énergétique

Cette première phase est d'une durée de 6 jours pendant laquelle est mesurée la digestibilité fécale de la ration. Avant chaque repas et ce durant toute la période de mesure, les quantités de MS d'ensilage et de concentrés distribuées sont pesées précisément (cf. *infra* pour l'ensilage).

Le calcul des coefficients de digestibilité fécale nécessite la détermination de la quantité de MS excrétée quotidiennement dans les fèces et des teneurs en différents nutriments dans les fèces. Dans le but de quantifier le flux de MS fécale, de l'oxyde de chrome (Cr₂O₃), marqueur indigestible particulaire, est distribué aux animaux dans des gélules en gélatine directement introduite dans le rumen. Chaque animal reçoit quotidiennement deux gélules contenant précisément 3,5 g de Cr₂O₃ par kg de MS ingérée (moyenne sur les trois animaux). La distribution de Cr₂O₃ commence 5 jours avant le début du bilan et se prolonge jusqu'au dernier jour du bilan. Connaissant la quantité de Cr₂O₃ distribuée par jour (a g/j) et pouvant déterminer la concentration en Cr₂O₃ dans un échantillon de matière fécale (b g/g MS_{fécale}), le flux de MS fécale (MS_e) correspond donc au rapport entre ces deux dernières quantités (a/b g MS_{fécale}/j). La digestibilité fécale apparente de la MS (DF_{MS}) est alors calculée par :

$$DF_{MS} = 100 \times \left[1 - \frac{MS_e}{MS_i} \right]$$

où MS_i est la quantité de MS ingérée et MS_e celle excrétée. Les digestibilités des autres constituants de la ration sont obtenues en multipliant MS_i et MS_e par leur teneur respective en ces constituants (MO, MAT, EB ou NDF).

Les matières fécales émises sont quotidiennement récoltées (8h40) et échantillonnées après homogénéisation (5 % du poids frais), cumulées par animal et par période et conservées au congélateur à - 20 °C en attente de traitements ultérieurs. Après décongélation et homogénéisation, un sous-échantillon est lyophilisé et ensuite moulu finement (Cyclotec,

tamis de 1 mm). Les teneurs en MS, MO, MAT, NDF et en EB sont ensuite dosées suivant les méthodes classiques. Le dosage du Cr_2O_3 est réalisé selon la méthode mise au point par François *et al.* (1978).

d) Mesure de la méthanogenèse ruminale

À la fin du bilan, les animaux sont transférés sur tapis. Deux jours de transition sont prévus avant de commencer la mesure de la méthanogenèse (6 jours de prélèvement). Le premier prélèvement est réalisé juste avant la distribution du repas du matin (8h30 ; $t = 0$) et ensuite à 0,5 - 1 - 2 - 3 - 4 - 5,5 - 7 - 8,5 et 10 h.

Le débit d'éthane est augmenté à 22,5 ml/min (au lieu de 15 ml/min précédemment) suite à l'obtention de concentration en C_2H_6 trop faible dans certains échantillons lors des expériences précédentes. Lors de l'analyse en CPG, le calibrage est alors réalisé en utilisant deux seringues en verre étanches aux gaz de 25 et 50 μl (SGE, Australie). Ceci permet de déterminer des concentrations situées entre 0,6 et 15 % C_2H_6 .

Les volumes de méthane produits sont convertis en énergie (kJoules) en les multipliant par $(899 \text{ kJ/mol} / (16,043 \text{ g/mol} \times 1,48^* \text{ l/g}))$ (* volume spécifique du méthane à 1,01 atm et $21,1^\circ\text{C}$).

e) Mesure du pH de la phase liquide du rumen

Des prélèvements de phase liquide du rumen sont réalisés juste avant la distribution du repas du matin, ensuite à 1 - 2 - 3 - 4 - 6 - 8 et 10 h après sa distribution. L'échantillon est prélevé à l'aide d'une pompe à vide puis filtrée ($\varnothing = 0,250 \text{ mm}$) avant de mesurer le pH.

f) Analyse statistique

Par période, chaque taurillon reçoit un régime différent et sur l'ensemble de l'expérience, chaque taurillon reçoit les trois régimes.

L'analyse statistique est réalisée suivant un schéma en carré latin. Ces analyses sont réalisées avec le programme MINITAB v.13.2, en utilisant le modèle linéaire généralisé, selon une ANOVA 3 à un facteur fixe (régime) et deux facteurs aléatoires (animal et période).

La structuration des moyennes est réalisée selon la méthode de Newman et Keuls (Dagnelie, 1975).

6.3. Résultats et discussion

a) Composition chimique des aliments

La composition chimique (matière sèche, matière organique, matières azotées totales, parois cellulaires et énergie brutes) des aliments et concentrés distribués aux animaux est présentée dans le tableau 11.

Tableau 11 : Teneur en MS (g/kg MF) et composition moyenne des aliments distribués (g/kg MS).

Constituants	Pulpes de betterave	Mélanges concentrés ⁽¹⁾			Paille de froment
		A ⁰	A ⁺	A ⁺⁺	
MS	216	919	911	903	939
MO	900	883	907	938	946
MAT	97	382	281	160	25
NDF	341	191	233	290	803
EB (MJ/kg MS)	16,52	19,73	18,88	18,29	18,32

⁽¹⁾ A⁰, A⁺ et A⁺⁺ contiennent, respectivement, 13, 143 et 281 g d'amidon/kg MS (teneurs théoriques).

Tableau 12 : Taux d'incorporations des aliments dans les régimes et composition moyenne théorique (g/kg MS).

Aliments	Régimes ⁽¹⁾		
	A ⁰	A ⁺	A ⁺⁺
Pulpes de betterave	637	426	221
Mélange de concentrés	243	487	724
Paille de froment	120	88	55
MO	902	908	930
MAT	158	180	139
NDF	360	329	330
EB (MJ/kg MS)	17,52	17,31	17,17

⁽¹⁾ A⁰, A⁺ et A⁺⁺ contiennent, respectivement, 13, 143 et 281 g d'amidon/kg MS (teneurs théoriques).

Par ailleurs, le tableau 12 présente la composition théorique des régimes sur base de la composition des aliments et des taux d'incorporation utilisés en cours d'expérience.

b) Mesure du pH dans la phase liquide du rumen

Comme l'illustre bien la figure qui suit, le pH diminue fortement dans les trois premières heures qui suivent la distribution du repas avant de remonter, ce qui est classiquement présenté dans la littérature.

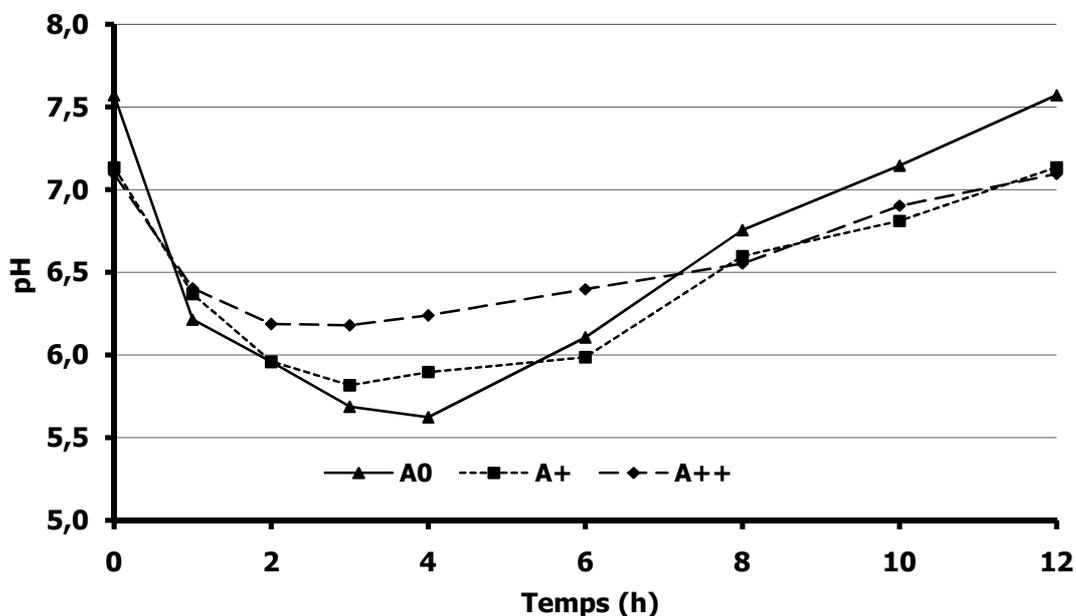


Figure 8 : Evolution du pH moyen de la phase liquide du rumen en fonction du régime.

Tableau 13 : Evolution moyenne du pH de la phase liquide du rumen dans les heures postprandiales et pH moyen pour les trois régimes.

Régimes ⁽¹⁾ \ Temps (h)	0	1	2	3	4	6	8	10	pH moyen
A°	7,57	6,21	5,96	5,69	5,62	6,11	6,76	7,15	6,47
A ⁺	7,13	6,37	5,96	5,82	5,90	5,99	6,60	6,81	6,37
A ⁺⁺	7,09	6,40	6,19	6,18	6,24	6,40	6,55	6,90	6,54
SEM ⁽²⁾	0,13	0,06	0,06	0,10	0,11	0,12	0,09	0,10	0,07

⁽¹⁾ A°, A⁺ et A⁺⁺ contiennent, respectivement, 13, 143 et 281 g d'amidon/kg MS (teneurs théoriques) ; ⁽²⁾ Erreur standard de la moyenne.

Le tableau 13 présente les valeurs de pH de la phase liquide du rumen obtenue dans les heures postprandiales ainsi que les valeurs moyennes sur l'ensemble de la période de mesure. Vu l'utilisation importante de pulpes de betterave et/ou d'épeautre (riche en amidon), il était possible que les régimes distribués entraînent des problèmes d'acidose. Or, les pH moyens des trois régimes sont supérieurs de 6,25, seuil en dessous duquel il ne faut pas descendre selon Sauvante *et al.* (1999) pour éviter l'acidose latente. Néanmoins, certains animaux ont sans doute été sujets à une acidose de manière temporaire. En effet, deux animaux ont

présenté une formation de mousse importante avec le régime A⁺ (soit environ 45 % de pulpe et 26 % d'épeautre) lors des périodes 2 et 3.

Il existe une étroite relation entre le pH et la concentration en AGV (Stokes *et al.*, 1991). Or, il est connu que les pulpes de betterave entraînent une production importante d'AGV. Ainsi, d'après Moloney *et al.* (2001), la concentration en AGV dans le jus de rumen de taurillons nourris à base de foin et de concentrés (15:85) est la même que les concentrés soient des pulpes de betterave déshydratées (74,4 mmol/l) ou de l'orge aplati (74,5 mmol/l). Les résultats du tableau 13 montrent, même s'il n'y a pas de différence significative, que les pulpes de betterave ont tendance à faire descendre le pH plus bas que l'épeautre. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les grains d'épeautres sont entourés par des enveloppes qui limitent l'accès des micro-organismes à l'amidon. De ce fait, la dégradation en serait plus lente et mieux répartie dans le temps et la diminution de pH plus faible que ce qui pourrait s'observer avec des céréales tels que le froment ou du maïs concassé dont l'amidon est directement accessible aux micro-organismes.

c) Ingestion, production de méthane et digestibilité

Tableau 14 : Ingestion (Xi), digestibilités fécales (DF_x) et production de méthane (CH₄) moyennes des trois régimes (en %).

	n	Régimes ⁽¹⁾			SEM ⁽²⁾	Effets ⁽³⁾	
		A ^o	A ⁺	A ⁺⁺		Régime	Animal
MSi (kg/j)	54	6,02 ^c	6,15 ^b	6,40 ^a	0,02	***	***
MOi (kg/j)	54	5,42 ^c	5,57 ^b	5,96 ^a	0,02	***	***
NDFi (kg/j)	54	2,14 ^a	1,99 ^b	2,11 ^a	0,01	***	***
EBi (MJ/j)	54	105,0 ^c	109,3 ^b	114,7 ^a	0,3	***	***
CH ₄ (l/j)	48	201,1 ^b	198,4 ^b	244,5 ^a	6,9	***	***
CH ₄ (l/kg MSi)	48	33,2 ^b	32,4 ^b	38,5 ^a	1,1	***	***
CH ₄ (l/kg MOi)	48	36,8 ^b	35,6 ^b	41,4 ^a	1,2	**	***
CH ₄ (% EBi)	48	7,2 ^b	6,9 ^b	8,1 ^a	0,2	**	***
MSi (g/kg PM)	9	70,0	71,4	74,3	0,6	0,063	0,314
DF _{MS}	9	82,9	83,7	83,6	0,3	0,328	0,265
DF _{MO}	9	86,2	86,4	85,2	0,3	0,233	0,148
DF _{NDF}	9	83,5 ^a	79,6 ^b	75,4 ^c	0,8	*	0,148
DF _{EB}	9	84,2	84,9	84,0	0,4	0,373	0,214
CH ₄ (l/kg MSD) ⁽⁴⁾	9	39,0	38,7	45,3	4,4	0,589	0,293
CH ₄ (l/kg MOD) ⁽⁵⁾	9	41,7	41,4	47,7	4,7	0,629	0,292
CH ₄ (% EDi) ⁽⁶⁾	9	8,3	8,1	9,5	0,9	0,595	0,288

⁽¹⁾ A^o, A⁺ et A⁺⁺ contiennent, respectivement, 13, 143 et 281 g d'amidon/kg MS (teneurs théoriques) ; ⁽²⁾ Erreur standard de la moyenne ; ⁽³⁾ *** p ≤ 0,001 ; ** p ≤ 0,01 ; * p ≤ 0,05 ; ⁽⁴⁾ Litre de CH₄ par kg de matière sèche digérée ; ⁽⁵⁾ Litre de CH₄ par kg de matière organique digérée ; ⁽⁶⁾ % de l'énergie digérée ; ^{a, b} Au sein d'une même ligne, les moyennes suivies d'une lettre différente sont significativement différentes (p ≤ 0,05).

Les différents résultats obtenus au cours de la mesure de la méthanogenèse ruminale (ingestion et CH₄) ainsi que lors du bilan alimentaire (digestibilités) sont repris dans le tableau 14.

Ces résultats montrent qu'ils existent des différences significatives entre les régimes au niveau des paramètres d'ingestion (MSi, MOi, NDFi, EBi). Plusieurs facteurs en sont à l'origine. Tout d'abord, la méthode d'évaluation de la teneur en MS des pulpes de betterave a induit une surestimation systématique de cette teneur (environ 0,6 point de MS). Ensuite, deux animaux ont laissé des refus aux cours des périodes 2 et 3, généralement plus riches en NDF que la ration distribuée (proportion importante de paille). Enfin, la proportion de ces refus par rapport à la MS distribuées a augmenté d'une période à l'autre.

Il est intéressant de constater que la production ruminale de méthane (l/j) est corrélée avec les quantités de MS, de MO et de fibres (NDF) ingérées (0,46 - 0,51 - 0,47 respectivement ; $p \leq 0,001$), ainsi qu'avec l'énergie brute ingérée (0,43 ; $p \leq 0,01$). Ces résultats sont semblables à ceux de Boadi et Wittenberg (2001), qui ont observé une faible corrélation (0,37) entre production de méthane (l/j) et ingestion (MSi) lorsque les animaux sont alimentés de manières restreintes. Mais cela n'explique que faiblement les productions de méthane observées.

Contrairement à ce qui est observé lorsqu'un fourrage est substitué avec des concentrés riches en amidon, nos résultats montrent que l'apport de concentrés entraîne une augmentation de la production de méthane.

Classiquement, l'apport d'amidon influence la production de méthane par deux voies. Tout d'abord, la fermentation de l'amidon influence les profils des fermentations microbiennes en favorisant la production de propionate au détriment de l'acétate, ce qui libère moins d'hydrogène (H_2) dans le rumen et donc diminue la production de méthane. Par ailleurs, l'amidon favorise une diminution du pH ruminal. Or, Russell (1998) et Lana *et al.* (1998) ont montré lors de fermentation *in vitro* que la diminution artificielle du pH du milieu de culture faisait également diminuer la production de méthane.

Bien que les pulpes de betteraves ne contiennent pas d'amidon, elles peuvent influencer la production de méthane de manière semblable car elles conduisent à une production rapide et importante d'AGV (effet sur le pH), dont une part importante d'acide propionique.

En outre, les courbes de production de méthane, obtenues à partir des relevés et présentées à la figure 9, montrent bien que la production de méthane devient significativement ($p \leq 0,05$) plus importante pour le régime A^{++} riche en amidon 4 heures après la distribution du repas (valeurs en annexe 2). Observation que l'on peut mettre en parallèle avec les courbes de pH (présentées au point b) et qui montre que le pH a tendance à être plus faible avec les régimes A^0 et A^+ aux alentours de la 3^e et de la 4^e heure postprandiale. Cette diminution du pH pourrait donc limiter le pic de production de méthane à ce même moment, ce qui se traduit par une diminution globale de la production journalière.

Il est important aussi de considérer que lors de cette expérience, les régimes distribués se distinguent en réalité peu du point de vue de la quantité d'hydrates de carbone de structure ingérée par les taurillons. Or classiquement, la substitution d'un fourrage riche en hydrates de carbone de structure par un aliment concentré riche en amidon conduit à diminuer la production de méthane.

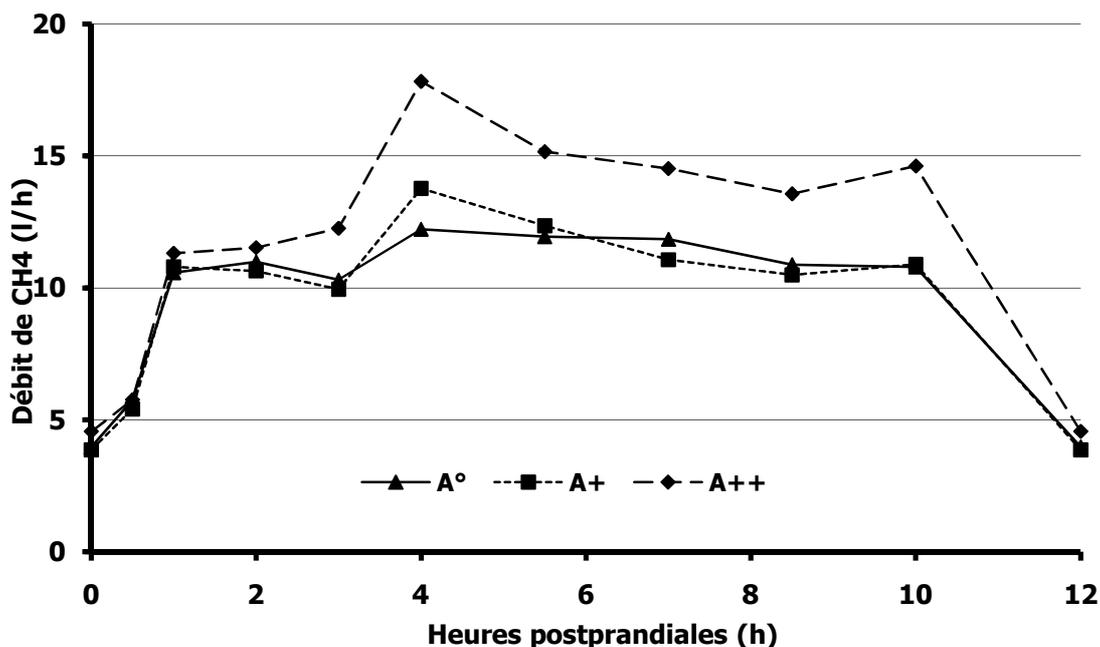


Figure 9 : Evolution moyenne de la production de méthane (l/h) dans le rumen en fonction des régimes distribués.

En ce qui concerne les digestibilités fécales apparentes (DF), seule celle de la fraction NDF (cellulose, hémicellulose et lignine) est influencée significativement ($p \leq 0,05$) par la composition du régime, ce qui s'explique probablement par le fait que les fibres des pulpes de betterave sont très fermentescibles. Par ailleurs, les valeurs de digestibilités fécales apparentes obtenues sont plus élevées que celles obtenues chez des taurillons BBBC par Lindebrings (2004) avec des rations semblables (55 % de pulpes de betterave surpressées, 20 % d'épeautre, 25 % autres concentrés). Les digestibilités moyennes étaient de 72,5 - 77,7 - 73,5 pour la MS, la MO et le NDF respectivement. Il y a également une grande différence entre les niveaux d'ingestion (71,9 contre 80,7 g MS/kg PM en moyenne), ce qui explique sans doute les différences de digestibilité. En effet, l'augmentation du niveau d'ingestion se traduit par une diminution du temps de séjour des aliments dans le rumen, ce qui laisse moins de temps aux micro-organismes pour les dégrader.

6.4. Conclusions

Lors de cette expérience, trois régimes (A° , A^{+} et A^{++}) à teneurs croissantes en amidon ont été testés et ont fait l'objet de mesures afin de quantifier la méthanogenèse ruminale. Au cours de celle-ci, nous avons montré que la substitution de l'ensilage de pulpes de betterave surpressées par des concentrés (dont de l'épeautre riche en amidon) se traduit par une augmentation de la production de méthane. Cette augmentation de production est corrélée

avec l'ingestion mais pourrait aussi s'expliquer par une diminution plus importante du pH suite à l'ingestion des pulpes de betterave par les taurillons. Cette diminution pourrait limiter le pic de production de méthane dans les heures qui suivent le repas et par conséquent, la production journalière de méthane. Par ailleurs, l'effet de l'amidon présent dans la ration A⁺⁺, qui habituellement induit une diminution du pH et de la production de méthane, a pu être limité suite à la protection des grains d'épeautre à l'intérieur des enveloppes florales.

7. Discussion générale des résultats obtenus pour l'évaluation de la production ruminale de méthane

Les résultats obtenus au cours de ce projet, ainsi que ceux publiés dans différents articles sont repris dans les tableaux 14 et 15. Comme, on peut le constater, au sein même de ce projet les résultats obtenus au chapitre 4 et 5 sont fort différents de ceux obtenu au chapitre 6. Il est difficile de savoir d'où proviennent ces différences, puisque les animaux sont toujours de la même race, nourris avec des rations à base d'ensilage de pulpes de betteraves surpressées complémentées avec des concentrés et de la paille. Néanmoins, la figure 10 peut apporter un certain nombre de pistes.

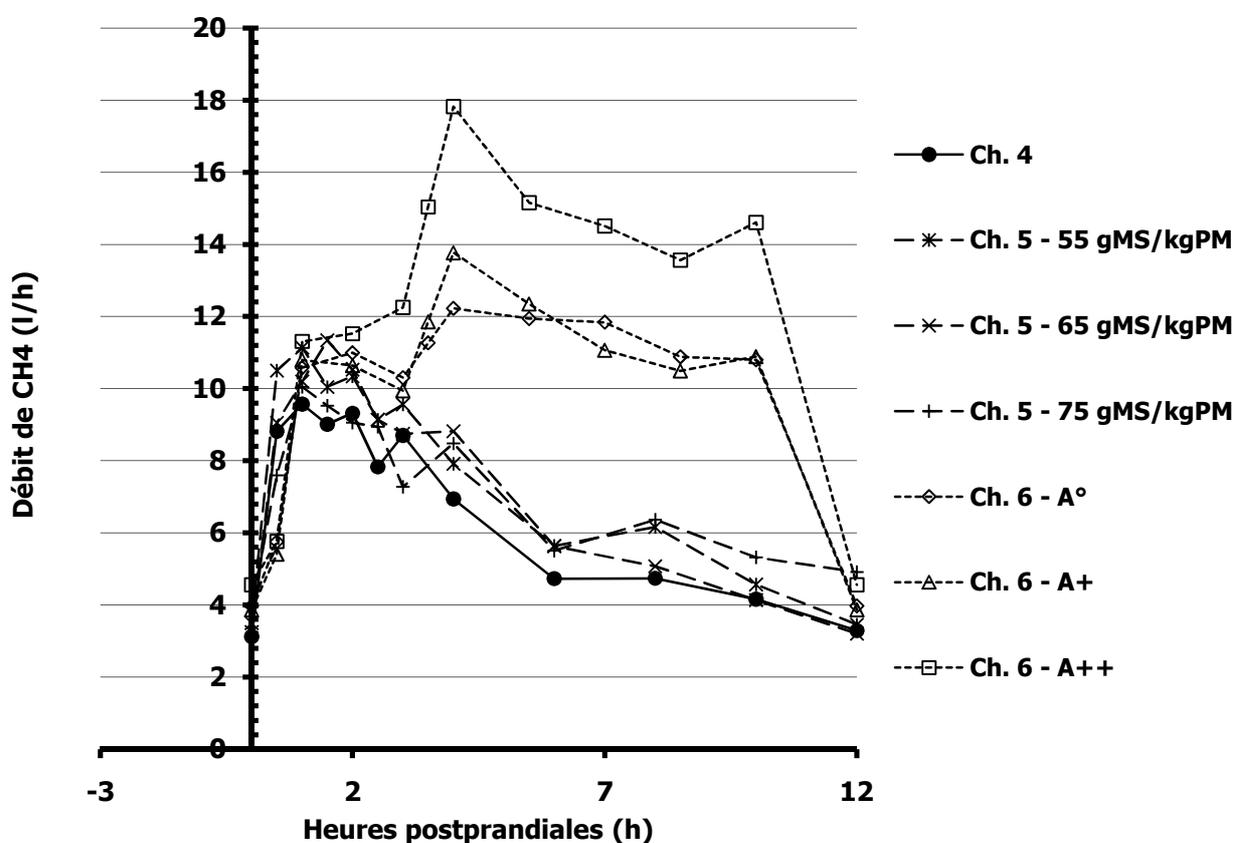


Figure 10 : Profils moyens de production de méthane obtenus aux cours des expériences présentées aux chapitres 4, 5 et 6.

En effet, ces courbes montrent qu'au cours de l'expérience présentée au chapitre 6, le rumen des taurillons BBBc présente très nettement une production importante de méthane au-delà de la 3^e heure après la distribution du repas, contrairement à ce qui a été mesuré au cours des expériences précédentes (Ch. 4 et 5).

Deux éléments pourraient expliquer ce phénomène. Tout d'abord, la nature des concentrés distribués. En effet, les concentrés distribués étaient soit du concentré commercial (JB25,

SCAM, Belgique) présentés en bouchon et préparé à partir d'aliments préalablement broyés (Ch. 4 et 5), soit un mélange de concentrés plus grossiers (épeautre aplati, tourteau de tournesol et de lin, principalement). Or, la taille des aliments distribués influence leurs dégradabilité dans le rumen, donc la production potentielle de méthane. Par ailleurs, les quantités de paille hachée distribuées étaient différentes : 2,5 % (Ch. 4 et 5) contre 5,5 à 12 % de la MS distribuées (Ch. 6). Outre le fait que la paille est un aliment qui induit une production importante de méthane, celle-ci a pu influencer la manière dont les animaux ont ingéré leurs repas, en provoquant un étalement de l'ingestion sur la journée. A cela vient s'ajouter le fait que les animaux ont été habitués lors des premières expériences (Ch. 3, 4 et 5) à ingérer leur ration en un temps limité, contrairement à la dernière expérience (Ch. 6).

Il est délicat de comparer les résultats obtenus dans ce projet avec ceux de la littérature. En effet, il faudrait pouvoir prendre en compte la production de méthane provenant du gros intestin. Pour rappel, d'après Murray *et al.* (1976), cette fraction correspond à 13 % de la production totale chez le mouton à l'entretien. De cette manière, la comparaison des résultats avec la littérature serait plus correcte.

Lors des expériences présentées aux chapitres 4 et 5, la production de méthane (l/j) obtenue est inférieure à celles présentées dans les tableaux suivants pour des animaux de poids comparables. Une fois exprimée par rapport à la matière sèche ingérée (MSi), les résultats sont comparables aux résultats de McCaughey *et al.* (1997) pour des taurillons aux pâturages. Il en est de même avec les résultats obtenus par Lovett *et al.* (2003) pour des génisses à l'engraissement recevant 90 % de concentrés (à base d'orge). Par contre, ces mêmes résultats sont nettement inférieurs aux autres valeurs de la littérature.

En ce qui concerne les résultats présentés au chapitre 6, la production de méthane (l/kg MSi) est semblable ou supérieure aux résultats présentés par la littérature. Mais il faut tenir compte du fait que l'ingestion de taurillons a été restreinte. Or, il est connu (Blaxter et Clapperton, 1964 ; Johnson et Johnson, 1995, e.g.), et cela a été montré dans ce projet (chapitre 5), que la quantité de méthane émise par unité d'ingestion (MSi, MOi ou EBi) est réduite lorsque le niveau d'ingestion augmente. Et il est possible de l'augmenter facilement, puisque les taurillons BBbc peuvent atteindre un niveau d'ingestion de 85 voire 90 g MS/kg PM.

Ces résultats mettent cependant en avant le danger d'employer des données de production de méthane obtenue dans un cadre alimentaire différent.

Tableau 15 : Résultats obtenus pour diverses expériences de mesure de la méthanogène.

Expérience	Méthode de mesure	Animaux	Alimentation	Poids moyen	GQM (kg/j) ⁽¹⁾	Ingestion (kg MS/j)	Ingestion (gMSi/kg PM)	CH ₄ (l/j)	CH ₄ (l/kg MSi)	CH ₄ (%EBi)	
Chapitre 4	C ₂ H ₆	Taurillons BBBc	Pulpes de betterave + concentrés + paille	523	1,75	7,29	67,2	138	18,9		
Chapitre 5	C ₂ H ₆	Taurillons BBBc	Pulpes de betterave + concentrés + paille	535		6,12	55,0	163,4	26,8		
			Trois niveaux d'ingestion testés	535		7,30	65,6	157,2	21,6		
				535		8,41	75,6	162,1	19,3		
Chapitre 6	C ₂ H ₆	Taurillons BBBc	Pulpe de betterave	13 g amidon/kg MS	380,3	1,48	6,02	70,0	201,1	33,2	7,2
			+ paille	143 g amidon/kg MS	381,3	1,31	6,15	71,4	198,4	32,4	6,9
			+ concentrés	281 g amidon/kg MS	381,5	1,30	6,38	74,3	247,0	39,1	8,3
McCaughey <i>et al.</i> (1997)	SF ₆	Taurillons	Alimentation pâturage rotation	au Densité élevée	391,5	1,26	14,94	169,7*	263,8	17,7*	4,1
				en Densité faible	417,1	1,29	13,61	147,5*	280,1	20,6*	4,3
			Alimentation pâturage continu	au Densité élevée	380,1	1,07	13,51	156,9*	242,2	17,9*	4,4
				Densité faible	402,6	1,48	13,20	146,9*	306,7	23,2*	5,2
Boadi <i>et al.</i> (2001)	SF ₆	Taurillons Angus	Red Pâturage luzerne + brome	Sans orge	344		11,1	139,0*	310,5	30,8	6,7
				Avec orge	344		12,9	161,5*	331,2	29,4	6,4
Boadi <i>et Wittenberg</i> (2001)	SF ₆	Holstein et Charolais Simmenthal	3 foins hachés de × digestibilités différentes (ingestion restreinte)	Elevée (foin légumineuse/herbe)	310		6,4	86,6*	224,6	35,1*	7,6
				Moyenne (herbe)	310		6,1	82,6*	193,3	31,7*	7,1
				Faible (herbe)	310		6,1	82,6*	195,6	32,1*	7,1
Lockyer (1997)	Tunnel en polythène	Veaux Frison Hereford	× Pâturage de L. perenne		150			115,1			
					190			122,2			
					190			93,5			

* valeurs calculées sur base des valeurs moyennes fournies dans l'article.

Tableau 16 : Résultats obtenus pour diverses expériences de mesure de la méthanogenèse (suite).

Expérience	Méthode de mesure	de Animaux	Alimentation	Poids moyen	GQM (kg/j) ⁽¹⁾	Ingestion (kg MS/j)	Ingestion (gMSi/kg PM)	CH ₄ (l/j)	CH ₄ (l/kg MSi)	CH ₄ (%EB)	
Chapitre 4	C ₂ H ₆	Taurillons BBBc	Pulpes de betterave + concentrés + paille	523	1,75	7,29	66,9	138	18,9		
Chapitre 5	C ₂ H ₆	Taurillons BBBc	Pulpes de betterave + concentrés + paille	535		6,12	55,0	163,4	26,8		
			Trois niveaux d'ingestion testés	535		7,30	65,6	157,2	21,6		
				535		8,41	75,6	162,1	19,3		
Chapitre 6	C ₂ H ₆	Taurillons BBBc	Pulpe de betterave + 13 g amidon/kg MS	380,3	1,48	6,02	70,04	201,1	33,2	7,2	
			paille + concentrés								
			143 g amidon/kg MS	381,3	1,31	6,15	71,41	198,4	32,4	6,9	
			281 g amidon/kg MS	381,5	1,30	6,38	74,31	247,0	39,1	8,3	
Lovett <i>et al.</i> (2003)	SF ₆	Génisses Charolais en finition	Ensilage d'herbe + 65/35	462		6,9		207,0	30,9	6,1	
			concentrés (orge aplati) : 40/60	462		8,41		270,0	32,3	6,6	
			3 ratio testés 10/90	462		8,21		170,0	20,6	4,4	
Vermorel (1995)	Calorimétrie	Taurillon Frison	25 % foin + 75 % concentrés	350	1,12			140		6,1	
			22 % foin + 78% concentrés	450	1,12			210		6,8	
			20 % foin + 80 % concentrés	525	1,10			250		7,1	
		Taurillon Charolais	40 % foin + 60 % concentrés	265	1,10			130		5,6	
			60 % ensilage maïs + 40 % concentrés	620	0,86			285		7,3	

⁽¹⁾ Gain quotidien moyen (kg poids vif/j)

III. Conclusions

La réalisation de ce projet a permis de mettre en place un dispositif et une procédure pour mesurer la méthanogenèse ruminale. Cette procédure, inspirée des travaux de Moate *et al.* (1994), et déjà adaptée en partie en Belgique sur des moutons par Fievez (2002), consiste à perfuser en continu un gaz traceur (éthane ou C₂H₆) dans le rumen de taurillons BBBc et à échantillonner la phase gazeuse du rumen afin de calculer le débit de méthane par la relation $\text{Débit CH}_4 = \text{Débit C}_2\text{H}_6 \times (\text{concentration CH}_4 / \text{concentration C}_2\text{H}_6)$.

Après des tests préliminaires et la mise en place d'un dispositif d'échantillonnage adapté, des tubes Vacutainer® en verre sous vide partiel (Becton Dickinson) ont été retenus pour procéder à la prise d'échantillon de gaz du rumen, qui sont ensuite analysés par chromatographie en phase gazeuse. Après avoir fixé un débit de perfusion du gaz traceur (15 ml/min.) et testé les possibilités d'échantillonnages, cette procédure a été appliquée dans une première petite expérience visant à mesurer l'effet du niveau d'ingestion (55, 65, 75 g MS/kg PM) sur la production ruminale de méthane. Ceci nous a permis de mettre en évidence une relation (CH_4 (l/kg MSi) = 47,2 - 3,38 MSi (kg) ; $p < 0,001$; $r^2 = 0,57$) indiquant que la production de méthane, exprimée par rapport à la matière sèche ingérée (MSi), diminue lorsque l'ingestion augmente. Le même type de relation a déjà été mis en évidence à plusieurs reprises dans la littérature.

Enfin, cette même méthode a été mise en œuvre afin de mesurer la méthanogenèse ruminale sur des taurillons BBBc lorsque ceux-ci reçoivent des rations à base d'ensilage de pulpes de betterave surpressées et de concentrés en proportions variables. Trois rations (A°, A⁺, A⁺⁺) ont été constituées en substituant de l'ensilage de pulpes de betterave par des concentrés de manière à obtenir des teneurs croissantes en amidon (13, 143, 281 g amidon/kg MS respectivement). Les productions de méthane mesurées sont de 201,1 - 198,4 - 247,0 litres par jour respectivement. La meilleure corrélation est obtenue avec la matière organique ingérée (0,51 ; $p \leq 0,001$). Mais cela n'explique que partiellement les résultats obtenus. Il est probable que la production ruminale de méthane ait été influencée par le pH ruminal, plus faible avec les régimes A° et A⁺. Ceci aurait limité le pic de production de méthane qui suit l'ingestion de la ration et par conséquent la production journalière de méthane.

Nonobstant, nos résultats montrent que la substitution d'un fourrage très digestible par un aliment riche en amidon ne diminue pas la production de méthane chez le ruminant.

IV. Références bibliographiques

- Benchaar C., Pomar C. and Chiquette J., 2001. Evaluation of dietary strategies to reduce methane production in ruminants: A modelling approach. *Canadian Journal of Animal Science*, 81: 563-574.
- Boadi D.A. and Wittenberg K.M., 2001. Methane production from dairy and beef heifers fed forages differing in nutrient density using the sulphur hexafluoride (SF₆) tracer gas technique. *Canadian Journal of Animal Science*, 82: 201-206.
- Boadi D.A., Wittenberg K.M. and McCaughey W.P., 2001. Effects of grain supplementation on methane production of grazing steers using the sulphur (SF₆) tracer gas technique. *Canadian Journal of Animal Science*, 82: 151-157.
- Chynoweth D.P., 1996. Environmental impact of biomethanogenesis. *Environmental Monitoring and Assessment*, 42: 3-18.
- CVB, 2000. Veevoedertabel. Centraal Veevoeder Bureau, Lelystad, the Netherlands.
- Dagnelie P., 1975. *Théorie et méthodes statistiques. Vol.2*. Les Presses Agronomiques de Gembloux, 463 p.
- Fievez V., 2002. Optimisation of rumen methanogenesis and nitrogen utilisation: a contribution to environmental care. Thèse de doctorat, Ghent University, 191 p.
- François E., Thill N. et Théwis A., 1978. Méthode rapide de dosage de l'oxyde de chrome dans les aliments, les fèces et les contenus digestifs par titrage après minéralisation nitroperchlorique. *Annales de Zootechnie*, 27 : 355.
- INS, 2004. http://statbel.fgov.be/downloads/cah2004m_fr.xls
- Kujawa M.A., 1994. *Energy partitioning in steers fed cottonseed hulls and beet pulp*. Ph. D. dissertation. Colorado State University, Fort Collins.
- Kyoto, 1997. *Protocole de Kyoto à la Convention cadre des Nations – Unies sur les changements climatiques*. <http://unfccc.int/resource/docs/convkp/kpfrench.pdf>
- Lana R.P., Russell J.B. and Van Amburgh M.E., 1998. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *Journal of Animal Science*, 76: 2190-2196.
- Lindebrings A., 2005. Influence d'un déficit en azote dégradable dans le rumen sur l'ingestion volontaire et le métabolisme azoté de taurillons BBBc alimentés à base d'un ensilage de pulpes de betteraves surpressées. (Mémoire de fin d'étude.) FUSAGx, Gembloux, Belgique. 93 p.

- Lockyer D.R., 1997. Methane emissions from grazing sheep and calves. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 66: 11-18.
- Lovett D., Lovell S., Stack L., Callan J., Finlay M., Conolly J., O'Mara F.P., 2003. Effect of forage/concentrate ratio and dietary coconut oil level on methane output and performance of finishing beef heifers. *Livestock Production Science*, 84:135-146.
- McCaughey W.P., Wittenberg K. and Corrigan D., 1997. Methane production by steers on pasture. *Canadian Journal of Animal Science*, 77: 519-524.
- Moate P.W., Clarke T., Davis L.H., Laby R.H., 1997. Rumen gases and bloat in grazing dairy cows. *Journal of Agricultural Science*, 129: 459-469.
- Moloney A.P., Woods V.B. and O'Mara F.P., 2001. *Characterisation of feedstuffs for ruminants*. End of project report.
<http://www.teagasc.ie////////research/reports/beef/4383/eopr-4383.htm>
- Murray R.M., Bryant A.M. and Leng R.A., 1976. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. *British Journal of Nutrition*, 36: 1-14.
- UNFCCC, 2005. Greenhouse Gas Inventories data base. <http://ghg.unfccc.int/>
- Russel J.B., 1998. The importance of pH in regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 81: 3222-3230.
- Sauvant D., Meschy F. et Mertens D., 1999. Les composantes de l'acidose ruminale et les acidogènes des rations. *INRA Productions Animales* 12 : 49-60.
- Stokes S.R., Hoover W.H., Miller T.K., Blauweikel R., 1991. Ruminal digestion and microbial utilisation of diets varying in type of carbohydrate and protein. *Journal of Animal Science* 74: 871-881.
- Van Soest P.J., 1982. *Limitations of ruminants*. In: Nutritional ecology of the ruminant. Ruminant metabolism, nutritional strategies, the cellulolytic fermentation and the chemistry of forages and plant fiber. Cornell University Press, Ithaca, NY, pp. 325-343.
- Vermorel M., 1995. Emissions annuelles de méthane d'origine digestive par les bovins en France. Variation selon le type d'animal et le niveau de production. *INRA Productions Animales*, 8 : 265-272.
- Yan T., Agnew R.E., Gordon F.J., Porter M.G., 2000. Prediction of methane energy output in dairy and beef cattle offered grass silage-based diets. *Livestock Production Science*, 64: 253-263.

V. Annexes

1. Les méthodes de dosage

1.1. Matière sèche, cendres totales et matière organique

Les teneurs en matière sèche (MSa) et en cendres totales (CT) sont mesurées par gravimétrie, après dessiccation complète à 105°C et après calcination à 550°C, respectivement. La teneur en matières organiques est de 100 - CT.

Pour les pulpes de betteraves surpressées, la teneur en MS est déterminée en deux étapes, soit par un premier séchage pendant 48 h à 60°C (MS_{60°C}) suivi de la dessiccation complète à 105°C. La MS réelle est alors $MSa \times MS_{60°C} / 100$.

1.2. Matières azotées totales

Les teneurs en matières azotées totales (MAT) sont calculées à partir des concentrations en azote (N) total dosées par la méthode de Kjeldahl en supposant qu'elles contiennent 16 % d'N. L'échantillon est minéralisé par H₂SO₄ concentrés (98 %) et bouillant (420°C) en présence d'H₂O₂ (30-35 %) et d'un catalyseur au titane-cuivre pendant une heure. L'ammoniac est ensuite déplacé par NaOH (30 %), entraîné à la vapeur vers une solution de réception standard et titré. Cette analyse est réalisée à l'aide d'un appareil automatique du type Kjeltex Auto Sampler System 1035 (Foss Tecator AB, SE).

1.3. Extrait éthéré

La matière grasse est extraite en continu et à froid à l'éther diéthylique avec un appareil de Soxhlet pendant 8 heures.

1.4. Constituants pariétaux

a) Neutral Detergent Fiber

Le résidu de parois cellulaires (Neutral Detergent Fiber : NDF) s'obtient après solubilisation, en milieu tamponné, du contenu cellulaire par l'action du détergent lauryl sulfate de sodium, d'une amylase, de Na₂SO₄ et d'un agent chélatant.

La fraction organique du résidu NDF est constituée théoriquement d'hémicellulose, de cellulose et de lignine. L'extraction est réalisée à l'aide du Fibercap System (Foss Tecator AB, SE) en suivant la note technique Foss Tecator ASN 3805 mais en appliquant deux traitements

pour l'extraction de l'amidon : 1° avec la Termamyl 300 1, type DX ((Foss Tecator), Kitcherside *et al.* (2000). *Animal Feed Science and Technology* 86: 125-132) et 2° avec la solution de Na₂SO₄ à 1 % (P/V).

b) Acid Detergent Fibre

Le résidu ligno-cellulosique (Acid Detergent Fiber ou ADF) s'obtient après solubilisation des hémicelluloses par l'acide sulfurique normal additionné d'un détergent qui permet de solubiliser le contenu cellulaire (protéines et graisses principalement). La fraction organique du résidu ADF est constituée théoriquement de cellulose et de lignine. L'extraction est réalisée en utilisant le Fibercap System (Foss Tecator AB, SE) en suivant la note technique Foss Tecator ASN 3804.

1.5. Energie brute

La teneur en énergie brute (EB) des échantillons est déterminée lors de la combustion complète d'une quantité connue d'échantillon dans une chambre adiabatique (Adiabatic Calorimeter 1241, Parr).

2. Evolution des débits moyens de production de méthane en fonction du régime distribué (annexe au chapitre 6)

	0	0,5	1	2	3	4	5,5	7	8,5	10
A°	4,0 ^b	5,8	10,6	11,0	10,3 ^b	12,2 ^b	11,9 ^b	11,8 ^b	10,9 ^b	10,8 ^b
A+	3,9 ^b	5,4	10,8	10,6	9,9 ^b	13,8 ^b	12,3 ^b	11,1 ^b	10,5 ^b	10,9 ^b
A++	4,6 ^a	5,8	11,3	11,5	12,3 ^a	17,8 ^a	15,2 ^a	14,5 ^a	13,6 ^a	14,6 ^a
SEM	0,16	0,32	0,66	0,63	0,50	0,73	0,66	0,63	0,59	0,73
p	**	0,594	0,803	0,577	**	***	**	***	**	***