



HAL
open science

Variations et estimation de la valeur protéique des sources azotées dans l'alimentation des vaches laitières

Florence Dufreneix

► **To cite this version:**

Florence Dufreneix. Variations et estimation de la valeur protéique des sources azotées dans l'alimentation des vaches laitières. Biologie animale. Agrocampus Ouest, 2019. Français. NNT : 2019NSARB322 . tel-02885897

HAL Id: tel-02885897

<https://theses.hal.science/tel-02885897>

Submitted on 1 Jul 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE

AGROCAMPUS OUEST
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 600
Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation
Spécialité : « *Biologie et physiologie animale* »

Par

« **Florence DUFRENEIX** »

« **Variations et estimation de la valeur protéique des sources azotées
dans l'alimentation de la vache laitière** »

Thèse présentée et soutenue à « Rennes », le « 2 juillet 2019 »

Unité de recherche : **Physiologie, Environnement et Génétique pour l'Animal et les Systèmes d'Elevage**

Thèse N° : 2019-12_B-322

Rapporteurs avant soutenance :

Nicolas Friggens
Pierre Nozière

Directeur de recherche, UMR MoSAR, AgroParisTech
Directeur de recherche, UMR Herbivore, INRA

Composition du Jury :

Président : Lucile Montagne
Examineurs : Corine Bayourthe
Christine Gérard
Dir. de thèse : Jean-Louis Peyraud
Co-dir. de thèse : Philippe Faverdin

Professeure, UMR PEGASE, Agrocampus Ouest
Professeur, UMR GenPhySE, ENSAT
Manager R&D ruminants, Néovia
Directeur de recherche, UMR PEGASE, INRA
Directeur de recherche, UMR PEGASE, INRA

Invité(s)

François Gautier

Formulateur, Agrial

Remerciements

A l'heure où j'écris ces lignes, le navire est arrivé à destination. Il a mouillé l'ancre dans une crique calme et profonde et ses passagers sont descendus à terre, vers de nouveaux horizons.

Traverser l'océan n'est jamais une chose aisée, beaucoup de marins vous le diront : il faut affronter les coups de vent quand ce n'est pas les tempêtes, l'ennui des jours sans vent, la houle plus ou moins clémente qui retourne les estomacs, l'horizon désespérément vide... Autant d'épreuves à affronter et à dépasser pour ne pas s'arrêter à la prochaine escale et laisser une aventure à moitié achevée. Et pourtant, l'attrait de l'océan est souvent plus fort et les marins repartent, non pas pour les difficultés qu'ils vont endurer mais pour la beauté des nuits étoilées, la magie des levées et des couchers de soleil, les merveilles de la nature allant des aurores boréales aux simples courses de dauphins avec la coque du bateau ou encore le plaisir de pouvoir revenir à terre et d'apprécier le chemin parcouru.

Ce manuscrit de thèse est en quelque sorte le carnet de bord de cette folle traversée en mer pour arriver aux termes de ces trois années de thèse. Il représente la synthèse des grandes étapes de cette traversée mais ne rapportent pas la diversité, le travail et l'implication des personnes présentes à bord pour faire avancer le navire à mes côtés. Or sans équipage, un capitaine ne peut pas aller bien loin, aussi à vous tous qui aviez contribué de très près ou de plus loin à la concrétisation de ce voyage, ces lignes suivantes vous sont dédiées et sachez que je vous remercie du fond du cœur pour avoir été près de moi pendant cette période.

A mon jury de thèse, Corine BAYOURTHE, Christine GERARD et Lucile MONTAGNE, derniers passagers embarqués sur le navire mais qui ont pu évaluer la trajectoire globale du périple. Plus particulièrement à mes deux rapporteurs, Nicolas FRIGGENS et Pierre NOZIERE, pour avoir relu dans le détail l'intégralité du carnet de bord et m'avoir autorisée à accoster dans le dernier port d'attache.

A mes directeurs de thèse, Jean-Louis PEYRAUD et Philippe FAVERDIN, seconds de ce navire que vous m'avez confié et aidé à commander tout le long, décidant des grands caps à prendre pour arriver à destination et vérifiant de temps en temps le bon fonctionnement du bâtiment. Vous m'avez laissé maître à bord et bien que ça m'ait fallu parfois quelques jours d'errance sur l'eau, je vous remercie pour la liberté et l'autonomie que vous m'avez

accordées. Par ailleurs, malgré la nombreuse flotte que vous avez à gérer de votre côté vous avez su être présents aux escales importantes de mon périple avec des conseils avisés et une relecture du carnet de bord à la fois efficace et pertinente.

A mon encadrant Agrial, François GAUTIER, troisième second de ce navire, apportant une analyse différente des vents, des courants et des cartes aussi bien dans la tourmente de la tempête que dans les accalmies, ce qui m'a très certainement aidée à maintenir le cap tout au long de ce périple. Tes talents ne sont pas limités à m'aider dans cette traversée mais m'ont en plus permis, lorsque je suis arrivée à ma destination finale, d'embarquer pour de nouveaux horizons sur le navire avec lequel je fais voile aujourd'hui.

Un commandant de bord peut rêver de grandes aventures et de destinations exotiques mais pour pouvoir aller au bout de ses rêves, il lui faudra un équipage accueillant, professionnel, ouvert, adaptable et j'en passe. Et quel équipage de choc j'ai eu !

A l'ensemble du personnel de la station expérimentale de Méjusseume qui œuvre au jour le jour pour que le navire qui les porte soit utilisable par tous. A Gaël BOULLET et David SIDANER pour la maîtrise parfaite du roulimètre et le suivi assidu des animaux. A toute l'équipe « physio » : Philippe LAMBERTON, Daniel CHEVREL, Jean-Luc HAREL, Jean-Yves THEBAULT, Adeline CHAUVIN et Maryvonne TEXIER auquel je peux ajouter Pierre-Yves PENNOBER qui ont écopés des litres et des litres d'eau à la recherche de particules de plastique, ont pris leur quart sur le pont pour assurer les prélèvements, se sont occupées de mes vaches (oui, à ce moment-là c'était les miennes) ou ont supporté leur capitaine, tout simplement !

A Thibaud LE MOUEL pour l'analyse des échantillons bien qu'il ne fût pas question d'entrer dans sa cabine au risque de perturber les analyses en cours ainsi que Nicole HUCHET pour ce magnifique et rigoureux travail.

A Colette MUSTIERE pour ton travail dans la mise en place de protocole et l'analyse d'échantillon mais aussi et surtout pour ton aide et ton soutien inconditionnels dans tous les autres domaines : nos échanges me manquent !

Aux vaches de Méjusseume, passagères imposées et nécessaires à la traversée, qui remplissent leur part de travail et qui nous permettent à tous de progresser et d'évoluer.

Un certain nombre d'autres passagers ont également côtoyés les ponts du navire, certains me prêtant main forte ou assistant l'équipage, d'autres contribuant à la vie à bord.

A l'ensemble de l'équipe Syslait, Nadège, Anne-Isabelle, Luc, Rémy, Yannick, Anne-Lise ainsi que les différents stagiaires pour les échanges et le soutien aussi bien scientifique que non scientifique et les sorties ou les soirées d'équipe. Vous avez contribué tant à l'élaboration de l'itinéraire et au maintien du cap qu'à la vie et la bonne humeur à bord. J'y ajoute Anne et Sophie qui bien que ne faisant pas parties de l'équipe ont également été régulièrement de passage à bord. Enfin, à Amélie et Alexia, qui ont travaillé dans le même poste de commande, chose pas toujours aisée, mais qui a permis un partage de joies et de pleurs nécessaire à notre humeur ainsi qu'à celle des différents équipages dont nous avons la charge.

A mon ancienne équipe de stage par qui tout à commencer, Fred, Laurence, Fred, Eric et Marie-Hélène : votre joie, votre bonne humeur et vos délires ont été une vraie bouffée d'air quand j'en avais besoin. Toutes mes félicitations à Laurence pour son doctorat, amplement mérité, tu as de plus toujours été de très bons conseils !

A Gilles, tuteur de cette thèse, dont les passages à bord ont été peu nombreux mais toujours utiles me permettant de prendre de la hauteur sur mon objectif et mon futur. J'ai beaucoup apprécié ton implication et nos échanges.

Aux doctorants, passés ou présents dans le cadre de cette traversée qui permettent toujours de se sentir un peu moins seule quand les temps sont difficiles et plus particulièrement à Cléo, Sophie, Hieu, Raphaël, Mélanie, Séverine et Nicolas.

A l'ensemble des personnes de UMR PEGASE et d'Agrocampus Ouest qui m'ont permis de faire ce voyage, vous avez tous apportés votre contribution d'une façon ou d'une autre.

Par ailleurs, toutes les semaines (ou presque !), montaient à bord en plus de François, Diane et Apolline dont la bonne humeur et la bonne ambiance me permettaient de sortir de mes cartes, mes réglages de voile et autres réparations ainsi que d'avoir un point vue différent sur la situation à bord. S'y ajoutait également régulièrement Thierry et Béatrice qu'il était difficile de manquer mais dont la présence faisait toujours du bien au moral. J'en profite pour remercier Ségolène pour avoir suivi ce projet ainsi que Denis, initiateur de ce voyage, et Jean-Pierre pour avoir pris le relai.

J'arrive au bout de la liste des personnes ayant passé du temps à bord et il me reste plus à remercier les personnes souvent éloignées de mon objectif de voyage mais qui ont le plus comptées dans la réalisation. J'aurais du mal à exprimer avec seulement quelques mots ce que votre présence à mes côtés m'apporté et a significé pour moi (et signifie toujours !).

Pour faire bref, je ne vous remercierai jamais assez, cette réussite est aussi la vôtre et je n'aurais sans doute pas atteint la destination finale sans vous : je vous aime !

A François, Colette et Laurence, déjà remerciés ci-dessus mais dont je souhaitais souligner l'importance au cours de ce périple.

Aux copains notamment Cervin et Nadège, pour n'avoir pas tout saisi de ce que voulait dire cette thèse pour moi et pour certains pour n'avoir même pas compris ma thématique.

Plus particulièrement, à Anaëlle et Aymeric pour m'avoir fait rire et penser à autre chose quelque soit mon état d'humeur tout en étant une oreille attentive quand le besoin se faisait sentir. A Katia, en première ligne de mes états émotionnels puisque située un étage au-dessus de moi. Nous n'étions jamais efficaces lorsque l'une de nous deux arrivait dans le bureau de l'autre mais ton soutien a été à toutes épreuves.

A Maïa (et par extension Doudoux), mon suricate globe-trotter, qui a toujours été présente, depuis l'instant où nous nous sommes connues et pour de très longues années encore. Ce périple n'a été qu'une des illustrations de ta générosité, de ton amour pour autrui, de ta motivation contagieuse, de ton bonheur et tes délires communicatifs. Vive les mariés, revenez-nous des étoiles plein les yeux <3

A Sandra et sa famille Antoine, Yuna et Bleuenn (bien que pas née à la fin de ma thèse mais en cours de conception ^^) qui malgré la distance a toujours répondu présente quand j'avais besoin de discuter et qui savait trouver les mots justes pour me faire avancer, relativiser ou me motiver comme seule une sœur peut le faire.

A Stéphane et sa famille Laurence et Ewen qui malgré des heures de sommeil déficitaires, m'ont accueillie à bras ouvert chez eux lorsque j'avais besoin de quitter le navire, y compris pendant la période de rédaction de thèse où, je le sais, je n'ai pas toujours été très facile à vivre. Vous m'avez fait penser à autre chose et prendre du recul ce qui a été inestimable.

A mes parents, pour être toujours là quand j'en ai besoin mais aussi quand tout va bien. Pour votre souci constant de mon bien-être bien que je sois grande, majeure et vaccinée. Votre présence à mes côtés a été comme un refuge contre les embruns qui m'a aidé à garder le cap quelque soit les circonstances.

Cadre de l'étude

Ce travail de thèse rentre dans le cadre d'un partenariat entre d'une part UMR PEGASE (Physiologie, Environnement et Génétique pour l'Animal et les Systèmes d'Elevage) de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) et Agrocampus Ouest et d'autre part la coopérative agricole Agrial (dispositif cifre de l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie).

Les essais réalisés au cours de ce travail de thèse ont été financé par le projet européen FEADER SOSPROTEIN porté par les régions Bretagne et Pays de la Loire et coordonné par le pôle de compétitivité Valorial.

Table des matières

Introduction Générale.....	1
Chapitre 1 – Synthèse bibliographique.....	9
1.1. Digestion des protéines et transformation des aliments dans le rumen.....	11
1.1.1. Digestion des protéines dans le rumen.....	11
1.1.2. Transformation physique des aliments au cours de la digestion dans le rumen.....	13
1.1.2.1. Rôle des fermentations ruminales sur la taille et la densité spécifique des aliments.....	13
1.1.2.2. Rôle de la mastication pendant l'ingestion et la rumination dans la réduction de la taille des particules alimentaires.....	16
1.1.2.3. Stratification des contenus dans le rumen en fonction de la taille et la densité spécifique des aliments.....	18
1.1.3. Influence des caractéristiques physiques des aliments sur leur digestion dans le rumen.....	19
1.1.3.1. Influence de la taille des particules sur la digestion des aliments dans le rumen.....	19
1.1.3.2. Réduction de temps moyen de séjour pour une gamme précise de densité spécifique des aliments.....	22
1.2. Devenir des protéines depuis leur arrivée dans l'intestin grêle jusqu'à leur sécrétion dans le lait.....	25
1.2.1. Digestion et absorption post-ruminale des protéines.....	25
1.2.1.1. Phénomènes de digestion des protéines dans les intestins.....	25
1.2.1.2. Variations des flux de protéines au duodénum avec les apports en azote ingéré.....	25
1.2.1.3. De l'absorption par la paroi intestinale jusqu'à la captation par la glande mammaire.....	27
1.2.2. Lois de réponses des AA et des protéines du lait aux apports en protéines métabolisables.....	29
1.2.2.1. Réponses des AA plasmatiques aux apports en protéines métabolisables.....	29

1.2.2.2.	Réponses des protéines du lait aux apports en protéines métabolisables....	32
1.3.	Références.....	34
Chapitre 2 – Questions et stratégie de recherche.....		43
Part 1 – Use of particles physical characteristics to reduce their mean retention time in the rumen.....		51
Chapter 3 – Influence of particle size and density on mean retention time in the rumen.....		53
Chapter 4 – Consequences of particles presentation on milk performances.....		71
Part 2 – Estimating feed protein value from biological responses.....		83
Chapter 5 – Materials and methods.....		85
Chapter 6 – Evaluation of amino acids duodenal flow to estimate feed protein value.....		99
Chapter 7 – Evaluation of plasmatic amino acids to estimate feed protein value.....		125
Chapter 8 – Evaluation of milk protein yield to estimate feed protein value.....		141
Chapitre 9 – Discussion générale.....		157
9.1.	Utilisation des caractéristiques physiques des particules pour moduler le temps de séjour dans le rumen.....	160
9.1.1.	La taille et la densité des particules de plastique influencent la valeur protéique alimentaire théorique des aliments.....	160
9.1.2.	Intégration de la dynamique d'évolution des propriétés physiques des particules dans le calcul des taux de dégradation et de TMS.....	165
9.1.3.	Etudier les conséquences de la taille des particules des matières premières et de leur granulation.....	166
9.1.4.	Du travail de recherche à l'innovation technologique.....	167
9.2.	Estimer la valeur protéique des aliments à partir des réponses biologiques des animaux.....	169

9.2.1.	Comparaison de la méthode <i>in vivo</i> et des méthodes basées sur les réponses biologiques des animaux pour estimer la valeur protéique des aliments.....	170
9.2.2.	Avantages et inconvénients de la réponse des AA plasmatiques et des matières protéiques du lait.....	176
9.2.3.	Application de la méthode pour estimer l'efficacité des additifs ou processus industriels visant à réduire la dégradabilité des aliments dans le rumen.....	179
9.3.	Références.....	181
	Conclusion Générale.....	183
	Annexes.....	187

Liste des abréviations

AA	Acides Aminés
AAADI	Acides Aminés Digestible dans l'Intestin
CB	Contrôle Bas
CH	Contrôle Haut
dr	digestibilité réelle
DAPA	Acide Diaminopimelique
DT	Dégradabilité Théorique
ET	Ecart Type
kct	Taux fractionnaire de transit des concentrés
kd	Taux de dégradation des aliments
kft	Taux fractionnaire de transit des fourrages
klt	Taux fractionnaire de transit de la phase liquide
kpt	Taux fractionnaire de transit de la phase solide
MAT	Matières Azotées Totales
MB	Médium Bas
MH	Médium Haut
NI	Niveau d'Ingestion
NH ₃	Ammoniac
ORO	Orifice Réticulo-Omasal
PCO	Proportion de Concentré
PDI	Protéines Digestible dans l'Intestin
PDIA	Protéines Digestible dans l'Intestin d'origine Alimentaire
PDIM	Protéines Digestible dans l'Intestin d'origine Microbienne
PIA	Protéines Alimentaires dans l'Intestin
TMS	Temps Moyen de Séjour
TMST	Temps Moyen de Séjour Total
TMS1	Temps Moyen de Séjour dans le compartiment 1
TMS2	Temps Moyen de Séjour dans le compartiment 1
TT	Temps de rétention dans la section tubulaire des intestins

List of abbreviations

AA	Amino Acids
ADF	Acid Detergent Fiber
ADL	Acid Detergent Lignin
BW	Body Weight
CP	Crude Protein
DAPA	Diaminopimelic Acid
DIM	Dry Matter Intake
FSG	Functional Specific Gravity
HC	High Control
LC	Low Control
MH	Medium High
ML	Medium Low
MP	Metabolisable Protein
MPY	Milk Protein Yield
MRT	Mean Retention Time
MRT1	Mean Retention Time in the first compartment
MRT2	Mean Retention Time in the second compartment
N	Nitrogen
NDF	Neutral Detergent Fiber
NH ₃	Ammoniac
OM	Organic Matter
PDIE	truly digestible (dietary + microbial) protein when available energy decreases microbial growth
PDIN	truly digestible (dietary + microbial) protein when available degradable nitrogen decreases microbial growth
PEG	Polyethylene Glycol
RUP	Rumen Undegradable Protein
SBM	Soya Bean Meal
SD	Standard Deviation
TMRT	Total Mean Retention Time
TT	Transit Time in the intestines tubular section
UFL	Unité Fourragère Lait (1 UFL = 1.7 Mcal of net energy for milk)

VFA	Volatile Fatty Acid
Yb	Ytterbium Chloride

Introduction générale

L'augmentation de la population mondiale observée à partir des années 50 devrait se poursuivre jusqu'à atteindre 9.8 milliards d'individu en 2050. Plus de la moitié de cette croissance devrait avoir lieu en Afrique et l'Asie serait en deuxième position avec une augmentation de sa population d'un peu moins d'un milliard (Nations Unies, 2015). Ces pays en développement montrent par ailleurs une accélération de leur transition alimentaire ce qui induit une augmentation de leur consommation en produits d'origine animale, notamment en produits laitiers (Alexandratos and Bruinsma, 2012). Ce changement de régime alimentaire accentue la pression sur les ressources disponibles pour les produire notamment les terres arables et l'eau avec une compétition entre les produits à destination de l'alimentation humaine et ceux destinés aux animaux. Par ailleurs, l'agriculture et le secteur laitier en particulier est sous pression croissante des différents gouvernements et de la société pour réduire son empreinte écologique. Parmi les polluants, l'azote est particulièrement ciblé pour son impact multiple sur le réchauffement climatique (émission de protoxyde d'azote qui est un puissant gaz à effet de serre), la qualité de l'air (émission d'ammoniac), la qualité de l'eau (émission du nitrate), la biodiversité des écosystèmes et la santé humaine (Castillo et al., 2000; Sutton et al., 2011). De plus en Europe, les aliments riches en protéines sont en partie importés ce qui rend l'élevage européen dépendant et fragile face aux variations des prix en fonction des marchés. Néanmoins, l'azote est une ressource indispensable dans l'alimentation des vaches laitières. Bien qu'un excès protéique dans l'alimentation entraîne une augmentation des rejets azotés notamment urinaires dans l'environnement, la non couverture des besoins azotés entraîne une baisse des performances laitières des animaux ayant des conséquences économiques sur l'exploitation agricole (Sauvant et al., 2015). Ainsi, le contexte actuel impose donc de mieux valoriser les ressources protéiques, voire de réduire leur utilisation, tout en continuant à produire autant ou plus tout en diminuant les impacts environnementaux. Cette recherche d'efficacité passe en partie par l'économie de protéines végétales dans l'alimentation des animaux.

Les particularités de l'alimentation protéique des vaches laitières

Les ruminants présentent une particularité digestive qui leur confère une place tout à fait particulière dans les écosystèmes. Ils sont dotés de pré-estomacs qui hébergent une importante population microbienne et au sein desquels s'effectue une première digestion de la ration. Les micro-organismes sont capables de digérer de façon incomplète la cellulose offrant ainsi au ruminant hôte à partir cette fermentation de l'énergie sous forme d'acides gras volatils et des Protéines Digestibles dans l'Intestin (PDI) à partir des corps microbiens produits dans le rumen

(PDIM). Une fraction cependant des aliments échappe à la dégradation dans le rumen et contribue directement à l'apport de PDI d'origine Alimentaire (PDIA). Si cette digestion microbienne permet de bien valoriser l'ensemble des biomasses végétales, elle présente l'inconvénient de dégrader rapidement la majorité des protéines apportée par la ration avec les aliments classiques. Or on sait depuis longtemps que plus la production de lait des vaches augmente, plus le besoin en PDI augmente. Pour subvenir à ce besoin, il est nécessaire d'accroître l'apport PDIA car l'augmentation de la fourniture en protéines par les micro-organismes ne parvient pas à couvrir les besoins élevés liés à l'exportation élevée de protéines dans le lait. Compte tenu de la forte proportion de protéines alimentaires généralement dégradée dans le rumen, cette augmentation des PDIA nécessite souvent d'apporter beaucoup de protéines qui sont utilisées avec une faible efficacité.

Augmenter la quantité de protéines digestibles d'origine alimentaire arrivant au duodénum

Le premier levier utilisable pour économiser les protéines végétales dans l'alimentation des vaches laitières consiste à augmenter la quantité de protéines digestibles d'origine alimentaire arrivant au duodénum en les protégeant de la digestion microbienne. Cela permet d'apporter les protéines nécessaires aux animaux pour exprimer leur potentiel laitier tout en limitant les rejets d'azote sous forme urinaire par la réduction des dégradations ruminales. Les fabricants d'aliments pour les animaux d'élevage ont développé différents processus industriels visant à protéger les sources protéiques de la dégradation ruminale tel que le chauffage, le tannage ou l'encapsulage (Whitelaw et al., 1961; Vérité et al., 1977). La difficulté de ces processus réside dans la capacité des différentes protections à protéger efficacement l'aliment dans le rumen tout en préservant une bonne digestibilité dans l'intestin grêle des fractions non dégradées dans le rumen (Broderick et al., 1991). En Europe, le procédé le plus utilisé pour son efficacité et son coût économique était le tannage des protéines par le formaldéhyde (Barry, 1976). Cependant, la menace de l'interdiction de son utilisation dans l'alimentation des animaux a conduit les industriels à rechercher d'autres alternatives à ce procédé. Le processus de chauffage des protéines, basé sur la réaction de Maillard, est efficace pour limiter la dégradation ruminale (Whitelaw et al., 1961; Sherrod et Tillman, 1964; Krizsan et al., 2017). Cependant, ce procédé peut être inefficace ou réduire la digestibilité intestinale lorsque les conditions du processus industriel ne sont pas bien maîtrisées (Broderick et al., 1991). Différentes études se sont intéressées à l'utilisation des extraits de plantes (tannins ou huiles essentielles) dans la régulation de la flore microbienne comme moyen pour réduire la dégradation des protéines dans

le rumen. Les résultats obtenus sont variables *in vivo* (Min et al., 2003; Waghorn, 2008; Bayourthe et Ali-Haimoud-Lekhal, 2014), soit par une réelle variation de l'efficacité des molécules considérées, soit par défaut d'une méthodologie adaptée pour estimer leurs actions. De nouveaux leviers ont donc besoin d'être identifiés pour permettre d'augmenter la quantité de protéines digestibles d'origine alimentaire arrivant au duodénum.

Formuler les rations au plus proche des besoins des animaux

Le deuxième levier utilisable pour économiser les protéines végétales dans l'alimentation des vaches laitières consiste à formuler les rations au plus proche des besoins des animaux de façon à faire correspondre au mieux les apports en protéines avec les besoins et ainsi limiter les pertes sous forme d'azote et le gaspillage des protéines alimentaires. Cet objectif est généralement recherché par les différents systèmes d'alimentation existants, régulièrement mis à jour (NRC, 2001; NorFor, 2011; Van Duinkerken et al., 2011; Van Amburgh et al., 2015; INRA, 2018), qui reposent sur la connaissance de la valeur alimentaire des aliments. Dans le cas de la valeur protéique des aliments, différentes méthodologies d'estimation *in vitro*, *in situ* et *in vivo* ont été développées au cours des années. Bien qu'elles permettent une estimation relativement précise de la valeur protéique des aliments, un certain nombre de limites a été mis en avant. La méthode *in vivo*, basée sur la mesure de flux duodénaux, correspond à la méthode de référence. Cependant, c'est une méthode coûteuse et lourde à mettre en place ce qui la rend inappropriée pour des analyses de routine (Stern *et al.*, 1997). De plus, une forte variabilité, relative à l'usage de marqueurs, a été rapportée (Satter, 1986). Les méthodes *in vitro*, basée sur des réactions enzymatiques ou des extractions dans des tampons, possèdent l'avantage de la rapidité ce qui permet de tester un nombre conséquent d'échantillon. Cependant, les lots d'enzymes ne représentent pas la diversité de l'écosystème ruminal puisqu'ils sont extraits du fluide ruminal ce qui peut entraîner des biais (Tilley et Terry, 1963). Par ailleurs, bien que certains pays possèdent des procédures normalisées (Aufrère et al., 1991), aucune méthode n'est acceptée scientifiquement pour tous types d'aliments (Valadares Filho et al., 2010; Velásquez et al., 2016). Les méthodes basées sur l'extraction dans des tampons montrent des variabilités dans les résultats d'un même aliment liées à l'influence de la température et du pH (Licitra et al., 1996). La méthode *in sacco* ou *in situ*, utilisant des sachets de nylon insérés dans le rumen et/ou dans le duodénum, est la méthode la plus utilisée en recherche. Elle permet de tester la dégradabilité et la digestibilité des aliments mais reste sensible à la perte particulière et à la colonisation des sachet par les bactéries (Michalet-Doreau et Ould-Bah, 1992; De Jonge, 2015).

Par ailleurs, les méthodes *in situ* et *in vivo* nécessitent l'usage d'animaux fistulés au niveau ruminal, voire duodéal, ce qui va à l'encontre des préoccupations en terme de bien-être animal de la société. L'objectif des 3R en expérimentation animale (remplacement, réduction et raffinement) pose donc la question de l'utilisation de tels animaux sur le long terme. De plus, parmi ces différentes méthodes, seule la méthode *in vivo* est à même d'estimer la valeur d'un aliment protéique combiné avec des extraits végétaux évoqués ci-dessus. En effet, elle seule permet de prendre en compte l'ensemble des phénomènes digestifs se déroulant dans le rumen et sur lesquels ces extraits peuvent intervenir. Cependant, cette méthode est également la plus lourde à mettre en place et est donc assez peu utilisée ce qui pose la question de l'inclusion de tels aliments dans les tables des systèmes d'alimentation. Ainsi, une nouvelle méthodologie d'estimation de la valeur protéique des aliments est nécessaire pour à la fois permettre l'évaluation des nouveaux processus visant à augmenter la quantité de protéines digestible d'origine alimentaire au duodénum tout en répondant aux attentes sociétales en terme de bien-être animal.

Références

- Alexandratos N and Bruinsma J 2012. World agriculture toward 2030/2050 - The 2012 revision. Agricultural development economics division - FAO.
- Aufrere J, Graviou D, Demarquilly C, Vérité R, Michalet-Doreau B and Chapoutot P 1991. Predicting *in situ* degradability of feed proteins in the rumen by two laboratory methods (solubility and enzymatic degradation). *Animal Feed Science and Technology* 33, 97–116.
- Barry TN 1976. The effectiveness of formaldehyde treatment in protecting dietary protein from rumen microbial degradation. *The Proceedings of the Nutrition Society* 35, 221–229.
- Bayourthe C et Ali-Haimoud-Lekhal D 2014. Les extraits de plantes chez le ruminant: effets sur les fermentations dans le rumen et la qualité lipidique des produits animaux. *INRA Production Animale* 27, 317–328.
- Broderick GA, Wallace RJ and Orskov ER 1991. Control of rate and extent of protein degradation. In *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants* (eds. T. Tsuda, Y. Sasaki and R. Kawasima), pp. 541–592. San Diego.
- Castillo A, Kebreab E, Beever D and France J 2000. A review of efficiency of nitrogen utilisation in lactating dairy cows and its relationship with environmental pollution. *Journal of Animal and Feed Sciences* 9, 1–32.

- De Jonge LH 2015. What happens in the bag? - Development and evaluation of a modified in situ protocol to estimate degradation of nitrogen and starch in the rumen. Wageningen University, Wageningen, the Netherlands, 175pp.
- INRA 2018. INRA feeding system for ruminants. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.
- Krizsan SJ, Gidlund H, Fatehi F and Huhtanen P 2017. Effect of dietary supplementation with heat-treated canola meal on ruminal nutrient metabolism in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 100, 8004–8017.
- Licitra G, Hernandez TM and Van Soest PJ 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 57, 347–358.
- Michalet-Doreau B and Ould-Bah MY 1992. In vitro and in sacco methods for the estimation of dietary nitrogen degradability in the rumen: a review. *Animal Feed Science and Technology* 40, 57–86.
- Min BR, Barry TN, Attwood GT and McNabb WC 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology* 106, 3–19.
- National Research Council (NRC) 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. National Academy of Sciences, Washington, DC, USA.
- Nations Unies Des affaires économiques et sociales 2015. La population. Retrieved on 5 April 2019, from <https://www.un.org/fr/sections/issues-depth/population/index.html>.
- NorFor 2011. The Nordic feed evaluation system. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands.
- Satter LD 1986. Protein supply from undegraded dietary protein. *Journal of Dairy Science* 69, 2734–2749.
- Sauvant D, Cantalapiedra-Hijar G, Delaby L, Daniel J-B, Faverdin P et Nozière P 2015. Actualisation des besoins protéiques des ruminants et détermination des réponses des femelles laitières aux apports de protéines digestibles dans l'intestin. *INRA Production Animale* 28, 347–368.
- Sherrod LB and Tillman AD 1964. Further studies on the effects of different processing temperatures on the utilization of solvent-extracted cottonseed protein by sheep. *Journal of Animal Science* 23, 510–516.
- Stern MD, Bach A and Calsamiglia S 1997. Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. *Journal of Animal Science* 75, 2256–2276.

Sutton MA, Howard CM, Erisman JW, Billen G, Bleeker A, Grennfelt P, van Grinsven H and Grizzetti B 2011. The European nitrogen assessment. Sources, effects and policy perspectives. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

Tilley JMA and Terry RA 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Grass and Forage Science* 18, 104–111.

Valadares Filho S de C, Pina D dos S, Chizzotti ML and Valadares RFD 2010. Ruminal feed protein degradation and microbial protein synthesis. In *Nutrient requirements of Zebu beef cattle* (eds. S. de C. Valadares Filho, M.I. Marcondes, M.L. Chizzotti and P.V. Rogrigues Paulino), pp. 13–44. Suprema Gráfica e Editora, Sao Carlos, Brazil.

Van Amburgh ME, Collao-Saenz EA, Higgs RJ, Ross DA, Recktenwald EB, Raffrenato E, Chase LE, Overton TR, Mills JK and Foskolos A 2015. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System: updates to the model and evaluation of version 6.5. *Journal of Dairy Science* 98, 6361–6380.

Van Duinkerken G, Blok MC, Bannink A, Cone JW, Dijkstra J, Van vuuren AM and Tamminga S 2011. Update of the Dutch protein evaluation system for ruminants: the DVE/OEB2010 system. *Journal of Animal Science* 149, 351–367.

Velásquez A, Viera MJR and Marnet P-G 2016. Empirical attributes and limitations of methodologies for predicting the degradability of ruminal protein. *Ciencia e investigación agraria: revista latinoamericana de ciencias de la agricultura* 43, 171–189.

Vérité R, Journet M, Flechet J, Lefaivre R, Marquis B et Vérité M 1977. Utilisation des tourteaux traités au formol par les vaches laitières. II. – Effets sur la production laitière du traitement des tourteaux et du niveau d’apport azoté au début de la lactation. *Annales de zootechnie* 26, 183–205.

Waghorn G 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology* 147, 116–139.

Whitelaw FG, Preston TR and Dawson GS 1961. The nutrition of the early-weaned calf. II. A comparison of commercial groundnut meal, heat-treated groundnut meal and fish meal as the major protein source in the diet. *Animal Production* 3, 127–133.

Chapitre 1 – Synthèse bibliographique

La nécessité d'économiser les protéines végétales dans l'alimentation des vaches laitières peut être réalisée soit en augmentant la quantité de protéines digestibles d'origine alimentaire arrivant au duodénum, soit en formulant les rations au plus proche des besoins des animaux. L'analyse de la littérature nous permet de déterminer les différents leviers pouvant être utilisés pour atteindre ces deux objectifs. La première partie de cette synthèse bibliographique se concentre sur les phénomènes digestifs des protéines dans le rumen et sur l'influence des caractéristiques physiques des particules telles que la taille et la densité spécifique sur leur temps de séjour dans ce compartiment. La deuxième partie s'intéresse à la digestion des protéines dans les intestins qui aboutit sur le concept de protéines métabolisables ainsi qu'aux lois de réponse des facteurs biologiques tels que les **acides aminés** (AA) plasmatiques et les matières protéiques du lait à ces apports en protéines métabolisables.

1.1. Digestion des protéines et transformation des aliments dans le rumen

1.1.1. Digestion des protéines dans le rumen

La première étape de la digestion se déroule dans le rumen où entre 40 et 80% des protéines vont être dégradées par les micro-organismes (Chalupa, 1975). Les bactéries sont les principaux micro-organismes impliqués dans le métabolisme des protéines (Broderick et al., 1991). Leurs panels d'enzymes s'attaquent aux protéines en les réduisant en peptides puis en AA jusqu'à dégager complètement la molécule d'azote sous forme d'**ammoniac** (NH₃). Les bactéries vont ensuite utiliser les AA et le NH₃ pour synthétiser leurs propres protéines, avec probablement une utilisation préférentielle des AA au NH₃ lorsqu'ils sont disponibles (Chalupa, 1975; Jouany, 1994; Bach et al., 2005). Les protozoaires du rumen trouvent leur source azotée par prédation des bactéries, il s'agit alors d'un recyclage interne au rumen, ou en intégrant les plus gros éléments de la dégradation tels que les protéines et les peptides (Bach et al., 2005).

Une fois synthétisée, les protéines de la flore microbienne contribuent à la croissance de la population qui est évacuée progressivement du rumen avec les digesta même si environ 30% des protéines produites par les micro-organismes sont à nouveau dégradées dans le rumen (Chalupa, 1975). Les protéines microbiennes arrivant ainsi dans l'intestin grêle constituent la première source azotée disponible pour l'animal.

Lors de la dégradation des protéines par les bactéries, une partie du NH_3 traverse la paroi du rumen pour se retrouver dans le sang puis dans le foie où il est rapidement transformé en urée qui est un déchet non toxique, contrairement au NH_3 . Lorsque la quantité de protéines n'est pas suffisante dans la ration, l'urée est recyclée dans le rumen soit par le biais de la salive, soit par diffusion à travers la paroi du rumen ce qui permet à la flore microbienne d'assurer sa croissance même sur des régimes carencés en azote (Broderick et al., 1991; Reynolds et Kristensen, 2007). A l'inverse, quand la quantité de protéines est trop importante, la concentration en NH_3 dans le rumen augmente et l'excrétion urinaire d'urée s'accroît (Reynolds et Kristensen, 2007).

Par ailleurs, la totalité des protéines ingérées par l'animal n'est pas soumise à la dégradation par les micro-organismes. Une partie sort du rumen sans subir de transformations chimiques et arrive directement dans le duodénum, via la caillette. Cette fraction de protéines alimentaires non dégradée constitue la deuxième source azotée disponible pour l'animal (Figure 1.1).

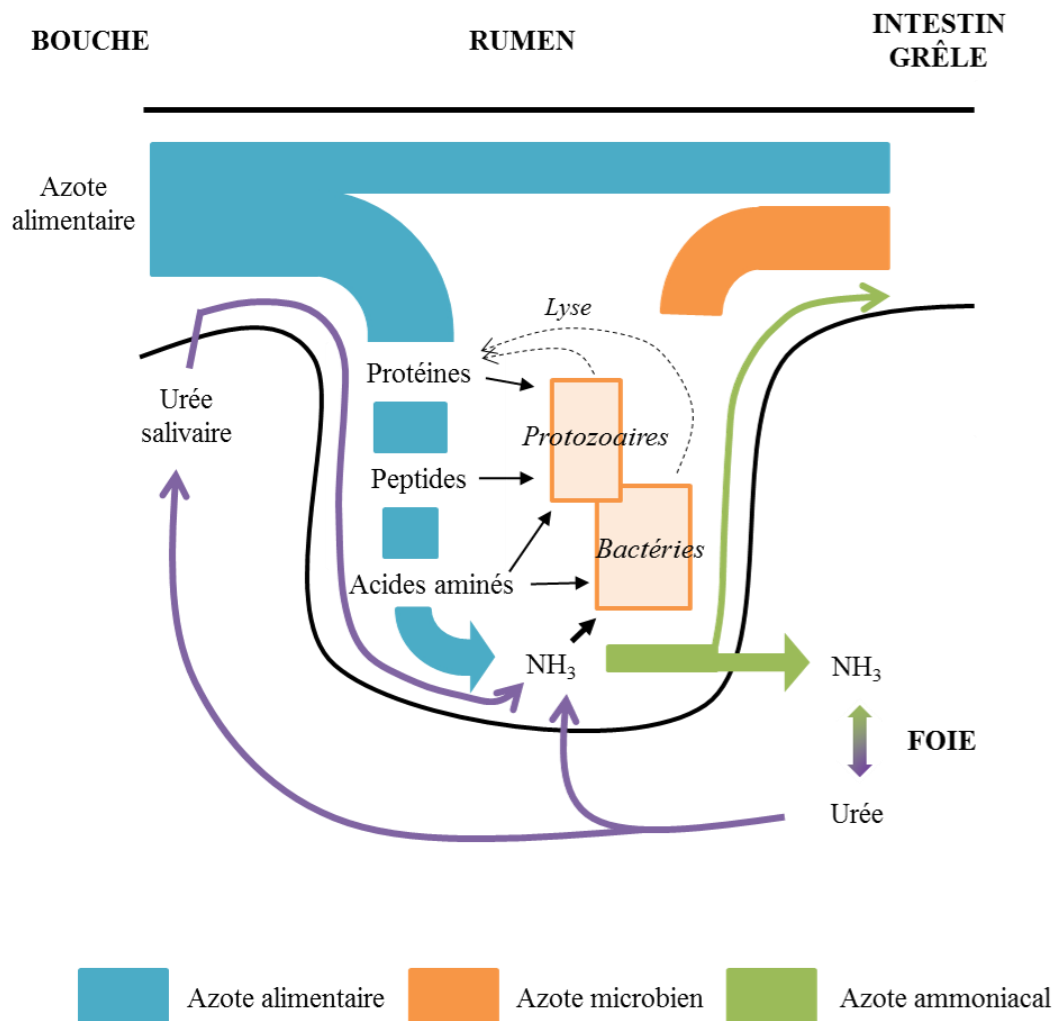


Figure 1.1 : Digestion des protéines dans le rumen de la vache laitière (adapté de INRA, 1978)

1.1.2. Transformation physique des aliments au cours de la digestion dans le rumen

La digestion dans le rumen intègre, en plus des fermentations ruminales par les micro-organismes, des mécanismes essentiels que sont la mastication lors de l'ingestion ou de la rumination et les contractions du rumen. L'ensemble de ces mécanismes induit des changements dans la structure physique des aliments et contribue de façon essentielle à l'évacuation des contenus vers les parties plus distales du tube digestif. Plus particulièrement, les caractéristiques physiques des particules telles que la taille et la densité spécifique des aliments sont amenées à évoluer au cours de ce processus conduisant à une stratification du rumen en fonction de ces deux paramètres.

1.1.2.1. Rôle des fermentations ruminales sur la taille et la densité spécifique des aliments

En plus de la dégradation des protéines décrite au paragraphe précédent, les fermentations ruminales par les micro-organismes entraînent des changements de taille et de densité spécifique des aliments.

Le rôle de l'activité fermentaire dans la réduction de la taille des particules est faible, même si les champignons pourraient jouer un rôle plus important (Kennedy, 2005). Elle consiste essentiellement à fragiliser les structures des aliments par dégradation des constituants pariétaux (Faichney, 1984; Lechner-Doll et al., 1991; Lykos et Varga, 1995) ce qui les rend plus susceptibles à l'action mécanique des mâchoires lors de la mastication.

En revanche, leur rôle sur les variations de la densité spécifique des aliments est beaucoup plus important. La densité spécifique des aliments inclut à la fois la densité intrinsèque de l'aliment considéré affectée de tous les facteurs contribuant à la flottaison de la particule : composition structurale, gaz et liquides contenus dans la particule et les éventuelles bulles associées (DesBordes et al., 1984). Dans les premiers temps qui suivent l'ingestion de la particule alimentaire, les fermentations par les micro-organismes entraînent l'apparition de bulles de gaz qui restent attachées à la particule, entraînant une diminution de sa densité spécifique. Le pic de production de gaz est associé au taux de digestion par les micro-organismes (Kennedy, 2005). Lorsque les fermentations cessent, la densité spécifique de la particule augmente à nouveau, lié au détachement des bulles de gaz issus des fermentations ainsi qu'à l'hydratation

par le liquide environnant (Rémond et al., 1995; Sauvant et al., 1995). Wattiaux et al. (1992) montrent que sur des particules de fourrage, le pic de production de gaz se situe 6h après le début des fermentations, mais que la quantité de gaz associés aux particules continue d'augmenter jusqu'à 9h après le début de celle-ci. Cela entraîne une diminution de la densité spécifique des particules testées sur cette période. Ces auteurs ont trouvé que la densité spécifique diminue d'abord dû à la production de gaz puis augmente lorsque cette production de gaz diminue (Figure 1.2). Bhatti et Firkins (1995) retrouvent également ce délai dans la prise de densité spécifique lié aux gaz issus des fermentations sur la majorité des aliments digérés *in vitro* (fourrages et concentrés) testés dans leur étude (Figure 1.3).

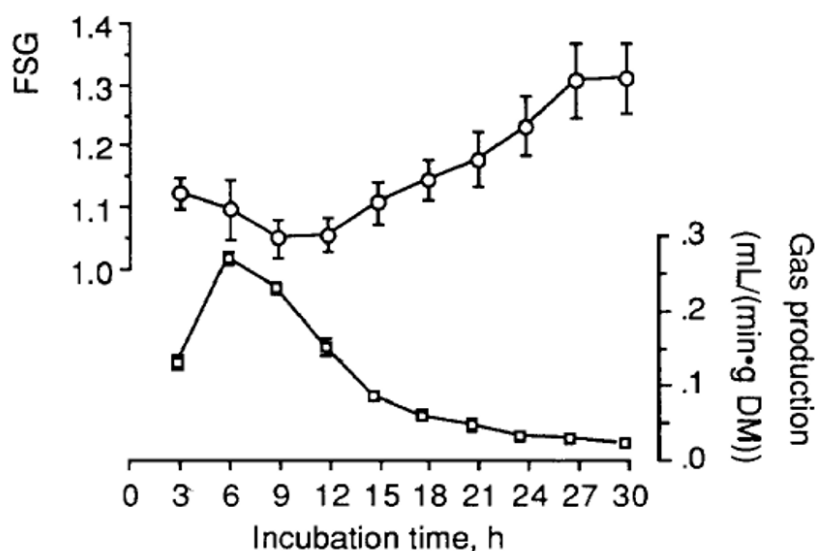


Figure 1.2. Variations de la densité spécifique (FSG ; rond blanc) et de la production de gaz (carré blanc) de particules de foin de luzerne au cours de la digestion *in vitro* (moyenne \pm ET ; Wattiaux et al., 1992).

Cette cinétique globale d'évolution de la densité spécifique des aliments varie sous l'influence de différents facteurs : la composition chimique des fourrages, la solubilisation initiale de la matière sèche, la composition ionique du liquide, l'attachement des bactéries, la production de gaz pendant la fermentation ainsi que la taille de la particules (Wattiaux et al., 1991).

En premier lieu, elle dépend de l'aliment considéré puisque la densité spécifique est plus élevée pour les concentrés que pour les fourrages et varie à l'intérieur de ces deux classes (Hooper et Welch, 1985; Siciliano-Jones et Murphy, 1991; Bhatti et Firkins, 1995; Figure 1.3). Ces variations sont liées à la composition chimique des aliments et plus particulièrement à la quantité de fibres (NDF) dans le cas des fourrages (Wattiaux et al., 1992). La quantité de gaz

produite est également liée à la quantité de matière disponible pour la digestion et dépend donc aussi de l'aliment considéré.

Par ailleurs, Hooper et Welch (1985) ont étudié l'influence du liquide environnant la particule dans sa prise de densité et ont montré avec des particules de foin que la composition et la concentration en ions de la solution affecte la prise de densité spécifique : la densité augmente plus rapidement dans le liquide ruminal que dans l'eau avec une prise de densité encore plus rapide *in vivo* probablement due aux contractions du rumen qui mixent le bol alimentaire et favorisent la digestion microbienne. Une hydratation rapide par le liquide environnant des particules les rend plus accessibles aux microbes par rapport à des particules absorbant l'eau plus lentement.

Enfin, la taille de la particule influence la densité spécifique avec une relation négative entre les deux paramètres : la densité est plus élevée pour les particules de petites tailles par rapport celles de plus grande taille (Hooper et Welch, 1985; Siciliano-Jones et Murphy, 1991). La réduction de taille entraîne probablement une destruction des parois végétales ce qui permet aux bulles de gaz de se détacher de leur support et donc entraîne une augmentation de la densité spécifique (Evans et al., 1973; Uyatt et al., 1986).

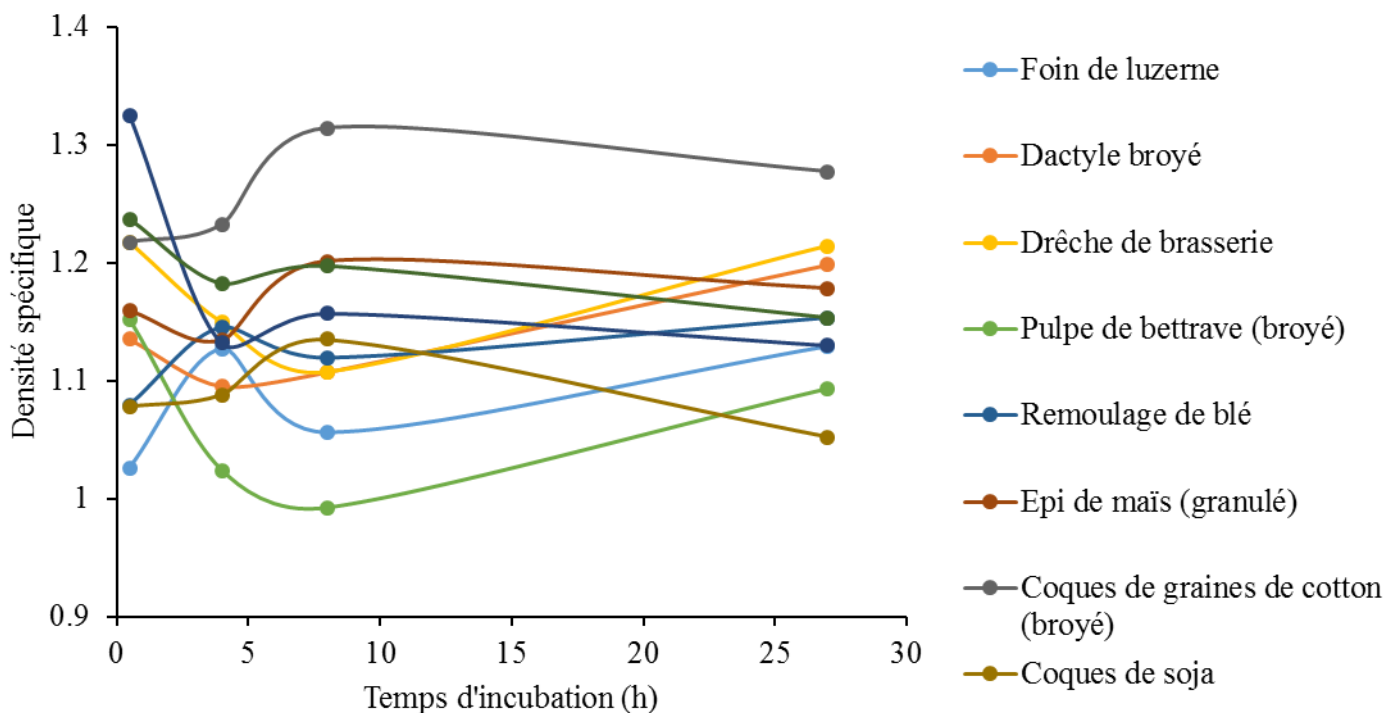


Figure 1.3. Evolution de la densité spécifique de différents aliments au cours du temps d'incubation *in vitro* (d'après Bhatti et Firkins, 1995).

1.1.2.2. Rôle de la mastication pendant l'ingestion et la rumination dans la réduction de la taille des particules alimentaires

La mastication lors de l'ingestion et de la rumination est le facteur contribuant le plus à la réduction de la taille des particules (Faichney, 1984; Baumont et Deswysen, 1991; Olaisen, 2001). Elle entraîne une réduction physique de taille par biais physique et dans une moindre mesure la libération des bulles de gaz qui se sont formées autour de la particule. En plus de son rôle purement physique, la rumination, associée aux contractions du rumen, permet de présenter les particules les plus susceptibles de sortir du compartiment au niveau de **l'orifice réticulo-omasal** (ORO ; Mambrini, 1990). Dans une étude réalisée sur moutons avec de la luzerne distribuée soit hachée soit broyée puis granulée, Faichney (1984) rapporte que la mastication pendant l'ingestion permet de réduire la proportion de matière sèche récupérée sur les tamis de taille > 1.18mm de 97 à 74% pour la luzerne hachée et de 40 à 33% pour la luzerne broyée. La mastication pendant la rumination réduit encore la taille des particules et le flux de digesta dans la caillette ne contient plus que 3 et 2% de matière sèche récupérée sur les tamis > 1.18 mm (Figure 1.4).

Ce sont les particules les plus grandes qui sont majoritairement ruminées. Uyatt et al. (1986) rapporte que les particules larges (> 1.18 mm) sont ruminées pour 40 à 90% et Lechner-Doll et al. (1991) rapporte un taux de réduction de la taille des particules > 1.18 mm de 8.3%/h contre un taux de 5.4%/h pour les particules < 1.18mm. Sauvart (2000) trouve une relation quadratique entre la mastication (min/kg MS) et la taille moyenne des particules des rations ($y = 15.1 + 7.62 x - 0.644 x^2$; $R^2 = 0,96$) chez les bovins.

Par ailleurs, le taux de réduction de la taille des particules varie en fonction des fourrages (Waghorn et al., 1989; Dewhurst et al., 2003; Kornfelt, 2012) ou des céréales (Beauchemin et al., 1994) ingérés par l'animal. De même, ce taux peut varier au sein d'un même fourrage en fonction de la proportion de tiges et de feuilles ou bien de la proportion de fibre du végétal (Uyatt et al., 1986; Kennedy, 2005).

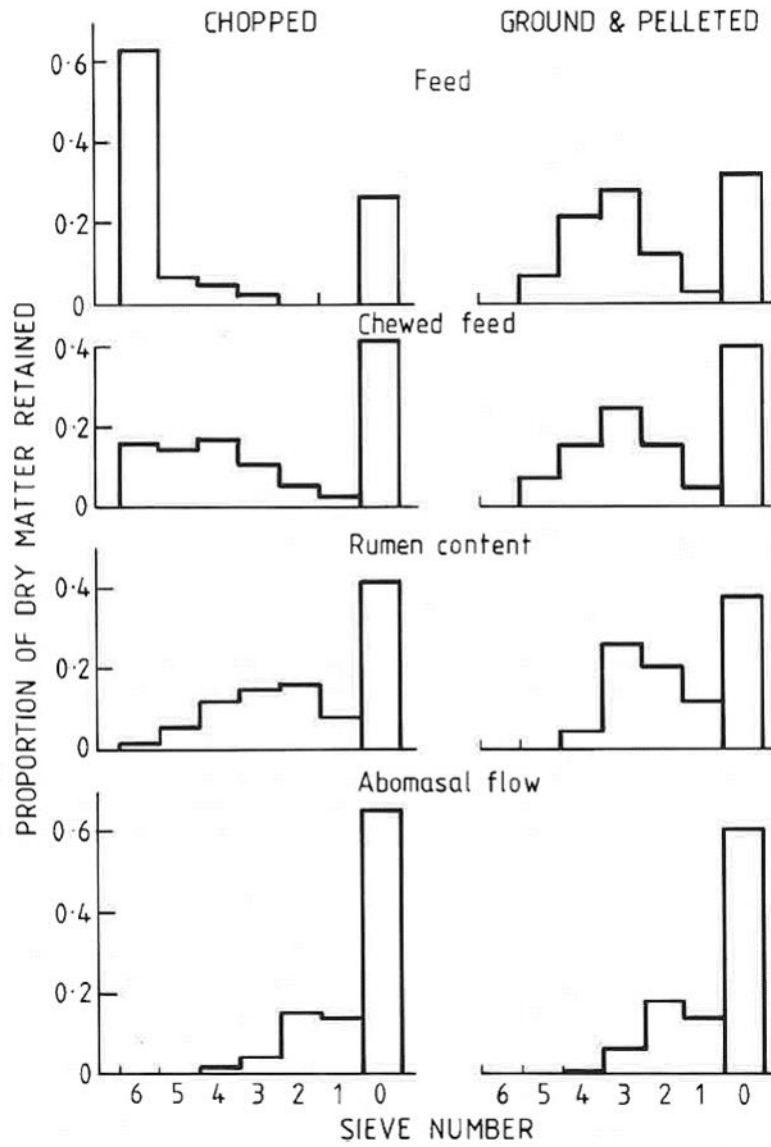


Figure 1.4 : Distribution de la taille des particules de l'aliment, de l'aliment ruminé, du contenu ruminal et du flux de digesta dans la caillette chez le mouton recevant un foin luzerne haché ou broyé puis granulé (Faichney, 1984)

La Figure 1.5 retrace la transformation physique théorique en terme de taille et de densité spécifique d'une particule alimentaire au cours de la digestion dans le rumen.

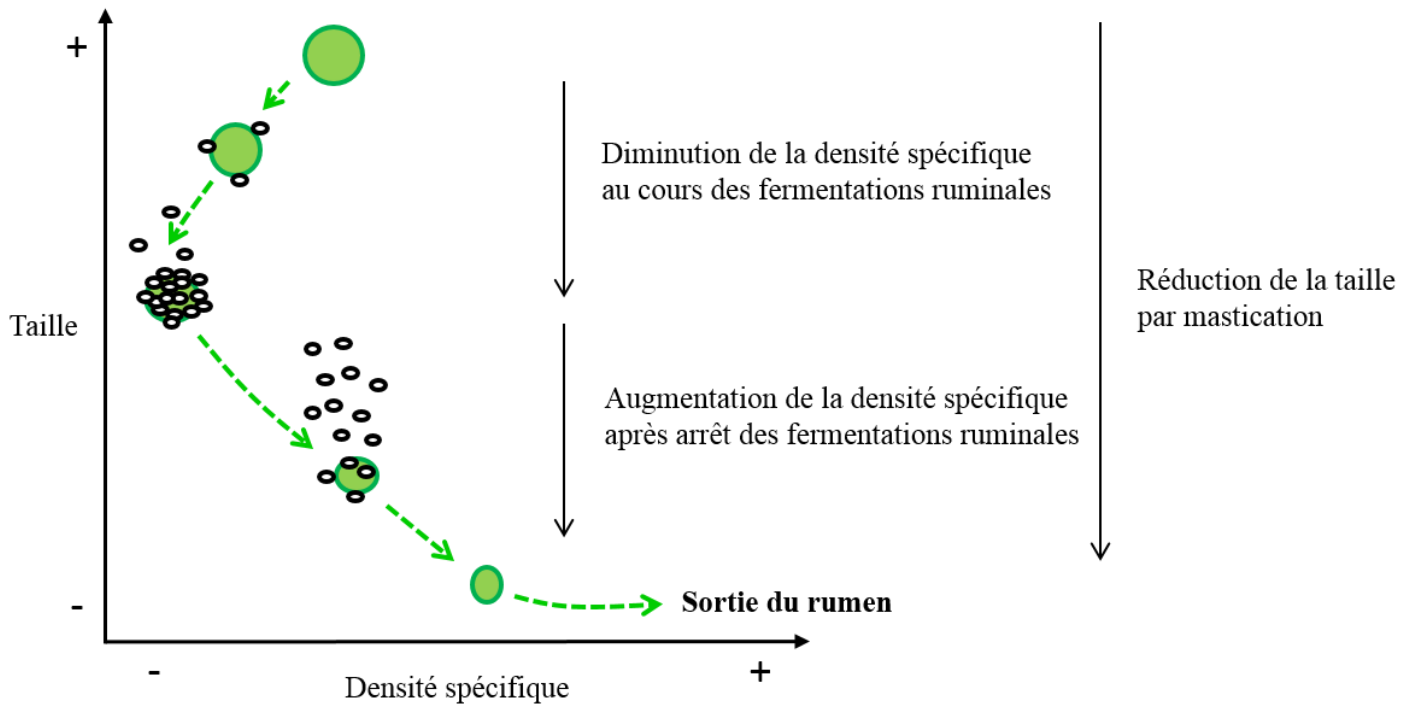


Figure 1.5. Schématisation de l'évolution de la taille et de la densité spécifique d'une particule alimentaire au cours de la digestion dans le rumen.

1.1.2.3. Stratification des contenus dans le rumen en fonction de la taille et la densité spécifique des aliments

Les transformations physiques des aliments combinées aux contractions du rumen conduisent à une organisation stratifiée des contenus dans ce compartiment. Cette stratification tend à s'estomper en s'éloignant du repas (Kennedy, 2005).

La taille des particules du rumen varie en fonction de leur localisation (Hooper et Welch, 1985; Sutherland, 1988). Evans et al. (1973) ont étudié la répartition de particules de foin en fonction de leur taille dans le rumen : les particules les plus grossières (supérieures à 9,3 mm) se retrouvent préférentiellement dans le sac dorsal juste après l'ingestion puis leur concentration diminue de façon uniforme au cours de la digestion. Les particules de taille médium (entre 9,3 et 3,5 mm) augmentent en concentration dans le sac ventral et le réseau au cours du temps. Enfin, les particules les plus fines (entre 3,5 et 1 mm) se retrouvent rapidement dans le sac

ventral après ingestion. La distribution de la taille des particules dans le rumen se fait donc de façon stratifiée avec les particules les plus grossières situées essentiellement dans le sac dorsal puis une diminution de la taille vers le sac ventral. Par ailleurs, les particules situées en position ventrale arrivent plus rapidement au niveau de l'ORO que celles en position dorsale (Welch, 1982; Sutherland, 1988). Le mécanisme de retour d'une partie du flux de digesta au niveau du feuillet pourrait également faire partie d'un mode de sélection supplémentaire (Sutherland, 1988).

D'autre part, les particules se répartissent dans le rumen en fonction de leur densité spécifique. Evans et al. (1973) ont également étudié la répartition de particules de foin en fonction de leur densité spécifique au sein du rumen. Les particules les plus denses se trouvent préférentiellement dans le sac ventral avec un gradient croissant de densité du sac dorsal au sac ventral qui stratifie le rumen : les particules les plus légères se retrouvent plus particulièrement dans le rumen dorsal et les particules les plus denses dans le rumen ventral (Hooper et Welch, 1985; Welch, 1986). Les particules présentes dans le réseau ont quant à elles une densité intermédiaire (Evans et al., 1973). De la même façon, la direction que prennent les aliments, caudale ou crâniale, au moment de l'ingestion dépend de leur densité spécifique (Martz et Belyea, 1986): dans certains cas, les digesta denses peuvent passer directement dans le sac crânial sans passer par le sac dorsal ou ventral du rumen (Mambrini, 1990).

De plus, il existe un lien entre la taille et la densité spécifique : les grandes particules sont souvent légères et se trouvent plutôt dans le sac dorsal et inversement, les particules les plus petites sont également plus denses et tombent plus rapidement dans le sac ventral et le réseau (Sutherland, 1988; Baumont et Deswysen, 1991; Lechner-Doll et al., 1991).

1.1.3. Influence des caractéristiques physiques des aliments sur leur digestion dans le rumen

1.1.3.1. Influence de la taille des particules sur la digestion des aliments dans le rumen

1.1.3.1.1. *Augmentation de la dégradabilité des aliments avec la diminution de la taille des particules alimentaires*

La taille de la particule alimentaire joue un rôle important dans la vitesse de dégradation des protéines. De nombreux auteurs (Bjorndal et al., 1990; Michalet-Doreau et Cerneau, 1991;

Beauchemin et al., 1994; Stern et al., 1994; Lykos et Varga, 1995; Wadhwa et al., 1998; Bayourthe et al., 2000) ont montré que la dégradabilité d'une particule diminue avec l'augmentation de sa taille (Figure 1.6). Les particules de grande taille sont digérées plus lentement avec un début de dégradation des parois retardé par rapport à des particules de petite taille ce qui implique qu'elles doivent rester plus longtemps dans le rumen pour être dégradées en totalité (Bjorndal et al., 1990). Kennedy (2005) rapporte que la biomasse microbienne attachée à la particule en proportion de la biomasse totale augmente lorsque la taille diminue, liée à une plus grande surface disponible relativement à la masse de la particule. Les particules de petites tailles sont donc dégradées plus vite étant donné qu'elles ont une surface proportionnellement plus grande relativement à leur masse que les particules de taille supérieure. Par ailleurs, la réduction de la taille des particules de fourrage entraîne une hydratation plus rapide des particules ce qui augmente leur densité spécifique (Moore, 1964; Hooper et Welch, 1985). Il est donc difficile de dissocier les effets propres à la taille de ceux liés à la densité spécifique dans le cas des fourrages (Mambrini, 1990).

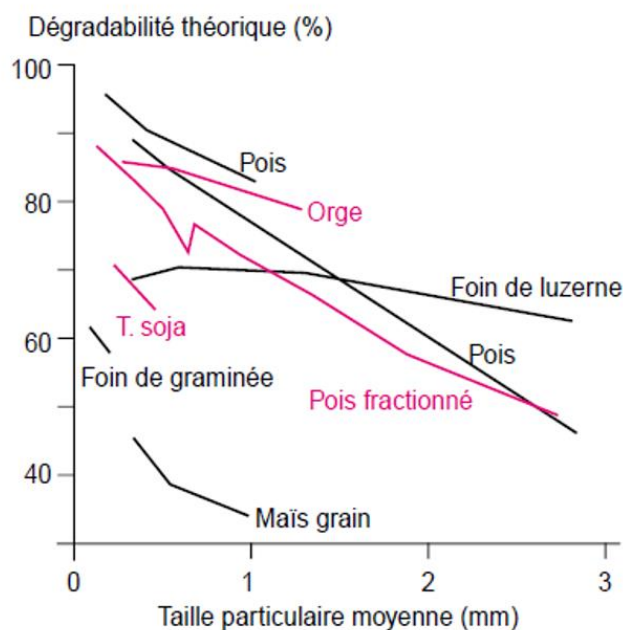


Figure 1.6. Influence de la granulométrie sur la dégradabilité in sacco de l'azote des aliments (Sauvant, 2000)

1.1.3.1.2. Réduction du temps moyen de séjour avec la diminution de la taille des particules alimentaires

La taille est un facteur influençant le temps de séjour des particules : plus une particule est petite et plus sa probabilité de quitter le rumen rapidement est forte (Mambrini, 1990). Cette variation simultanée entre la taille et le temps de séjour des particules est retrouvée dans la majorité des études (Kennedy, 2005). Ainsi, des études menées sur la taille des particules de foin (Campling et Freer, 1962; Waldo et al., 1971; Dixon et Milligan, 1985; Hooper et Welch, 1985) et plus généralement sur les fourrages (Ehle et Stern, 1986; Waghorn et al., 1989; Lechner et al., 2010) s'accordent sur le fait que le temps de rétention des particules est négativement corrélé à leur taille. Campling et Freer (1962) montrent que les particules de foin de 3,2 mm de diamètre passent plus rapidement l'ORO que celle de 4,8 mm. Le consensus général est que la taille maximale de passage est située autour de 2 mm et que les particules ayant une taille supérieure à 4 mm ont une très faible probabilité de sortie (Dixon et Milligan, 1985; Hooper et Welch, 1985; Waghorn et al., 1989).

Cependant, les différentes relations obtenues entre la taille et le temps de séjour varient en terme de pente et d'ordonnée à l'origine en fonction de la méthode employée, du type de fourrage et de l'âge de l'animal dans ces études (Kennedy, 2005). De plus, l'usage des marqueurs externes peuvent entraîner un biais dans les calculs de temps de séjour (migration du marqueur, préférence d'adhérence pour les petites particules ; Faichney, 1993).

Ces données sont cohérentes avec les études menées en utilisant des particules inertes qui permettent d'étudier les effets des caractéristiques physiques des particules sans interactions avec les fermentations microbiennes. Ces études de cinétique (Welch et Smith, 1978; Welch, 1982; Murphy et al., 1989; Kaske et Engelhardt, 1990) menées sur des particules de tailles différentes montrent que plus la taille est petite et plus la probabilité de sortie par l'ORO est grande. Welch et Smith (1978) trouvent que les particules de 0,5 cm passent plus rapidement que celles de 1,5 et 2 cm. Les particules de grande taille (>10 cm) sont ruminées pour permettre leur réduction en de particules plus petites (entre 0,5 et 4 cm) et pour faciliter leur passage à travers l'ORO (Kaske et Engelhardt, 1990).

De nombreux auteurs (Welch, 1982, 1986; Hooper et Welch, 1985; Siciliano-Jones et Murphy, 1991; Olaisen, 2001) ont montré que peu de particules de grande taille étaient amenées à quitter le rumen bien que dans l'absolu des particules de 5 cm pourraient passer l'ORO. Ces résultats ont amené au concept de taille critique de passage des particules autorisées à quitter le rumen

(Lechner-Doll et al., 1991). Chez le mouton, Poppi et al. (1980) ont ainsi déterminé que la taille critique de passage du rumen était de 1,18 mm. Au-dessus de cette limite, le pourcentage de particules à passer est très faible (1-3 %) alors que moins de 5 % des particules de taille inférieure à 1,18 mm sont retenues par le tamis. Cette taille critique serait de 3-4 mm chez la vache (Mambrini, 1990).

1.1.3.2. Réduction de temps moyen de séjour pour une gamme précise de densité spécifique des aliments

La mesure de la densité spécifique est difficile à réaliser *in vivo* puisqu'elle inclut la contribution des gaz et liquides associés aux particules ce qui nécessite le maintien de la mesure des activités fermentaires des micro-organismes. Il en résulte que dans la majorité des études seule la taille a été mesurée (Kennedy, 2005) et que les données sur la densité sont essentiellement issues d'études portant sur des particules inertes.

Les études portant sur l'influence de la densité spécifique des particules alimentaires montrent un effet important sur le temps de rétention dans le rumen, même si elles sont peu nombreuses. Hristov et al. (2003) ont étudié les temps de séjour du rumen des particules de fourrage de densité spécifique supérieure ou inférieure à 1,02 (densité des particules de la caillette). Ils ont montré que les particules de densité spécifique plus élevées que 1,02 passent plus rapidement le rumen que les particules de densité spécifique inférieure (0,044 et 0,019 h⁻¹ respectivement). Ehle (1984) a fait varier la densité de fibres de luzerne par ajout de chrome mordancé et rapporte une relation linéaire négative et quadratique entre la densité et le temps de séjour de ces fibres avec un temps plus court à priori pour la densité 1,4 (Figure 1.7). De façon similaire, Lindberg (1985) trouve une relation linéaire négative entre le temps de séjour de différents aliments marqués au chrome mordancé et leur densité spécifique respective. Campling et Freer (1962) ont également étudié le temps de séjour des différents fourrages et concentrés en fonction de leur densité spécifique et ont trouvé des résultats similaires à ceux obtenus avec des particules inertes notamment pour les concentrés : les particules présentant le temps de séjour le plus court sont celles dont la densité spécifique est comprise entre 1,17 et 1,4 (Figure 1.8). La densité de 1,2 a été déterminée comme permettant une meilleure sédimentation et donc un passage plus rapide hors du rumen (Dardillat et Baumont, 1992; Rémond et al., 1995).

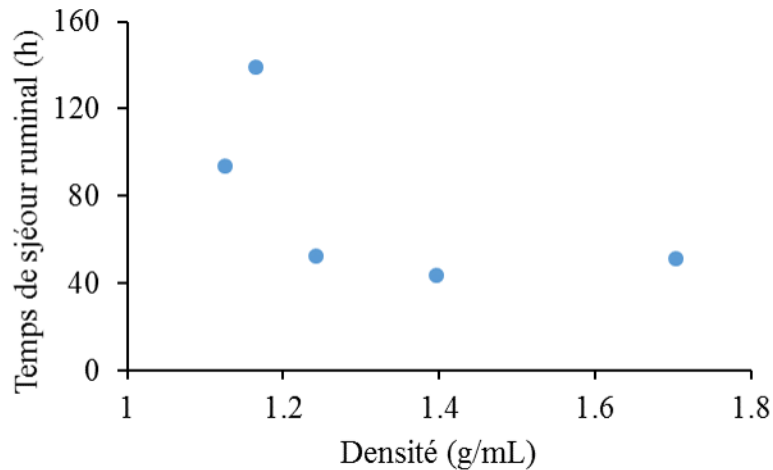


Figure 1.7. Influence de la densité sur le temps de séjour dans le rumen de fibres de luzerne mordancées (D'après Ehle, 1984)

Les études (Campling et Freer, 1962; DesBordes et al., 1984; Welch, 1986, 1990; Kaske et Engelhardt, 1990; Clauss et al., 2011) menées avec des particules inertes ont montré que celles ayant une densité comprise entre 1,17 et 1,4 passent le rumen le plus rapidement probablement parce qu'elles sont placées préférentiellement près de l'ORO (DesBordes et al., 1984 et Figure 1.8). Campling et Freer (1962) observent ainsi qu'à taille constante, le temps de rétention dans le rumen est inversement proportionnel à la densité des particules lorsqu'elle est comprise entre 1,02 et 1,21. Les particules de densité 1,4 ont quant à elles un temps de rétention supérieur à celles de 1,21. Les particules de densité supérieure à 1,4 ont très peu été étudiées (Hooper et Welch, 1985). Welch (1990) observe néanmoins un ralentissement de la vitesse de transit des particules au-delà de 2,1 de densité. Les particules ayant une densité inférieure à celle de l'eau (inférieure à 1) passent lentement et sont de plus beaucoup ruminées (DesBordes et al., 1984; Welch, 1986).

Le rôle de la densité des particules inertes est deux fois aussi importante que la taille sur le temps de séjour dans le rumen (Lechner-Doll et al., 1991). La densité spécifique apparaît donc comme un facteur très important du passage des particules : les particules de plus petite taille et de forte densité spécifique ayant la plus forte probabilité de sortie. Les particules de faible densité spécifique seraient préférentiellement refoulées du passage par l'ORO par une ségrégation de celles-ci dans un « raft » de flottaison dans le sac dorsal du rumen (Mambrini, 1990).

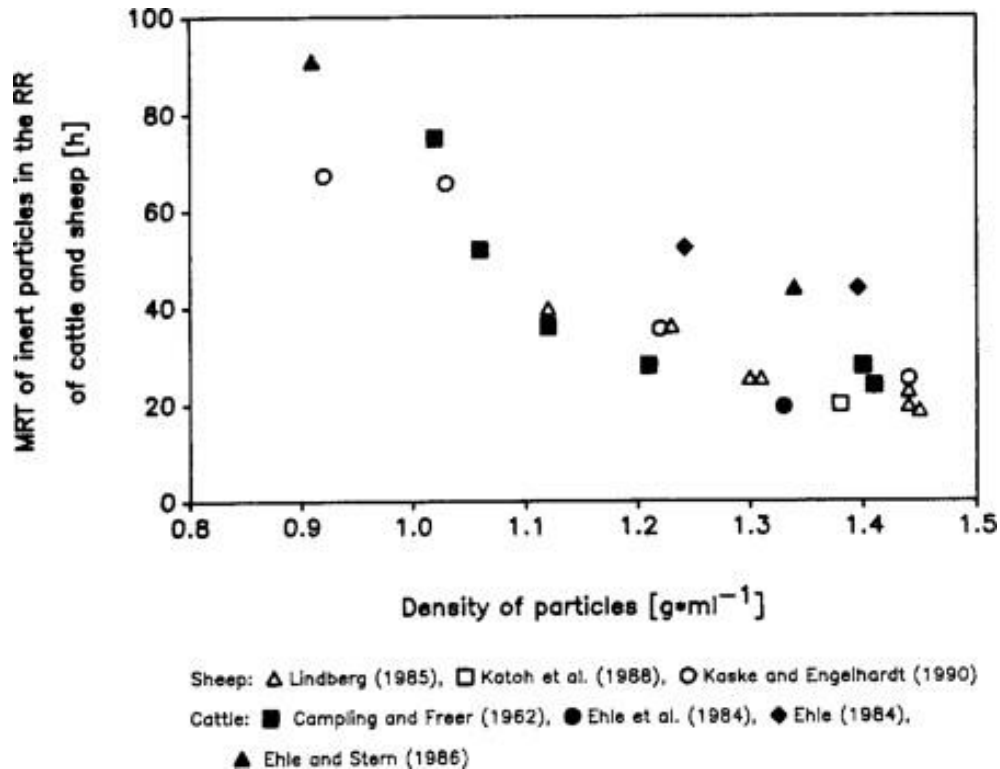


Figure 1.8. Temps moyen de séjour (MRT) de particules inertes de différentes densités dans le réticulo-rumen de vache (motif plein) et de mouton (motif vide).

La digestion des protéines dans le rumen est donc la résultante d'un ensemble de phénomènes complexes. La flore ruminale agit à différents niveaux, à la fois au niveau de la dégradation des protéines alimentaires ainsi qu'au niveau de l'évolution de la densité spécifique des aliments. La mastication au cours de l'ingestion et de la rumination intervient quant à elle dans la réduction de la taille des particules. L'ensemble de ces mécanismes, associé aux mouvements contractifs du rumen, conduit à la stratification du rumen par la taille et la densité spécifique des particules alimentaires. Ces caractéristiques physiques sont par conséquent des facteurs importants de la modification du temps de séjour dans le rumen des particules. Cependant, les travaux issus de la littérature rapportent essentiellement des données obtenues sur des particules de fourrage qui correspondent à des gammes de taille et de densité spécifique qui ne sont pas celles des particules de concentrés sur lesquels se focalise ce travail de thèse. De plus, l'interaction entre ces deux paramètres sur le temps de séjour a rarement été mise en avant alors que la littérature nous montre que ces deux paramètres sont liés. C'est donc un point qui serait intéressant à étudier.

Une fois que la particule protéique a été dégradée par les micro-organismes et/ou qu'elle possède les caractéristiques physiques lui permettant de franchir l'ORO, elle poursuit son chemin jusqu'à l'intestin grêle où une deuxième phase de digestion protéique commence.

1.2. Devenir des protéines depuis leur arrivée dans l'intestin grêle jusqu'à leur sécrétion dans le lait

1.2.1. Digestion et absorption post-ruminale des protéines

1.2.1.1. Phénomènes de digestion des protéines dans les intestins

La deuxième étape de digestion des protéines est similaire à celle observée chez les monogastriques. Elle débute dans la caillette où l'acidité de l'estomac ainsi que les sécrétions enzymatiques commencent à hydrolyser les différents composés. Au sortir de la caillette et à l'entrée du duodénum, le pH est ramené à sa neutralité par les sucs biliaires et le panel d'enzymes se voit complété par les enzymes intestinales et pancréatiques qui poursuivent la dégradation des protéines en peptides. Ces peptides sont ensuite absorbés par la paroi intestinale (Patton et al., 2014).

Une partie des protéines présentes dans l'intestin grêle n'est pas absorbée et poursuit sa route dans l'iléon/caecum où environ la moitié de ces protéines va être dégradée par les micro-organismes présents. Cette digestion post-intestinale apporte peu de protéines utilisables par l'animal puisque le produit majoritaire en résultant est sous forme de NH_3 , excrété par l'urine sous forme d'urée. Enfin, une dernière fraction des protéines n'est ni absorbée dans l'intestin grêle ni dégradée par les micro-organismes du gros intestin/caecum et se trouve donc excrétée dans le milieu extérieur dans les fèces (Chalupa, 1975; Jouany, 1994).

1.2.1.2. Variations des flux de protéines au duodénum avec les apports en azote ingéré

La quantité de protéines arrivant au duodénum est dépendante d'une part de la quantité d'azote ingéré et d'autre part des différents phénomènes digestifs qui ont lieu dans le rumen conduisant à trois types de flux d'azote au duodénum : microbien, alimentaire et endogène (Klusmeyer et al., 1990).

De façon générale, le flux d'azote non ammoniacal au duodénum (= microbien + alimentaire + endogène) augmente linéairement avec l'apport en protéines ingérées ainsi que la quantité de protéines non dégradables de la ration (Klusmeyer et al., 1990; Clark et al., 1992; Christensen et al., 1993; Cunningham et al., 1996; Ipharraguerre et Clark, 2005 et Figure 1.9).

Le flux d'azote d'origine microbienne ne semble pas être influencé par la quantité de protéines ingérées ou leur nature mais varie avec la quantité d'énergie disponible et la quantité de protéines dégradables dans le rumen (Klusmeyer et al., 1990; Clark et al., 1992; Stern et al., 1994; Cunningham et al., 1996; Firkins, 1996; Ipharraguerre et Clark, 2005; Patton et al., 2014 et Figure 1.9). Les protéines microbiennes ayant de plus un profil en AA assez bien équilibré, (Broderick et al., 1991; Patton et al., 2014), la stabilité du flux d'azote microbien au duodénum permet un apport protéique minimal à l'animal lui permettant de couvrir ses besoins d'entretien et d'assurer une certaine production laitière (INRA, 1978).

L'augmentation du flux total d'azote est majoritairement liée à l'augmentation du flux de protéines d'origine alimentaire. Ainsi, les flux d'azote non ammoniacal et non microbien (NANNM) augmentent avec l'augmentation de protéines ingérées et des protéines non dégradables dans le rumen bien que cette augmentation soit dépendante de la source protéique considérée (Klusmeyer et al., 1990; Clark et al., 1992; Cunningham et al., 1996; Ipharraguerre et Clark, 2005, 2014 et Figure 1.9).

La variation du flux d'azote alimentaire est le principal moyen de variation du profil AA total du duodénum (Broderick et al., 1991). En effet, le profil AA microbien est peu variable mais le profil AA alimentaire étant le même que celui de l'aliment ingéré (Rulquin and Vérité, 1993), sa digestibilité et son équilibre en AA varient considérablement (Patton et al., 2014). Le flux de protéines alimentaires représente ainsi entre 30 et 45% du flux total d'AA au duodénum (Patton et al., 2014).

Le flux d'azote d'origine endogène ne consiste pas un vrai apport protéique pour l'animal puisqu'il est issu d'un recyclage interne des protéines (Patton et al., 2014). Il est constitué du panel enzymatique sécrété par les différents organes pour dégrader les aliments ainsi que les cellules desquamées de la paroi du tube digestif. Il est estimé entre 1 et 15% du flux total d'AA au duodénum et augmente avec le niveau d'ingestion de l'animal pour pouvoir assurer la digestion intestinale lorsque le transit des aliments s'accélère (Lapierre et al., 2006; Patton et al., 2014; INRA, 2018).

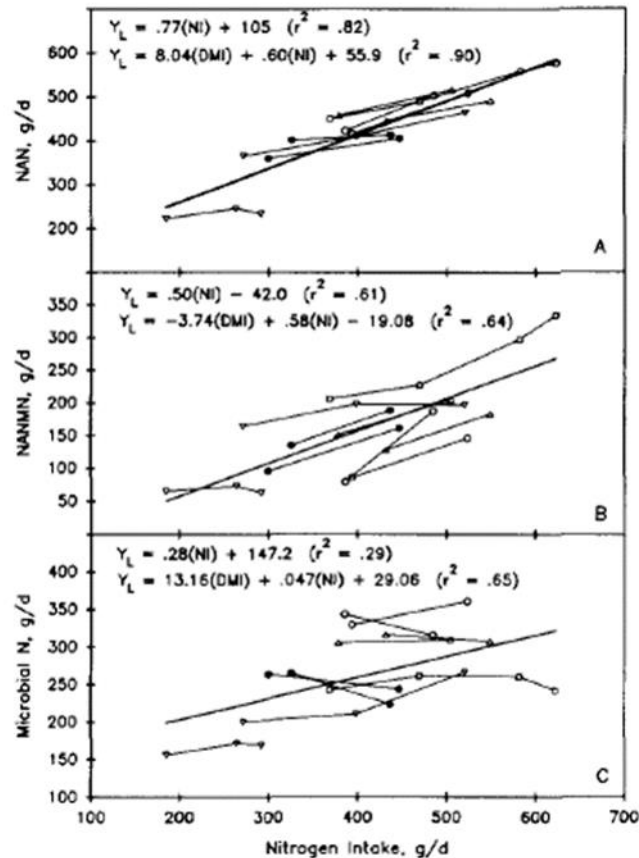


Figure 1.9. Relation entre l'azote ingéré et le flux d'azote non ammoniacal (NAN, A), le flux d'azote non ammoniacal non microbien (NANMN ; B) et le flux d'azote microbien (C) dans l'intestin grêle des vaches laitières (Clark et al., 1992)

1.2.1.3. De l'absorption par la paroi intestinale jusqu'à la captation par la glande mammaire

Les petits peptides issus de la digestion des protéines dans l'intestin grêle sont absorbés par la paroi de cet organe où le métabolisme intense des entérocytes les transforme en AA avant de se retrouver dans la circulation sanguine. Le rapport entre l'absorption des AA par la paroi intestinale et la digestion apparente dans la lumière du duodénum varie avec les AA de 0.43 (Thr) à 0.76 (Phe). Ce phénomène serait lié aux contributions différentes des sécrétions endogènes pré-duodénales, la non réabsorption de ces sécrétions endogènes et le catabolisme des AA dans l'intestin, entraînant une altération du profil en AA (Lapierre et al., 2006). L'ensemble des nutriments arrive ensuite directement dans le foie par la veine porte où les AA vont être plus ou moins prélevés par l'organe pour être catabolisés (Arriola Apelo et al., 2014). Ainsi, les AA ramifié (Leu, Ile et Val) et Lys sont faiblement prélevés par le foie alors que His,

Met et Phe ont des taux de prélèvement forts allant jusqu'à 50% pour Phe (Lapierre et al., 2006; Patton et al., 2014). Ce constat a conduit à la création de deux groupes d'AA en fonction de la site de catabolisme (Mephram, 1982; Lapierre et al., 2012) : le groupe 1 (somme de His, Met, Phe et Tyr) est préférentiellement catabolisé dans le foie alors que les AA du groupe 2 (somme de Ile, Leu, Lys et Val) sont catabolisés ailleurs que dans le foie majoritairement par la glande mammaire pendant la phase de lactation.

Après passage dans le foie, les AA sont distribués à l'ensemble de l'organisme par la circulation sanguine pour permettre à l'animal d'assurer le renouvellement de ces tissus et son métabolisme interne et les différentes fonctions de production (croissance, reproduction, lactation ; Figure 1.10). Chez la vache laitière en lactation, la glande mammaire est l'organe le plus gros consommateur d'AA pour assurer la synthèse des protéines secrétées dans le lait (Doepel et Lapierre, 2010). Cependant, son prélèvement dans la circulation sanguine dépend de l'activité des transporteurs membranaires, sous contrôle hormonal, et diffère donc en fonction des AA. Le taux de prélèvement serait ainsi de 43% pour les AA essentiel et de 30% pour les AA non essentiels. Parmi ces AA essentiels, les plus limitants seraient His, Met, Leu et Lys (Arriola Apelo et al., 2014; Patton et al., 2014).

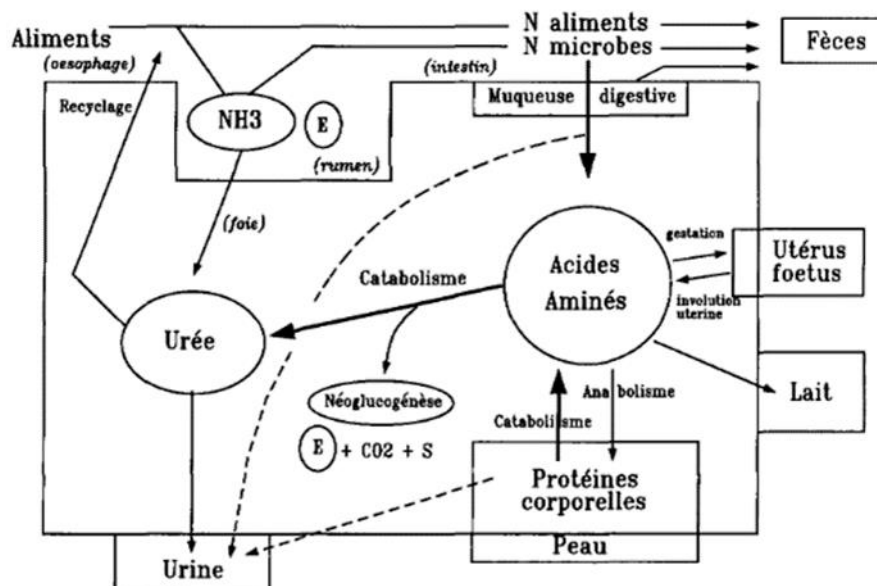


Figure 1.10. Digestion de l'azote et répartition du pool d'AA entre les différentes fonctions biologiques de l'animal (Peyraud, 1993)

L'ensemble de ces phénomènes digestifs des protéines décrit ci-dessus a été intégré dans les systèmes d'alimentation (NRC, 2001; NorFor, 2011; Van Duinkerken et al., 2011; Van Amburgh et al., 2015; INRA, 2018) sous le concept de protéine métabolisable. Dans le système français (INRA, 2018), ces protéines métabolisables correspondent aux **Protéines Digestible dans l'Intestin** (PDI) c'est-à-dire les protéines disparaissant de l'intestin. Elles correspondent aux protéines réellement disponibles pour l'animal pour assurer la couverture de ses besoins (entretien, lactation, croissance, reproduction). Elle se traduit au niveau des aliments par deux valeurs protéiques différentes : celle qui est issue de la dégradation par les micro-organismes dans le rumen (**PDI d'origine microbienne** (PDIM)) et celle arrivant directement dans l'intestin (**PDI d'origine alimentaire** (PDIA)). A partir de ces valeur PDI, des lois de réponses biologiques des animaux peuvent être déterminées notamment celles des AA plasmatiques et des matières protéiques du lait.

1.2.2. Lois de réponses des AA et des protéines du lait aux apports en protéines métabolisables

1.2.2.1. Réponses des AA plasmatiques aux apports en protéines métabolisables

Les variations des réponses en AA plasmatiques aux apports en protéines métabolisables sont variables en fonction des études. Globalement, sur régime alimentaire, lorsqu'une réponse des AA plasmatiques est observée, elle va dans le sens d'une augmentation de la concentration plasmatique avec les apports en protéines métabolisables (Tableau 1.1). La relation entre la concentration en AA plasmatiques et les apports en protéines métabolisables est majoritairement linéaire bien que Raggio et al. (2004) et Gidlund et al. (2015) observent des réponses quadratiques pour certains AA essentiels (Arg, His et Lys). Certains AA non essentiels (Glu et Gly) montrent plutôt une tendance à la décroissance de leur concentration plasmatique avec l'accroissement des apports. En analysant la relation entre les AA essentiels plasmatiques et leur flux respectifs en **AA digestible dans l'intestin** (AADI) par méta-analyse, Martineau et al. (2019) observent une relation linéaire et quadratique pour cinq des neuf AA essentiels (His, Ile, Leu, Lys et Val). A l'inverse, la réponse de Arg et Phe est uniquement linéaire et celle Met et Thr est quadratique. De plus, ces auteurs rapportent des relations différentes entre les AA plasmatiques et les apports en AADI en considérant soit les études réalisées par perfusion de caséine ou bien des études réalisées à partir de régimes alimentaires. La différence étant particulièrement marquée pour les AA ramifiés (Ile, Leu et Val) où les études par perfusion de

caséine donnent une relation linéaire avec les apports en AADI alors que celles réalisées à partir de régimes alimentaires donnent une réponse à la fois linéaire et quadratique (Figure 1.11).

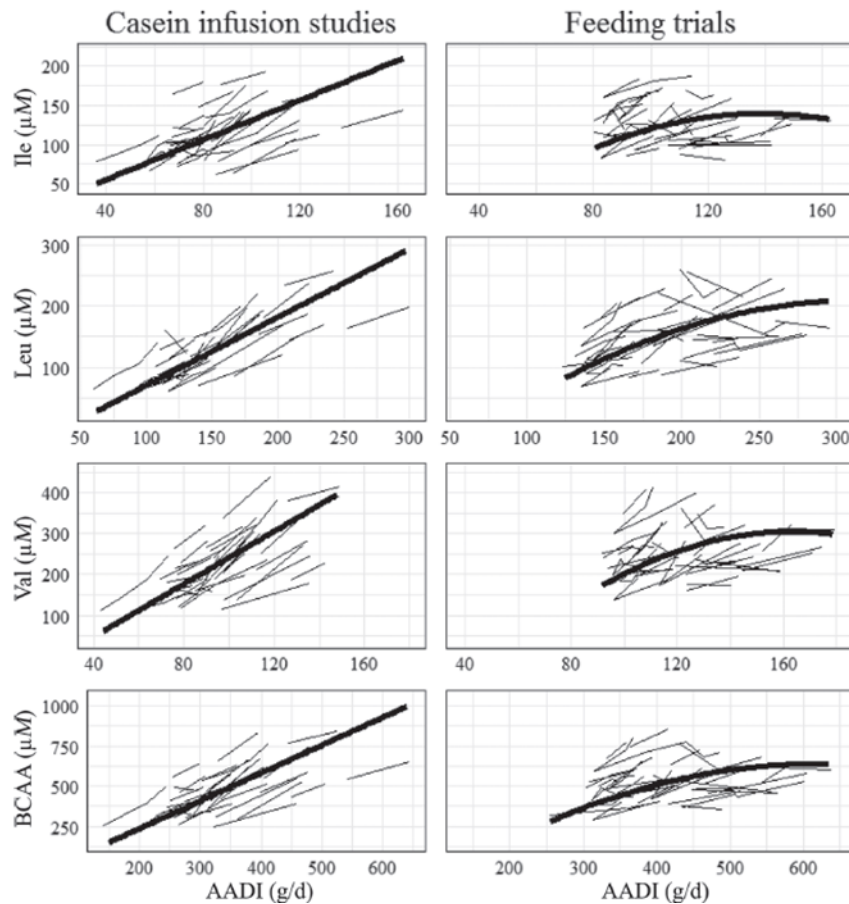


Figure 1.11. Relation entre la concentration plasmatique (μM) d'Ile, Leu, Val et AA ramifiés ($\text{BCAA} = \text{Ile} + \text{Leu} + \text{Val}$) et leurs flux respectifs en AA digestible dans l'intestin (AADI ; g/j) dans des études par perfusion de caséines (Casein infusion studies) et régimes alimentaires (Feeding trials). Chaque ligne représente une étude. La ligne en gras représente la relation linéaire ou quadratique obtenues par méta-analyse du dispositif (Martineau et al., 2019)

Tableau 1.1. Réponses des AA plasmatiques aux apports croissants en protéines métabolisables apportées par différentes sources dans les régimes (T : traitement ; FP : farine de poisson ; TS : tourteau de soja ; TSP : tourteau de soja protégé ; L : linéaire ; Q : quadratique ; c : croissant ; d : décroissant ; * : tendance ; -- : constant)

Publication	T	Réponse en AA plasmatiques																	
		Arg	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Trp	Val	Ala	Asp	Cys	Glu	Gly	Pro	Ser	Tyr
Blouin et al. (2002)	TS	d*	--	--	c	d*	--	--	--	--	d	--	--	d*	--	--	--	--	
Carder et Weiss (2017)	TSP ¹	--	c	d*	--	--	c	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
Garnsworthy et al. (2008)	TSP ²	--	c*	--	c	--	d	c	d*	--	--	--	--	--	d*	c	--	--	
Gidlund et al. (2015)	TS	Lc+Q*	Lc+Q*	Lc	Lc	Lc	--	Ld	--	--	Ld	--	--	--	--	--	--	Lc	
Haque et al. (2012)	TS	c	--	--	--	--	--	--	--	--	Lc	c	--	--	d	--	--	--	
Ouellet et al. (2013)	TS	--	Lc	Lc	--	--	--	--	--	--	Lc	--	--	--	Ld	--	--	--	
Raggio et al. (2004)	FP	--	Lc*	Lc	Lc	L+Qc	--	--	--	--	Lc	--	--	--	--	--	--	--	
Rius et al. (2010)	TSP ³	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	Ld	--	--	

¹ AminoPlus, Ag Processing Inc., Omaha, NE

² Soypass, Borregard LignoTech, Sarpborg, Norway

³ Hivap, Land O' Lakes/Purina Feed, Statesville, NC

Par ailleurs, l'influence de différents facteurs de variations tels que la proportion de protéines microbiennes au duodénum par rapport à la quantité de protéines métabolisables et donc le type de régime distribué aux animaux doivent induire des changements dans les relations présentées. Ainsi, Martineau et al. (2017) rapportent dans leur méta-analyse faite à partir d'études par perfusion de caséine que la réponse des AA plasmatiques est reliée positivement à l'apport en protéines métabolisable. Cependant, cette réponse varie pour certains AA (His) avec le rapport des protéines microbiennes du duodénum sur l'apport en protéines métabolisables probablement en lien avec la concentration faible en His des bactéries ruminales par rapport aux grains ou plantes protéiques.

Ainsi bien que différentes tendances se dessinent, la réponse de chaque AA aux apports en protéines métabolisables reste encore à caractériser de façon plus précise notamment en y intégrant différents facteurs de variations liés au régime alimentaire ingéré par les animaux.

1.2.2.2. Réponses des protéines du lait aux apports en protéines métabolisables

Les réponses de la production de protéines du lait aux apports en protéines métabolisables sont maintenant bien connues. Différentes études expérimentales se sont attachées à étudier l'effet de la quantité de protéines métabolisables (Gordon et Forbes, 1970; Krohn et Andersen, 1980; Macleod et al., 1984; Vérité et Delaby, 2000; Raggio et al., 2004; Metcalf et al., 2008; Brun-Lafleur et al., 2010; Bahrami-Yekdangi et al., 2014; Imran et al., 2017) sur la production de protéines du lait. Ces études rapportent toutes une augmentation des matières protéiques du lait avec l'augmentation en apports protéiques avec une réponse soit linéaire soit quadratique. Néanmoins, il est à noter que l'interaction entre les apports énergétiques et protéiques n'a pas toujours été prise en compte dans ces différentes études or cette interaction influence l'utilisation des nutriments par l'animal et notamment les réponses des performances laitières (Oldham, 1984). L'expérience menée par Brun-Lafleur et al. (2010) fait partie des rares études à avoir étudié de façon dissociée ces deux types d'apports. Les auteurs ont ainsi obtenu une réponse quadratique des matières protéiques du lait avec l'augmentation des apports en protéines métabolisables mais avec une amplitude de réponse dépendante de l'apport en énergie de la ration (Figure 1.12). Cette étude a également permis d'aboutir à des équations de prédiction de la réponse des performances laitières et donc de celle des matières protéiques du lait.

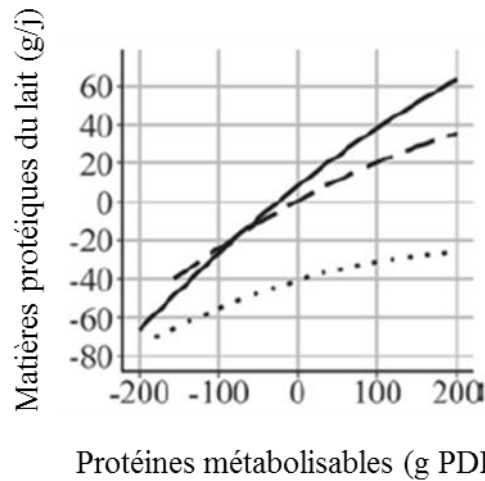


Figure 1.12. Réponses des matières protéiques du lait aux variations en apports en énergie (UFL/j) et en protéines métabolisables (g PDIE/j) : - 2 UFL/j (ligne pointillée), 0 UFL/j (ligne discontinue) et + 2 UFL/j (ligne pleine). Toutes les variables sont exprimées en différence du régime contrôle de l'essai (Brun-Lafleur et al., 2010)

Par la suite, différentes méta-analyses ont été conduites (Huhtanen et Nousiainen, 2012; Daniel et al., 2016; Moraes et al., 2018) pour générer des équations de prédiction de la réponse des performances laitières, matières protéiques comprise, aux variations aux apports alimentaires. Ces différentes études mettent bien en évidence l'effet additifs de l'énergie et des protéines sur les réponses laitières. De plus, ces équations permettant une bonne estimation des réponses de production, elles ont été intégrées dans le nouveau système d'alimentation français (Sauvant et al., 2015; INRA, 2018).

La digestion des protéines qui se déroule dans le duodénum abouti dans les systèmes d'alimentation au concept de protéines métabolisables (ou PDI pour le système français) qui correspond aux protéines réellement disponibles pour l'animal pour couvrir ses besoins et assurer ses différentes fonctions (lactation, croissance, reproduction) et donc à la valeur protéique de la ration ou des aliments qui la compose. La littérature montre que des lois de réponses des différentes fonctions biologiques peuvent être déterminées à partir de de ces protéines métabolisables. La réponse des matières protéiques du lait aux protéines métabolisables est maintenant bien connue et celles des AA plasmatiques commencent à être déterminées. Ainsi, ces réponses biologiques pourraient être de bons candidats à une nouvelle méthodologie d'estimation de la valeur protéique.

1.3. Références

- Arriola Apelo SI, Knapp JR and Hanigan MD 2014. Invited review: Current representation and future trends of predicting amino acid utilization in the lactating dairy cow. *Journal of Dairy Science* 97, 4000–4017.
- Bach A, Calsamiglia S and Stern MD 2005. Nitrogen Metabolism in the Rumen. *Journal of Dairy Science* 88, E9–E21.
- Bahrami-Yekdangi H, Khorvash M, Ghorbani GR, Alikhani M, Jahanian R and Kamalian E 2014. Effects of decreasing metabolizable protein and rumen-undegradable protein on milk production and composition and blood metabolites of Holstein dairy cows in early lactation. *Journal of Dairy Science* 97, 3707–3714.
- Baumont R et Deswysen AG 1991. Mélange et propulsion du contenu du réticulo-rumen. *Reproduction Nutrition Development* 31, 335–359.
- Bayourthe C, Moncoulon R and Enjalbert F 2000. Effect of particle size on in situ ruminal disappearances of pea (*Pisum sativum*) organic matter, proteins and starch in dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science* 80, 203–206.
- Beauchemin KA, McAllister TA, Dong Y, Farr BI and Cheng KJ 1994. Effects of mastication on digestion of whole cereal grains by cattle. *Journal of Animal Science* 72, 236–246.
- Bhatti SA and Firkins JL 1995. Kinetics of hydration and functional specific gravity of fibrous feed by-products. *Journal of animal science* 73, 1449–1458.
- Bjorndal KA, Bolten AB and Moore JE 1990. Digestive fermentation in herbivores: effect of food particle size. *Physiological Zoology* 63, 710–721.
- Blouin JP, Bernier JF, Reynolds CK, Lobley GE, Dubreuil P and Lapierre H 2002. Effect of supply of metabolizable protein on splanchnic fluxes of nutrients and hormones in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 85, 2618–2630.
- Broderick GA, Wallace RJ and Orskov ER 1991. Control of rate and extent of protein degradation. In *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants* (eds. T. Tsuda, Y. Sasaki and R. Kawasima), pp. 541–592. San Diego.
- Brun-Lafleur L, Delaby L, Husson F and Faverdin P 2010. Predicting energy × protein interaction on milk yield and milk composition in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93, 4128–4143.
- Campling RC and Freer M 1962. The effect of specific gravity and size on the mean time of retention of inert particles in the alimentary tract of the cow. *British Journal of Nutrition* 16, 507–518.

- Carder EG and Weiss WP 2017. Short- and longer-term effects of feeding increased metabolizable protein with or without an altered amino acid profile to dairy cows immediately postpartum. *Journal of Dairy Science* 100, 4528–4538.
- Chalupa W 1975. Rumen bypass and protection of proteins and amino acids. *Journal of Dairy Science* 58, 1198–1218.
- Christensen RA, Cameron MR, Klusmeyer TH, Elliott JP, Clark JH, Nelson DR and Yu Y 1993. Influence of amount and degradability of dietary protein on nitrogen utilization by dairy cows. *Journal of Dairy Science* 76, 3497–3513.
- Clark JH, Klusmeyer TH and Cameron MR 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 75, 2304–2323.
- Clauss M, Lechner I, Barboza P, Collins W, Tervoort TA, Südekum K-H, Codron D and Hummel J 2011. The effect of size and density on the mean retention time of particles in the reticulorumen of cattle (*Bos primigenius f. taurus*), muskoxen (*Ovibos moschatus*) and moose (*Alces alces*). *British Journal of Nutrition* 105, 634–644.
- Cunningham KD, Cecava MJ, Johnson TR and Ludden PA 1996. Influence of source and amount of dietary protein on milk yield by cows in early lactation. *Journal of Dairy Science* 79, 620–630.
- Daniel JB, Friggens NC, Chapoutot P, Van Laar H and Sauvant D 2016. Milk yield and milk composition responses to change in predicted net energy and metabolizable protein: a meta-analysis. *Animal* 10, 1975–1985.
- Dardillat C and Baumont R 1992. Physical characteristics of reticular content in the bovine and consequences on reticular outflow. *Reproduction Nutrition Development* 32, 21–36.
- DesBordes CK, Welch JG and others 1984. Influence of specific gravity on rumination and passage of indigestible particles. *Journal of Animal Science* 59, 470–475.
- Dewhurst RJ, Fisher WJ, Tweed JKS and Wilkins RJ 2003. Comparison of grass and legume silages for milk production. 1. production responses with different levels of concentrate. *Journal of Dairy Science* 86, 2598–2611.
- Dixon RM and Milligan LP 1985. Removal of digesta components from the rumen of steers determined by sieving techniques and fluid, particulate and microbial markers. *British Journal of Nutrition* 53, 347–362.
- Doepel L and Lapierre H 2010. Changes in production and mammary metabolism of dairy cows in response to essential and nonessential amino acid infusions. *Journal of Dairy Science* 93, 3264–3274.

- Ehle FR 1984. Influence of feed particle density on particulate passage from rumen of Holstein cow. *Journal of Dairy Science* 67, 693–697.
- Ehle FR and Stern MD 1986. Influence of particle size and density on particulate passage through alimentary tract of Holstein heifers. *Journal of Dairy Science* 69, 564–568.
- Evans E, Pearce GR, Burnett J and Pillinger SL 1973. Changes in some physical characteristics of the digesta in the reticulo-rumen of cows fed once daily. *British journal of nutrition* 29, 357–376.
- Faichney GJ 1984. The kinetics of particulate matter in the rumen. In *Control of digestion and metabolism in ruminants - Proceedings of the sixth international symposium on ruminant physiology* (eds. L.P. Milligan, W.L. Grovum and A. Dobson), Prentice-Hall, pp. 173–195. Banff, Canada.
- Faichney GJ 1993. Marker methods for measuring digesta flow. *British Journal of Nutrition* 70, 663–664.
- Firkins JL 1996. Maximizing microbial protein synthesis in the rumen. *The Journal of Nutrition* 126, 1347S-1354S.
- Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG, Newbold JR, Marsden M, Richards SE, Mann GE, Sinclair KD and Webb R 2008. Nutrition, metabolism, and fertility in dairy cows: 3. Amino acids and ovarian function. *Journal of Dairy Science* 91, 4190–4197.
- Gidlund H, Hetta M, Krizsan SJ, Lemosquet S and Huhtanen P 2015. Effects of soybean meal or canola meal on milk production and methane emissions in lactating dairy cows fed grass silage-based diets. *Journal of Dairy Science* 98, 8093–8106.
- Gordon FJ and Forbes TJ 1970. The associative effect of level of energy and protein intake in the dairy cow. *Journal of Dairy Research* 37, 481–491.
- Haque MN, Rulquin H, Andrade A, Faverdin P, Peyraud JL and Lemosquet S 2012. Milk protein synthesis in response to the provision of an “ideal” amino acid profile at 2 levels of metabolizable protein supply in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95, 5876–5887.
- Hooper AP and Welch JG 1985. Effects of particle size and forage composition on functional specific gravity. *Journal of Dairy Science* 68, 1181–1188.
- Hristov AN, Ahvenjarvi S, McAllister TA and Huhtanen P 2003. Composition and digestive tract retention time of ruminal particles with functional specific gravity greater or less than 1.02. *Journal of animal science* 81, 2639–2648.
- Huhtanen P and Nousiainen J 2012. Production responses of lactating dairy cows fed silage-based diets to changes in nutrient supply. *Livestock Science* 148, 146–158.

- Imran M, Pasha TN, Shahid MQ, Babar I and Naveed Ul Haque M 2017. Effect of increasing dietary metabolizable protein on nitrogen efficiency in Holstein dairy cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 30, 660–665.
- INRA 1978. *Alimentation des ruminants*. Versailles, France.
- INRA 2018. *INRA feeding system for ruminants*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.
- Ipharraguerre IR and Clark JH 2005. Impacts of the source and amount of crude protein on the intestinal supply of nitrogen fractions and performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88 Suppl. 1 (13), E22-37.
- Ipharraguerre IR and Clark JH 2014. A meta-analysis of ruminal outflow of nitrogen fractions in dairy cows. *Journal of advances in dairy research* 2, 122.
- Jouany J-P 1994. Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. *INRA Productions Animales* 7, 207–225.
- Kaske M and Engelhardt WV 1990. The effect of size and density on mean retention time of particles in the gastrointestinal tract of sheep. *British Journal of Nutrition* 63, 457–465.
- Kennedy PM 2005. Particle dynamics. In *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism - Second Edition* (eds. J. Dijkstra, J.M. Forbes and J. France), pp. 123–156. Cambridge, USA.
- Klusmeyer TH, McCarthy RD, Clark JH and Nelson DR 1990. Effects of source and amount of protein on ruminal fermentation and passage of nutrients to the small intestine of lactating cows. *Journal of Dairy Science* 73, 3526–3537.
- Kornfelt LF 2012. Physical degradation of forage particles and digestion of structural fibre in alfalfa, red and white clover crops fed to cattle. *Veterinary clinical and animal science Thesis*. Copenhagen, Copenhagen, 92pp.
- Krohn CC and Andersen PE 1980. Different energy and protein levels for dairy cows in the early weeks of lactation. *Livestock Production Science* 7, 555–568.
- Lapierre H, Lobley GE, Doepel L, Raggio G, Rulquin H and Lemosquet S 2012. TRIENNIAL LACTATION SYMPOSIUM: Mammary metabolism of amino acids in dairy cows,. *Journal of Animal Science* 90, 1708–1721.
- Lapierre H, Pacheco D, Berthiaume R, Ouellet DR, Schwab CG, Dubreuil P, Holtrop G and Lobley GE 2006. What is the True Supply of Amino Acids for a Dairy Cow? *Journal of Dairy Science* 89, E1–E14.
- Lechner I, Barboza P, Collins W, Fritz J, Günther D, Hattendorf B, Hummel J, Südekum K-H and Clauss M 2010. Differential passage of fluids and different-sized particles in fistulated oxen

(*Bos primigenius f. taurus*), muskoxen (*Ovibos moschatus*), reindeer (*Rangifer tarandus*) and moose (*Alces alces*): Rumen particle size discrimination is independent from contents stratification. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 155, 211–222.

Lechner-Doll M, Kaske M and Engelhardt WV 1991. Factors affecting the mean retention time of particles in the forestomach of ruminants and camelids. In *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants* (eds. T. Tsuda, Y. Sasaki and R. Kawasima), pp. 455–482. San Diego.

Lindberg JE 1985. Retention time of chromium-labelled feed particles and of water in the gut of sheep given hay and concentrate at maintenance. *British Journal of Nutrition* 53, 559.

Lykos T and Varga GA 1995. Effects of Processing Method on Degradation Characteristics of Protein and Carbohydrate Sources In Situ. *Journal of Dairy Science* 78, 1789–1801.

Macleod GK, Grieve DG, McMillan I and Smith GC 1984. Effect of varying protein and energy densities in complete rations fed to cows in first lactation. *Journal of Dairy Science* 67, 1421–1429.

Mambrini M 1990. Etude du temps de séjour des résidus alimentaires dans le tube digestif des vaches laitières : Aspects méthodologiques et facteurs de variation. *Sciences Biologiques Thesis*. Université de Rennes 1, Rennes, 171pp.

Martineau R, Ouellet DR, Kebreab E, White RR and Lapierre H 2017. Relationships between postruminal casein infusion and milk production, and concentrations of plasma amino acids and blood urea in dairy cows: A multilevel mixed-effects meta-analysis. *Journal of Dairy Science* 100, 8053–8071.

Martineau R, Ouellet DR, Patton RA, White RR and Lapierre H 2019. Plasma essential amino acid concentrations in response to casein infusion or ration change in dairy cows: A multilevel, mixed-effects meta-analysis. *Journal of Dairy Science* 102, 1312–1329.

Martz FA and Belyea RL 1986. Role of particle size and forage quality in digestion and passage by cattle and sheep. *Journal of Dairy Science* 69, 1996–2008.

Mepham TB 1982. Amino Acid Utilization by Lactating Mammary Gland. *Journal of Dairy Science* 65, 287–298.

Metcalf JA, Mansbridge RJ, Blake JS, Oldham JD and Newbold JR 2008. The efficiency of conversion of metabolisable protein into milk true protein over a range of metabolisable protein intakes. *animal* 2, 1193–1202.

Michalet-Doreau B and Cerneau P 1991. Influence of foodstuff particle size on in situ degradation of nitrogen in the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 35, 69–81.

- Moore LA 1964. Symposium on forage utilization: nutritive value of forage as affected by physical form. Part I. General principles involved with ruminants and effect of feeding pelleted or wafered forage to dairy cattle. *Journal of Animal Science* 23, 230–238.
- Moraes LE, Kebreab E, Firkins JL, White RR, Martineau R and Lapierre H 2018. Predicting milk protein responses and the requirement of metabolizable protein by lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 101, 310–327.
- Murphy MR, Kennedy PM and Welch JG 1989. Passage and rumination of inert particles varying in size and specific gravity as determined from analysis of faecal appearance using multicompartment models. *British Journal of Nutrition* 62, 481–492.
- National Research Council (NRC) 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. National Academy of Sciences, Washington, DC, USA.
- NorFor 2011. The Nordic feed evaluation system. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands.
- Olaisen V 2001. Degradation and passage kinetics of concentrate particles and solubles in the rumen. *Fakultet for naturvitenskap og teknologi*.
- Oldham JD 1984. Protein-energy interrelationships in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 67, 1090–1114.
- Ouellet DR, Valkeners D and Lapierre H 2013. Effects of metabolizable protein supply on N efficiency: plasma amino acid concentrations in dairy cows. In *Energy and protein metabolism and nutrition in sustainable animal production* (eds. J.W. Oltjen, E. Kebreab and H. Lapierre), pp. 453–454. Wageningen Academic Publishers, Wageningen.
- Patton RA, Hristov AN and Lapierre H 2014. Protein feeding and balancing for amino acids in lactating dairy cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 30, 599–621.
- Peyraud J-L 1993. Comparaison de la digestion du trèfle blanc et des graminées prairiales chez la vache laitière. *Fourrages* 135, 465–473.
- Poppi DP, Norton BW, Minson DJ and Hendricksen RE 1980. The validity of the critical size theory for particles leaving the rumen. *The Journal of Agricultural Science* 94, 275–280.
- Raggio G, Pacheco D, Berthiaume R, Lobley GE, Pellerin D, Allard G, Dubreuil P and Lapierre H 2004. Effect of level of metabolizable protein on splanchnic flux of amino acids in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 87, 3461–3472.
- Rémond B, Brugère H, Poncet C et Baumont R 1995. Le contenu du réticulo-rumen. In *Nutrition des ruminants domestiques : ingestion et digestion* (eds. R. Jarrige, Y. Ruckebusch, C. Demarquilly, M.-H. Farce and M. Journet), p. 921. Paris.

- Reynolds CK and Kristensen NB 2007. Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: An asynchronous symbiosis. *Journal of Animal Science* 86, E293–E305.
- Rius AG, McGilliard ML, Umberger CA and Hanigan MD 2010. Interactions of energy and predicted metabolizable protein in determining nitrogen efficiency in the lactating dairy cow. *Journal of Dairy Science* 93, 2034–2043.
- Rulquin H and Vérité R 1993. Amino acid nutrition of dairy cows: productive effects and animal requirements. In *Recent advances in animal nutrition* (eds. P.C. Garnsworthy and D.J.A. Cole), pp. 55–77. Nottingham University Press, Nottingham, England.
- Sauvant D 2000. Granulométrie des rations et nutrition du ruminant. *INRA Production Animale* 13, 99–108.
- Sauvant D, Cantalapiedra-Hijar G, Delaby L, Daniel J-B, Faverdin P et Nozière P 2015. Actualisation des besoins protéiques des ruminants et détermination des réponses des femelles laitières aux apports de protéines digestibles dans l'intestin. *INRA Production Animale* 28, 347–368.
- Sauvant D, Grenet E et Doreau M 1995. Dégradation chimique des aliments dans le réticulo-rumen : cinétique et importance. In *Nutrition des ruminants domestiques : ingestion et digestion* (eds. R. Jarrige, Y. Ruckebusch, C. Demarquilly, M.-H. Farce and M. Journet), p. 921. Paris.
- Siciliano-Jones J and Murphy MR 1991. Specific gravity of various feedstuffs as affected by particle size and in vitro fermentation. *Journal of Dairy Science* 74, 896–901.
- Stern MD, Varga GA, Clark JH, Firkins JL, Huber JT and Palmquist DL 1994. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science* 77, 2762–2786.
- Sutherland TM 1988. Particle separation in the forestomachs of sheep. In *Aspects of Digestive Physiology in Ruminants* (eds. A. Dobson and M.J. Dobson), Comstock Publishing Associates, pp. 43–73. Ithaca, New York.
- Uyatt MJ, Dellow DW, John A, Reid CSW and Waghorn GC 1986. Contribution of chewing during eating and rumination to the clearance of digesta from the rumenoreticulum. In *Control of digestion and metabolism in ruminants* (eds. L.P. Milligan, W.L. Grovum and A. Dobson). Eglewood Cliffs, NJ.
- Van Amburgh ME, Collao-Saenz EA, Higgs RJ, Ross DA, Recktenwald EB, Raffrenato E, Chase LE, Overton TR, Mills JK and Foskolos A 2015. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System: updates to the model and evaluation of version 6.5. *Journal of Dairy Science* 98, 6361–6380.

- Van Duinkerken G, Blok MC, Bannink A, Cone JW, Dijkstra J, Van vuuren AM and Tamminga S 2011. Update of the Dutch protein evaluation system for ruminants: the DVE/OEB2010 system. *Journal of Animal Science* 149, 351–367.
- Vérité R and Delaby L 2000. Relation between nutrition, performances and nitrogen excretion in dairy cows. *Annales de zootechnie* 49, 217–230.
- Wadhwa M, Paul D, Kataria P and Bakshi MPS 1998. Effect of particle size of corn grains on the release of nutrients and in sacco degradability. *Animal Feed Science and Technology* 72, 11–17.
- Waghorn GC, Shelton ID and Thomas VJ 1989. Particle breakdown and rumen digestion of fresh ryegrass (*Lolium perenne* L.) and lucerne (*Medicago sativa* L.) fed to cows during a restricted feeding period. *The British Journal of Nutrition* 61, 409–423.
- Waldo DR, Smith LW, Cox EL, Weinland BT and Lucas HL 1971. Logarithmic normal distribution for description of sieved forage materials. *Journal of Dairy Science* 54, 1465–1469.
- Wattiaux MA, Mertens DR and Satter LD 1991. Effect of source and amount of fiber on kinetics of digestion and specific gravity of forage particles in the rumen. *Journal of Dairy Science* 74, 3872–3883.
- Wattiaux MA, Satter LD and Mertens DR 1992. Effect of microbial fermentation on functional specific gravity of small forage particles. *Journal of Animal Science* 70, 1262–1270.
- Welch JG 1982. Rumination, particle size and passage from the rumen. *Journal of Animal Science* 54, 885–894.
- Welch JG 1986. Physical parameters of fiber affecting passage from the rumen. *Journal of Dairy Science* 69, 2750–2754.
- Welch JG 1990. Inert plastics as indicators of physiological processes in the gastrointestinal tract of ruminants. *Journal of Animal Science* 68, 2930–2935.
- Welch JG and Smith AM 1978. Particle sizes passed from rumen. *Journal of Animal Science* 46, 309–312.

Chapitre 2 – Questions et stratégie de recherche

L'intégration des multiples enjeux économiques, environnementaux et sociétaux dans le secteur laitier conduit à la nécessité d'économiser les protéines végétales dans l'alimentation des vaches laitières qui aboutit à deux enjeux de recherche qui seront l'objet de ce travail de thèse.

Le premier concerne les leviers permettant de limiter la dégradation des protéines dans le rumen et augmenter la fraction protéique alimentaire non dégradée dans le rumen et directement disponibles dans l'intestin pour couvrir les besoins de vaches à haut niveau de production en améliorant les processus industriels de protection des aliments, notamment concentrés existants ou trouver de nouvelles possibilités d'action pour accroître la valeur protéique globale de la ration. Plus particulièrement il s'agit de définir dans quelle mesure les caractéristiques physiques telles que la taille et la densité des particules peuvent être utilisées pour réduire le temps de séjour dans le rumen, augmentant ainsi la fraction de protéines d'origine alimentaire arrivant au duodénum.

La seconde concerne le développement de nouvelles méthodes d'estimation de la valeur protéique des aliments. Jusqu'à présent ces méthodes étaient basées sur des tests d'incubation *in vitro* avec des tampons ou des enzymes ou encore avec micro-organismes mis en culture ou sur des tests d'incubation *in sacco* réalisés directement sur les matières premières traitées pour en limiter la dégradation dans le rumen. Ces méthodes ne permettent pas de prendre en compte de nouvelles techniques de protection des aliments, telles que l'addition d'additifs alimentaires qui affectent l'ensemble de l'activité microbienne du rumen, et ne permettent pas de répondre aux attentes de la société en terme de bien-être animal. Plus particulièrement, il s'agit de déterminer si les réponses biologiques des animaux en termes de concentrations en acides aminés plasmatiques ou de matières protéiques du lait pouvaient être utilisées comme base d'une nouvelle méthodologie pour estimer la valeur protéique des aliments.

Le raisonnement amenant à ces deux questions de recherche ainsi que les hypothèses associées est détaillé ci-dessous et synthétisé dans la Figure 2.2.

Objectif 1 : Utilisation des caractéristiques physiques des particules pour réduire leur temps de séjour dans le rumen

La première voie d'action visant à économiser les protéines végétales dans l'alimentation des vaches laitières consiste à augmenter la fraction de protéines d'origine alimentaire (i.e. non dégradées dans le rumen) arrivant au duodénum. La synthèse bibliographique a bien mis en évidence les deux facteurs pouvant faire varier cette fraction : le taux de dégradabilité de l'aliment et le temps de séjour de la particule dans le rumen. Les différents facteurs influençant

le taux de dégradation ont déjà fait l'objet de recherche dans le cadre de la mise en place des différents processus industriels visant à protéger les concentrés de la dégradation ruminale (chauffage provoquant des réactions de Maillard, encapsulage, tannage avec des chélates ou des tanins chimiques ou naturels dont jusqu'à encore récemment le tannage au formaldéhyde). En revanche, la modification du temps de séjour des particules dans le rumen ne semble pas avoir été envisagé comme levier pour augmenter la fraction de protéines d'origine alimentaire au duodénum. La synthèse bibliographique rapporte qu'une réduction du temps de séjour des particules entraîne une réduction du taux de dégradabilité de l'aliment par un temps moins long accordé aux micro-organismes pour dégrader l'aliment ce qui conduit à une fraction de protéines d'origine alimentaire au duodénum plus importante. Les données de la littérature montrent que la taille des particules et leur densité spécifique affectent leur temps de séjour dans le rumen mais les interactions entre taille et densité spécifique n'ont pratiquement pas été abordées et la majorité de ces résultats ont été obtenus grâce à des études portant sur les fourrages. Elles ne peuvent pas s'appliquer aux apports de protéine par les aliments concentrés qui sont le plus souvent présentés sous forme broyée ou de pellets reconstitués en filière. La première partie de ce travail (Partie 1) s'est donc attachée à répondre à la question suivante :

Est-ce que les caractéristiques physiques (taille et densité spécifique) des particules de concentrés peuvent être utilisées pour réduire leur temps de séjour dans le rumen ?

Les hypothèses testées pour répondre à cette question sont les suivantes :

- Il existe une zone de taille et de densité correspondant aux conditions de sortie du rumen qui permet de réduire au maximum le temps de séjour des particules dans cet organe
- Les variations du temps de séjour par modification de la taille des concentrés protéiques permettent une réponse au niveau des performances laitières des animaux

Deux essais ont été mis en place pour répondre à chacune de ces hypothèses.

Le premier essai (Exp 1) porte sur l'influence de la taille et de la densité des particules sur le temps de séjour dans le rumen. L'excrétion fécale de particules de plastique de quatre tailles et quatre densités correspondant à la gamme des concentrés protéiques a été suivie sur quatre vaches en lactation suivant un schéma en carré latin de quatre périodes d'une semaine. Cet essai a également permis la mise au point d'une méthode de séparation et de comptage des particules de plastique après transit dans l'animal basée sur de l'analyse d'image. Il est présenté au Chapitre 3 de ce document.

Le deuxième essai (Exp 2) teste l'influence de la présentation physique du concentré, présenté sous forme de pellet ou sous forme de farine grossière, sur les performances laitières des animaux. L'essai comprend 24 vaches en lactation qui ont reçues les deux types de tourteaux selon un schéma en inversion de deux périodes de deux semaines. Il est présenté au Chapitre 4.

Objectif 2 : Estimer la valeur protéique des aliments à partir des réponses biologiques des animaux

La deuxième voie envisagée pour économiser les protéines végétales dans l'alimentation des vaches laitières consiste à formuler les rations des animaux au plus proche de leurs besoins à partir de la connaissance de la quantité de protéines réellement disponibles pour l'animal au niveau du duodénum.

Les différentes méthodes existantes actuellement pour estimer la valeur protéique des aliments (*in vitro*, *in sacco*) sont rapides et reproductibles mais sont sujettes à des biais. En particulier les résultats ne sont pas toujours extrapolables au cas *in vivo* et elles sont plus adaptées à la mesure de la valeur d'un aliment que d'une ration. Notamment, elles ne permettent pas de prendre en compte les techniques de protection des protéines qui s'orientent actuellement plus sur des effets « systémiques », diffusant dans tout le rumen, ou de prendre en compte des modifications du temps de séjour des aliments dans le rumen. Les points nécessaires à la mise en place d'une nouvelle méthode plus intégrative sont : une réponse *in vivo* de l'animal est souhaitable pour intégrer l'ensemble des phénomènes digestifs ruminiaux et ainsi être le plus représentatif possible. De plus, la méthode doit pouvoir s'affranchir de l'utilisation d'animaux fistulés qui reste une méthode contraignante.

La synthèse bibliographique a permis de montrer que les réponses *in vivo* des animaux aux apports de protéines métabolisables sont maintenant relativement bien connues et pourraient être utilisées pour évaluer la valeur des rations ou d'aliments d'une ration ou de modification de l'activité fermentaire du rumen sous l'effet d'additifs alimentaires. La réponse des acides aminés plasmatiques n'est pas encore perçue dans toute sa complexité mais il est bien établi que l'augmentation des apports en protéines métabolisables entraîne une augmentation de la concentration en acides aminés plasmatiques. La réponse de la production de matières protéiques du lait aux apports en protéines métabolisables est, elle, mieux maîtrisée. Les matières protéiques du lait augmentent de façon curvilinéaire avec les apports en protéines métabolisables, l'efficacité de leur utilisation diminuant avec le niveau des apports. Cette

réponse est modulée par les apports en énergie et les quantités ingérées mais ces interactions ont aussi bien été quantifiées. La deuxième partie de ce travail (Partie 2) vise à répondre à la question suivante :

Est-ce que les réponses biologiques des animaux (acides aminés plasmatiques et matières protéiques du lait) peuvent servir de support à la mise en place d'une nouvelle méthodologie d'estimation de la valeur protéique des aliments ?

Pour répondre à cette question, les hypothèses suivantes ont été formulées et schématisée sur la Figure 2.1 :

- La réponse biologique des animaux peut être obtenue à partir de deux régimes contrôles de valeur protéique connue
- La valeur protéique d'un aliment inconnu peut être estimée à partir de cette réponse biologique

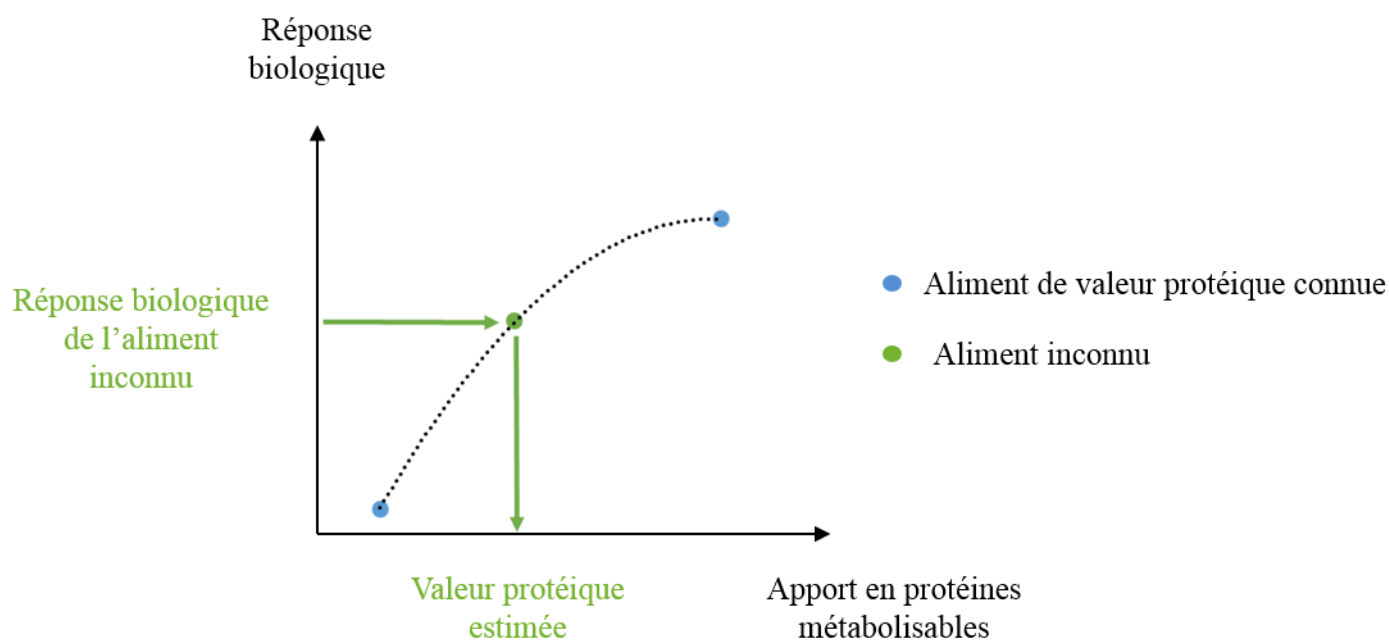


Figure 2.1. Principe de la méthodologie d'estimation de la valeur protéique des aliments à partir de la réponse biologique des animaux. Chaque réponse biologique testée (ligne pointillée) est déterminée à partir des deux aliments de valeur protéique connue soit directement en cas de linéarité soit indirectement en cas de réponse courbe.

Pour répondre à ces hypothèses quatre régimes alimentaires, composés de deux régimes contrôles de valeur protéique connue et deux régimes de valeur protéique inconnue, ont été distribués à des vaches laitières selon un schéma en carré latin.

Un essai a été mis en place avec 4 vaches fistulées (Exp 3a, Chapitre 6). Il correspond à la méthode classique *in vivo* de mesure des flux d'acides aminés duodénaux totaux.

Un essai avec 24 vaches laitières (Exp 3b) a permis de tester la réponse des acides aminés plasmatiques (Chapitre 7) et celle des matières protéiques du lait (Chapitre 8) comme base d'une nouvelle méthode pour estimer la valeur protéique des aliments. Le matériels et méthodes de l'Exp 3a et Exp 3b est présenté au Chapitre 5.

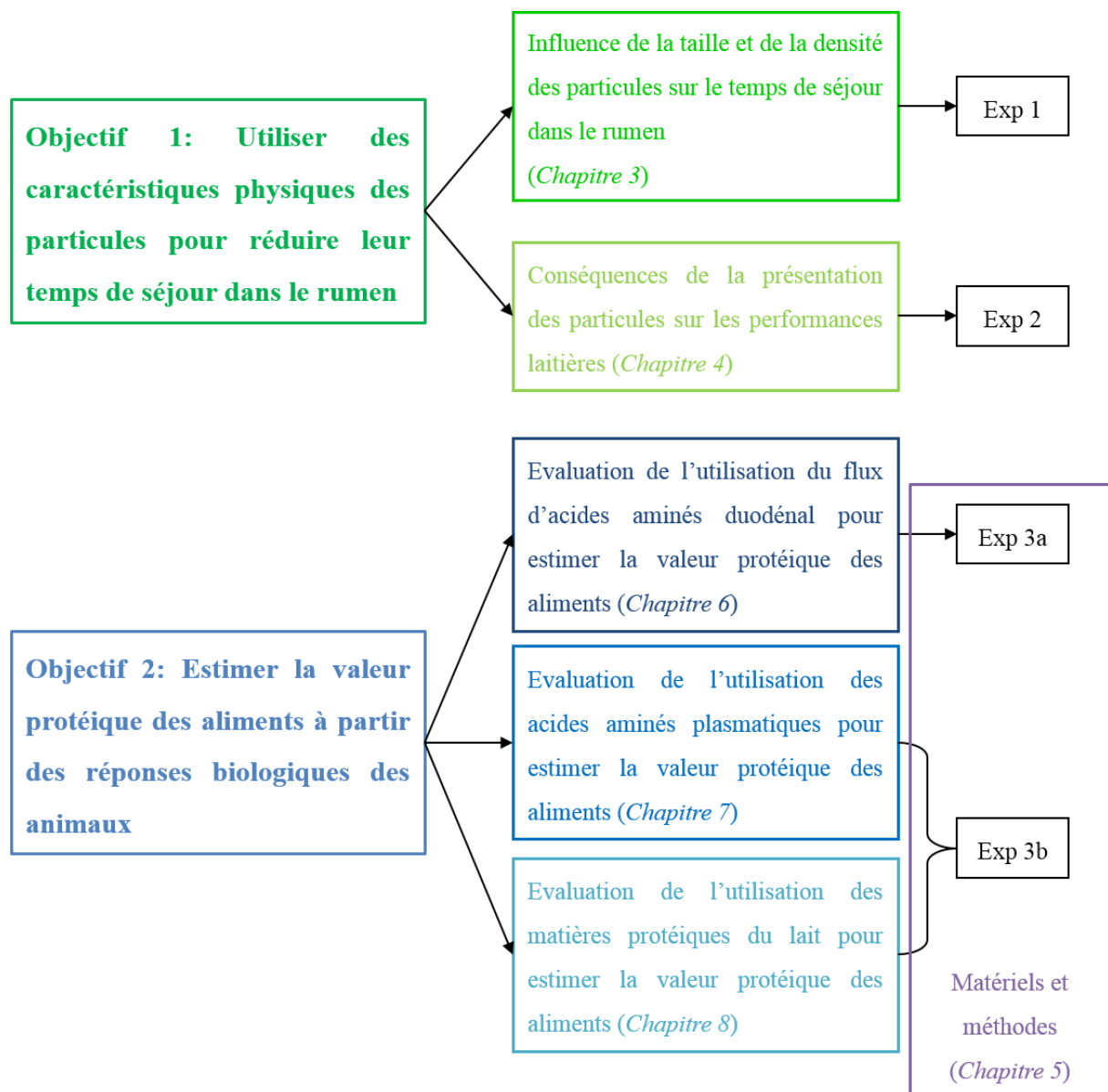
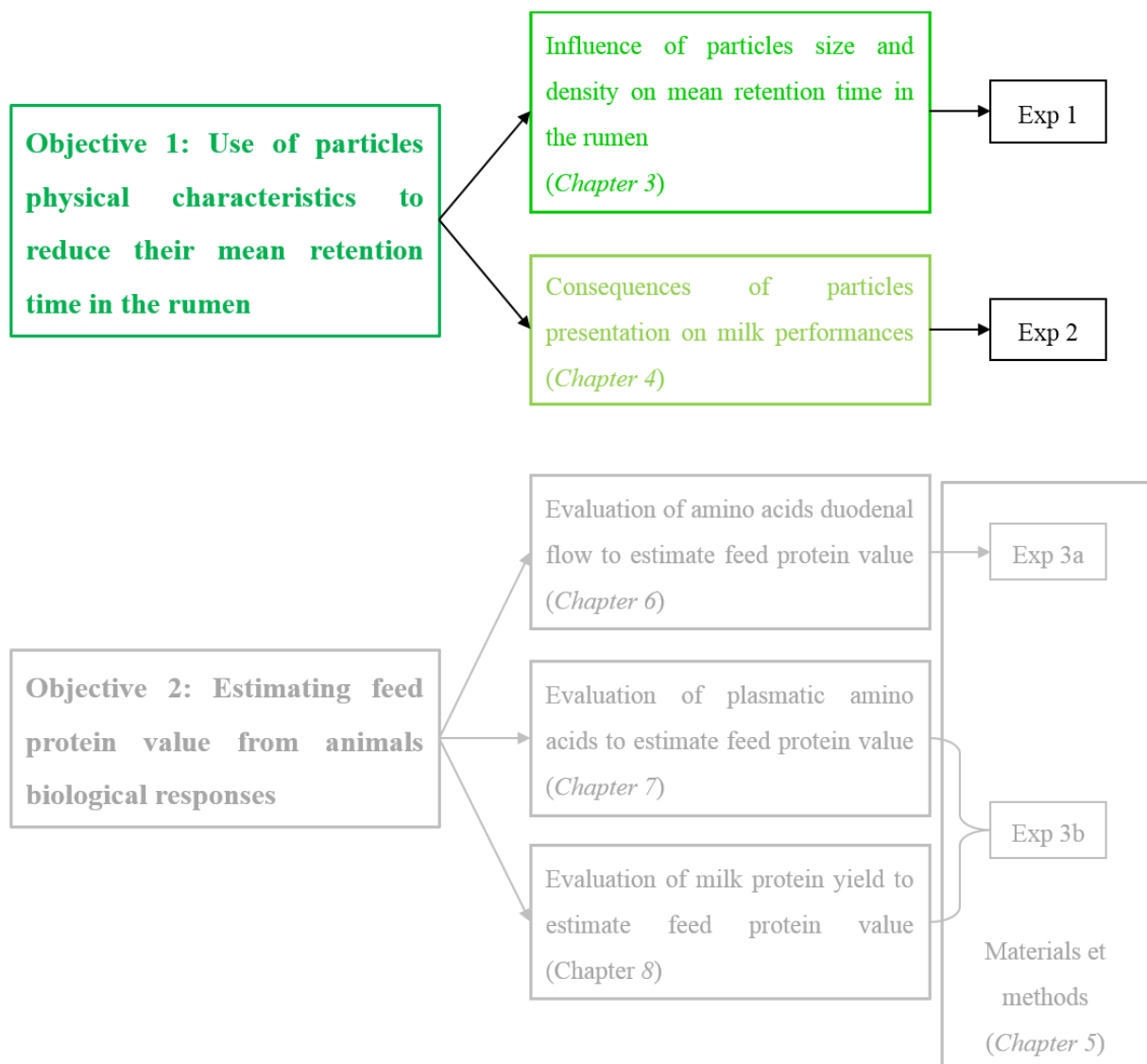
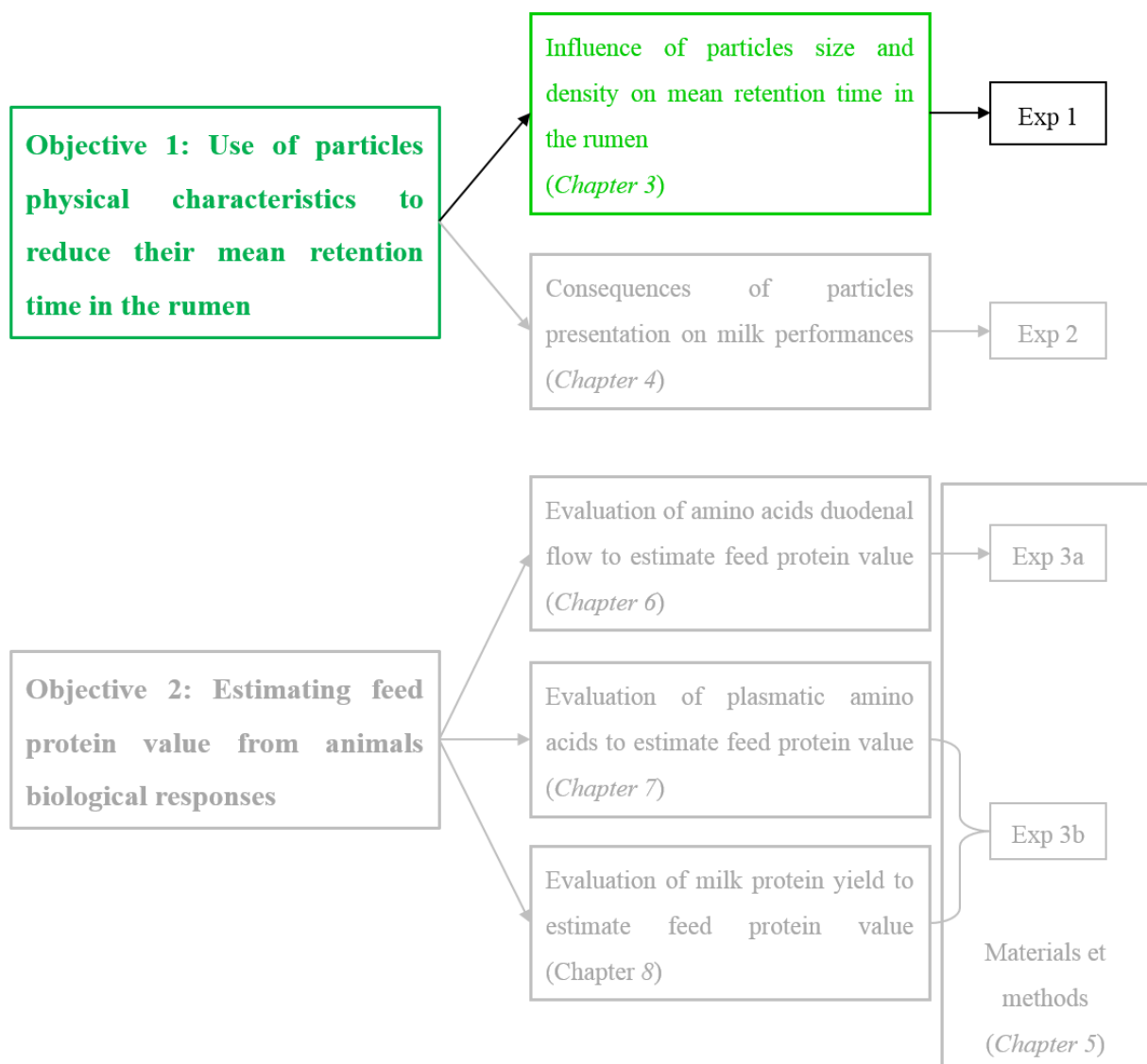


Figure 2.2. Objectifs de la thèse, structuration du projet de recherche et organisation du manuscrit

Part 1 – Use of particles physical characteristics to reduce their mean retention time in the rumen



Chapter 3 – Influence of particle size and density on mean retention time in the rumen



Résumé

Augmenter la fraction de protéine non dégradables dans le rumen est un des défis de la nutrition des ruminants pour à la fois couvrir les besoins des animaux ainsi que d'augmenter l'efficacité d'utilisation de l'azote pour réduire son excrétion dans l'environnement. Les procédés utilisant le chauffage ou le tannage pour réduire la dégradation des protéines dans le rumen montrent certaines limites telles que la difficulté à trouver un compromis entre une faible dégradabilité ruminale et une forte digestibilité intestinale. Réduire le temps moyen de séjour (TMS) dans le rumen en faisant varier la taille et la densité des particules peut être une voie alternative pour augmenter la proportion de protéines non dégradées des concentrés et augmenter l'efficacité de ces processus industriels. Des particules de plastique sphériques de trois diamètres (1, 2 et 3mm) et quatre densités (0,9 – 1,1 – 1,3 – 1,5) ont été utilisées pour étudier l'effet combiné de la taille et de la densité sur le TMS des particules sans interactions avec les fermentations ruminales. La dynamique d'excrétion des particules dans les fèces de quatre vaches laitières a été suivie pendant 106 h (17 prélèvements) suivant un schéma en carré Latin. L'excrétion cumulée des particules a été ajustée à un modèle à double exponentiels pour calculer le TMS dans le tube digestif (TMST), le TMS dans deux compartiments (TMS1 et TMS2) et le temps de rétention dans la section tubulaire des intestins (TT). La densité a un effet quadratique sur le TMS avec le temps le plus court pour les densités 1,1 et 1,3 (29,5 et 31,2 h respectivement) par rapport aux densités 0,9 et 1,5 (TMST = 64,0 et 51,2 h respectivement). Une réponse similaire a été observé pour TMS1, qui a été associé au TMS dans le rumen, pour les densités 1,1 et 1,3 (8,9 et 10,5 h respectivement) par rapport aux densités 0,9 et 1,5 (39,6 et 22,6 h respectivement). La différence de diamètres a un effet linéaire sur le TMST (plus long de 12,9 h pour la taille 3mm par rapport à 1mm) et sur le TT. Un effet combiné de la taille et de la densité a été observé et la taille des particules n'a pas d'effet sur le TMST lorsque la densité est comprise entre 1,1 et 1,3, en dehors de cette gamme, une augmentation de diamètre entraîne une augmentation du TMST. Par conséquent, une densité entre 1,2 et 1,3 est optimale pour une sortie des particules. Comme les petites particules de concentrés perdent leur densité spécifique fonctionnelle plus rapidement que des particules plus grandes lié à un taux de fermentation plus élevé, nos résultats, obtenus avec des particules de plastique, suggèrent qu'un diamètre légèrement supérieur à 3 mm serait un compromis entre un retard dans le départ des fermentations et un passage rapide par l'orifice réticulo-omasal.



J. Dairy Sci. 102:1–13
<https://doi.org/10.3168/jds.2018-15926>

© American Dairy Science Association®, 2019.

Influence of particle size and density on mean retention time in the rumen of dairy cows

F. Dufreneix,^{1,2} P. Faverdin,¹ and J.-L. Peyraud^{1*}

¹Physiologie, Environnement et Génétique de l'Animal et des Systèmes d'Élevage, Agrocampus Ouest, INRA, F-35590 Saint-Gilles, France

²Agrial, 4 rue des Roquemonts, F-14000 Caen, France

ABSTRACT

Increasing rumen-undegraded protein is one challenge of ruminant nutrition to both meet protein requirements of animals and reduce nitrogen excretion in the environment by increasing nitrogen efficiency. Industrial processes using heat or tanning to reduce rumen protein degradation have certain limitations, such as difficulty in balancing low ruminal degradation and high intestinal digestibility. Reducing the mean retention time (MRT) in the rumen by varying the size and density of particles may be another promising way to increase the rumen-undegraded protein proportion of concentrate feeds and improve the effectiveness of industrial processes. Spherical plastic particles of 3 mean diameter sizes (1, 2, and 3 mm) and 4 densities (0.9, 1.1, 1.3, and 1.5) were used to study the combined effect of size and density on the MRT of particles without interactions with microbial fermentations. Dynamics of fecal excretion of particles were monitored over 106 h (17 sampling times) in a Latin square experiment with 4 lactating cows. Cumulative particle excretion curves were fitted to a double exponential model to calculate total MRT in the digestive tract (TMRT), MRT in 2 compartments (MRT1 and MRT2), and retention time in the intestines' tubular section (TT). Differences in density had a quadratic effect, with densities of 1.1 and 1.3 yielding lower TMRT (29.5 and 31.2 h, respectively) than the densities of 0.9 and 1.5 (TMRT = 64.0 and 51.2 h, respectively). Similar responses were observed for MRT1, which was assumed to be the ruminal MRT for densities 1.1 and 1.3 (8.9 and 10.5 h, respectively) compared with densities 0.9 and 1.5 (39.6 and 22.6 h, respectively). Differences in diameter had a linear effect on TMRT (12.9 h longer for 3 mm than for 1 mm) and on TT. A combined effect of size and density was

observed and particle size had no effect on TMRT when density was 1.1 to 1.3; however, outside this range, an increase in particle diameter increased TMRT. Consequently, a density of 1.2 to 1.3 is optimal for the escape of particles. As smaller particles of concentrates lose functional specific gravity more rapidly than larger particles due to their higher fermentation rate, our results, obtained with plastic particles, suggest that a diameter slightly greater than 3 mm seems a compromise to delay the start of fermentation and allow for rapid passage through the reticulo-omasal orifice.

Key words: mean retention time, rumen, plastic particle, dairy cow

INTRODUCTION

Increasing the proportion of RUP in feed, especially in protein-rich supplements such as oil seed meals or legume grain, is one challenge for the nutrition of high-producing dairy cows to increase protein-use efficiency and reduce nitrogen excretion in the environment by increasing nitrogen efficiency. Digestion of concentrate feeds in the rumen depends on their degradation rate and retention time.

To increase the proportion of RUP, feed manufacturers developed processes to reduce the degradation rate of concentrates. The main processes are heat treatments (Whitelaw et al., 1961; Sherrod and Tillman, 1964; Krizsan et al., 2017) and tanning with formaldehyde (Vérité et al., 1977); however, heat treatment can reduce intestinal digestibility or become ineffective at protecting feeds when industrial processes are not well monitored (Broderick et al., 1991). Formaldehyde tanning is highly effective (Barry, 1976) in reducing the ruminal degradability of protein and preserving high intestinal digestibility; however, most feed manufacturers have stopped using it due to lack of social acceptance and carcinogenic risks for feed factory employees. New processes based on plant-based tanning or essential oils were tested, but they have variable efficacy in vivo (Min et al., 2003; Waghorn, 2008; Bayourthe and Ali-Haimoud-Lekhal, 2014).

Received October 31, 2018.

Accepted December 28, 2018.

*Corresponding author: jean-louis.peyraud@inra.fr

Manipulating retention time in the rumen has not received much attention until recently. However, decreasing ruminal retention time can improve the efficiency of protection processes by increasing the probability that particles escape the rumen before extensive microbial degradation. The combination of short retention time in the rumen and short-term protection could result in high escape protein of concentrates. Physical characteristics, such as size and functional specific gravity, are known to influence the retention time of concentrates in the rumen (Lechner-Doll et al., 1991). Functional specific gravity corresponds to particle density associated with volumes occupied by liquids and gases, which evolve during hydration and digestion (Sutherland, 1986; Wattiaux et al., 1993).

Studying the influence of particles' physical characteristics on their retention time requires using inert particles because their size and density can be strictly controlled and they do not interact with microbial fermentation. Several studies using this approach have investigated the influence of physical characteristics, such as size and density, on the mean retention time (MRT) of plastic particles (King and Moore, 1957; Campling and Freer, 1962; Welch and Smith, 1978; DesBordes and Welch, 1984; Ehle and Stern, 1986; Murphy et al., 1989; Kaske and Engelhardt, 1990; Prigge et al., 1990; Clauss et al., 2011) in the entire digestive tract and in the rumen. The general observations of these studies are that the MRT of particles negatively correlates with particle size and that a density of 1.1 to 1.4 minimizes MRT in the rumen. These results, however, come from studies that used low-producing animals (dry cows, steers, or sheep), whereas it is well established that both ruminal and total MRT of particles decrease as intake increases (Verite et al., 1987); therefore, high-producing dairy cows may have different responses to particle size and density. Most of these studies aimed to estimate the MRT of forage particles, so the size tested (length mean 6.5 mm) was larger than the size of concentrate particles. Only Murphy et al. (1989) examined the influence of size and density of plastic particles in the range close to concentrates; however, the experimental diet of their study (95% of rice straw) could not be applied to cover the high requirements of lactating cows, as rice straw is a low-energy, low-protein, and low-digestible feed.

We explored the combined effect of the size and density of plastic particles on the retention time in different parts of the gastrointestinal tract of lactating cows and tested the hypothesis that a certain size and density combination would yield the lowest MRT for particles in the rumen. The range of variation in size and density was chosen to encompass the values generally observed for concentrates.

MATERIALS AND METHODS

Principle of the Measurements

Four diameter sizes (0.5, 1, 2, and 3 mm) and 4 densities (0.9, 1.1, 1.3, and 1.5) of plastic particles, resulting in 16 size \times density combinations, were tested with 4 lactating cows in a Latin square design during four 1-wk periods. Particles were pulse-dosed in the rumen of each cow at each period. After dosing, excretion of particles was monitored by collecting all fecal material. The number of plastic particles was determined using a method to separate plastic particles from feces (adapted from DesBordes and Welch, 1984) and an innovative image analysis, based on a color-separation of particles followed by an ImageJ counting (ImageJ 1.47v software; US National Institutes of Health, Bethesda, MD). Excretion dynamics were adjusted to a double exponential model (Grovmum and Williams, 1973) to calculate total mean retention time (TMRT) in the gastrointestinal tract and the 3 compartments identified by the model: 2 mixing compartments, the first associated with the rumen, and the intestines' tubular section. Mean retention time for the 3 sizes (1, 2, and 3 mm) and 4 densities (0.9, 1.1, 1.3, and 1.5) of plastic particles in the entire digestive tract and its 3 compartments is presented in Appendix Table A1.

Animals, Diets, and Experimental Design

Four multiparous cows [mean of 727 kg of BW (SD = 30.5); 29.9 kg of milk/d (SD = 6.8); 21.9 kg of DMI/d (SD = 2.5)] were used in a Latin square experiment on the experimental farm of Méjusseume (Le Rheu, France). All cows were fitted with large (i.e., 123-mm diameter) rumen cannulas at least 1 yr before the beginning of the experiment and were confirmed pregnant before the experiment to avoid differences in DMI due to estrus. The cows were housed in individual stalls equipped with automatic troughs and were milked twice a day at 0700 and 1700 h. The experiment lasted 54 d, including an adaptation period of 28 d. The cows were fed ad libitum during the first 14 d to determine individual ad libitum DMI. For the following 14 d, cows were adapted to restricted feeding, which was set to 95% of each cow's individual DMI to ensure constant DMI during the trial. Access to the troughs was restricted to four 1-h periods (starting at 0200, 0800, 1400, and 2000 h) per day to spread DMI throughout the day. Cows had free access to water and a feed block. Meals contained maize silage, concentrates with minerals, tanned soybean meal, and chopped dehydrated alfalfa (Table 1). Procedures related to surgery, care, and use of animals for the experiment were approved by an

Table 1. Chemical composition and nutritional values of feeds (g/kg, unless otherwise indicated)

Characteristic	Maize silage	Concentrate with mineral ¹	Tanned soybean meal	Chopped dehydrated alfalfa
Amount in the diet (%)	60	15	15	10
DM	376	919	905	924
OM	965	877	928	883
CP	66	102	506	189
NDF	422	196	102	420
ADF	239	79	61	299
ADL	24	8	4	110
Starch	332	420	65	39
Fatty acids	29	39	26	29
Net energy (UFL ² /kg of DM)	0.91	0.96	1.2	0.63
MP				
g of PDIE/kg of DM ³	63	91	248	95
g of PDIN/kg of DM ⁴	41	69	361	119

¹Contained (in %) 18.3 wheat, 18.3 maize, 18.3 barley, 13.2 wheat feed flour, 18.3 beet pulp, 0.9 rapeseed oil, 3 sugar cane molasses, 0.9 salt, 2 AdiSodium (Bluestar Adisseo Co., Ltd., Beijing, China), and 6.8 minerals (5.5% P, 27% Ca and 4% Mg).

²UFL = unite fourragère lait; amount of net energy for milk production contained in 1 kg of a reference barley (87% DM, 2,700 kcal of ME), based on the INRA feeding system (INRA, 2007).

³PDIE = truly digestible (dietary + microbial) protein when available energy decreases microbial growth.

⁴PDIN = truly digestible (dietary + microbial) protein when available degradable nitrogen decreases microbial growth.

animal committee of the French Ministry of Agriculture (no. 201606132002401), in accordance with European Directive 2010/63/UE.

Plastic Particles

Particles used in the experiment were a mix of polypropylene and barium sulfate (manufactured by CRITT Polymères Picardie, Verneuil-en-Halatte, France). The barium sulfate was added to the polypropylene during manufacturing at 0, 21.87, 37.77, and 49.99%, to obtain final densities of 0.9, 1.1, 1.3, and 1.5, respectively. Four colorants, orange, red, purple, and white, were also added to identify the 4 density treatments samples when counting particles in fecal matter for the densities 0.9, 1.1, 1.3, and 1.5, respectively. These 3 components (polypropylene, barium sulfate, and colorant) were mixed together and heated (from 120 to 190°C) by a co-rotating, twin-screw extruder (Cletral, Firminy, France) before being extruded as 3-mm diameter wire. The wire was cooled in 15°C water then cut to 3 mm in length. At this stage, 2 kg of each density were retained for the experiment. The remaining particles were ground (Micronis, Colayrac-Saint-Cirq, France) and sieved (Agrial, La-Selle-en-Luitré, France) to obtain 3 ranges of diameters: 0.3 to 0.6, 0.9 to 1.2, and 1.8 to 2.5 mm, hereafter referred to as 0.5, 1, and 2 mm, respectively. The global shape of 0.5-, 1-, and 2-mm particles were coarse spheres.

Fecal Sampling

The TMRT within the gastrointestinal tract was determined by monitoring dynamics of particle excretion

in the feces over four 1-wk periods. In each period, cows received all 4 densities of only 1 size of particle. At the beginning of each period (0800 h on Monday, d 29, 36, 43, and 50), approximately 8,000 particles of 3 or 2 mm (2,000 per density), 66,000 particles of 1 mm (16,500 per density), or 528,000 particles of 0.5 mm (132,000 per density) were introduced into the rumen through the cannula according to the experimental design. Total fecal output was collected 17 times during the first 106 h postdosing (6, 9, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 48, 54, 60, 72, 82, 96, and 106 h). For the sampling times from 6 to 40 h, total fecal outputs were collected and treated. After the 40-h sampling time, a representative subsample equal to the amount of feces collected over 4 h was first taken. Thus, feces from the samplings at 48, 54, 60, 72, 82, 96, and 106 h were weighed, thoroughly mixed, and then 50, 66, 66, 33, 40, 28, and 40% of their total weights, respectively, were collected and treated.

Treatment of Fecal Samples and Photography

After feces were collected and weighed, most fecal matter was eliminated by wet sieving under high water pressure through 7 successive sieves (8, 4, 2.5, 1.5, 0.8, 0.5, and 0.2 mm). Only the material on the sieve corresponding to the particle size introduced in the rumen was collected (i.e., the 2.5-mm sieve for 3-mm particles, the 1.5-mm sieve for the 2-mm particles, the 0.8-mm sieve for the 1-mm particles, and the 0.5- and 0.2-mm sieves for the 0.5-mm particles). Collecting particles in different sieves based on their size avoided confounding particles from a given period, as a small fraction of particles (less than 10 particles of all densities per sam-

pling) were still being excreted during the subsequent period (6, 9, and 12 h after the dosing of the subsequent period). Fecal residues and plastic particles retained on the sieves were dried at 80°C for 48 h and stored at ambient temperature in aluminum containers before counting (Figure 1).

After storage, the amount of fecal residue remaining among the 3-mm particles was small enough that it could be photographed directly. The samples were spread on a black fabric under a digital camera (Panasonic Lumix DMC-FZ30, Osaka, Japan) and photographed. The black background prevented color interference during image analysis. For the 2-, 1-, and 0.5-mm particles, the amount of fecal residue recovered in the corresponding sieves was too large to photograph all of it directly. Thus, each sample (fecal residue + particles; mean mass of 400 g) was floated in a bucket with 8 L of water at ambient temperature during 5 min. Two grams of Span 20 (Croda International Plc, Goole, UK) was added to decrease surface tension. The plastic particles heavier than water (densities 1.1, 1.3, and 1.5) sank to the bottom of the bucket and were recovered after removing the fraction lighter than water. This fraction, containing particles of density 0.9, and the fecal residues were skimmed off the water surface and then floated in another bucket with 8 L of boiling water to heat the fecal residues overnight. The hot fecal residues sank, and the plastic particles were skimmed off the water surface. These particles were spread on the black fabric under the camera and photographed. Each image was identified by period, date, cow, and sampling time.

The method used to recover particles of different densities and remove fecal residues before image analysis was developed for this study. We considered degrading fecal residue with acid or enzymes, but the quantities to be treated were too large and the time required was too long to use this technique. Using ethanol instead of water recovered only 80% of a known quantity of particles of density 0.9 added to feces and removed only 50% of fecal residues. The water-based recovery method described (adapted from DesBordes and Welch, 1984) recovered more than 99% of particles with a density of 1.1, 1.3, and 1.5 and all sizes of particles during a pilot study in which particles were added to fecal material. The only challenge was recovering particles of density 0.9 from fecal residues. Using water only at ambient temperature also caused fecal residues to sink to the bottom of the bucket, but the process of recovering all particles of 0.9 density took more than 2 d. Using boiling water instead shortened the process to 1 night and also recovered all of the plastic particles.

Rumination of plastic particles was also considered, as chewing can reduce the size of the particles or de-

form them greatly. During the first period, ruminated particles were identified by chewing marks. Clear chewing marks were detected only on particles of 0.9 density (less than 1% of them) and only for the last 3 sampling times (82, 96, and 106 h). No chewing marks were detected on particles of other densities, even those 3 mm in size. Consequently, ruminated and nonruminated particles were not distinguished in subsequent periods.

Image Analysis

The images were first processed with Adobe Photoshop CS5 software (Adobe Inc., San Jose, CA), which separated each image by particle color into 4 images, each showing the particles of 1 color (i.e., 1 density). Next, the number of particles in each image was counted using ImageJ 1.47v software (US National Institutes of Health). For the sampling times between 48 and 106 h, the same percentages used to subsample feces were used to extrapolate the number of particles excreted in the complete fecal sample. Preliminary analyses of 3-mm particles of all densities indicated that the image analysis was sufficiently accurate (100.5%, SD = 2.4%). However, the analysis did not accurately distinguish 0.5-mm particles from fecal residues remaining in the samples. Consequently, only results for 1-, 2-, and 3-mm particles are presented. Figure 1 shows a diagram of plastic particle manufacturing, the experimental design, and the recovery procedure.

Model of Particle Excretion

We used the number of particles counted at each sampling time to adjust our data to a cumulative percentage excretion curve to avoid irregularity due to defecations. The cumulative percentage is an expression of the number of particles counted compared with the number of particles introduced into the rumen at the beginning of each period. As the initial double exponential model of Grovum and Williams (1973) considers the kinetics of concentration, we integrated this initial model for considering the cumulative excretion curve according to the following equation:

$$Y = (C_0/k_2) - [(C_0 \times k_1)/(k_1 - k_2)] \times \{ \exp[-k_2 \times (t - TT)]/k_2 - \exp[-k_1 \times (t - TT)]/k_1 \},$$

where C_0 is the adjusted plastic particle number, k_1 and k_2 are rate constants of the 2 models' compartments, TT is the time calculated for the first appearance of plastic particles in the feces, and t is the sampling time in h after particles were introduced in the rumen.

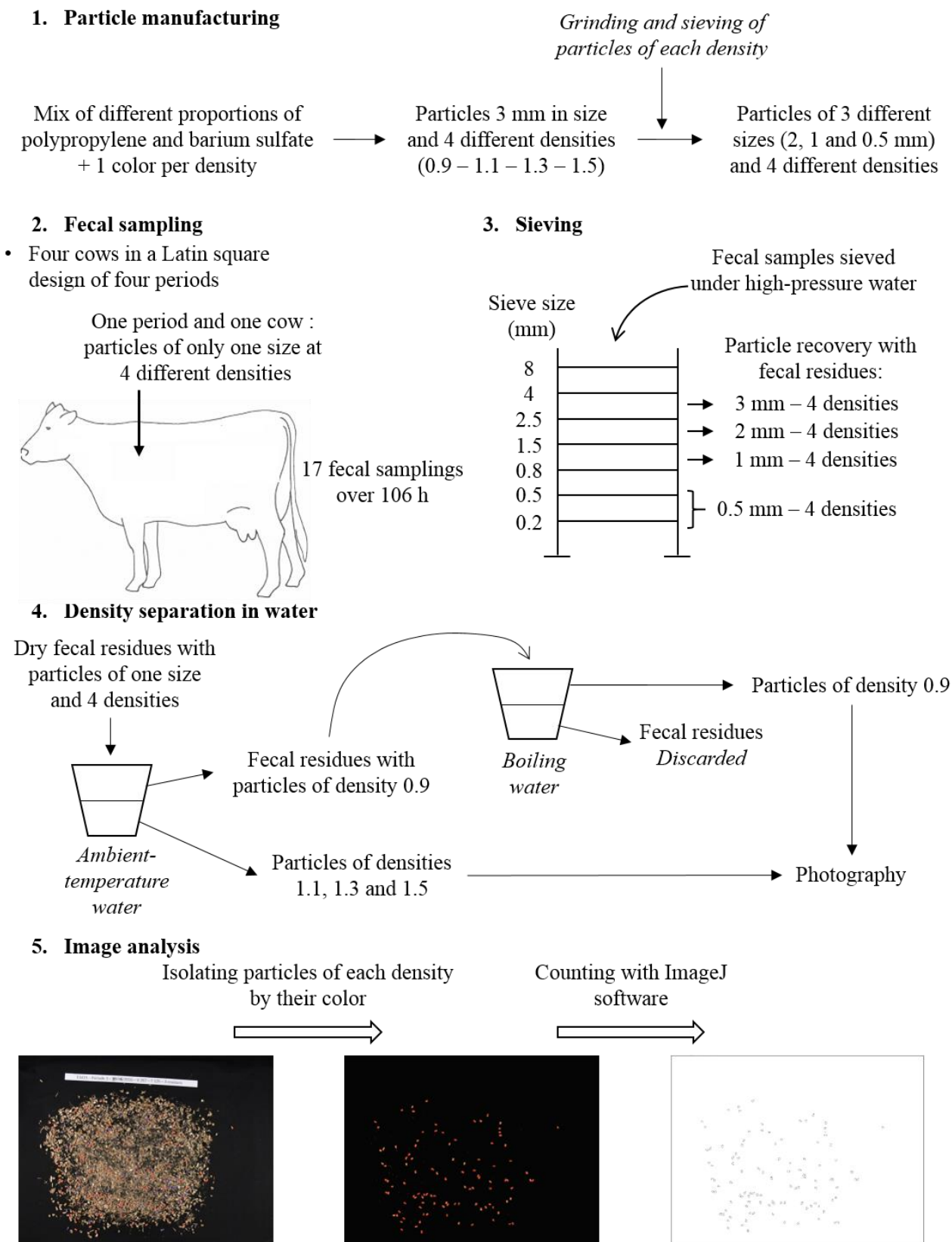


Figure 1. Diagram of the manufacturing of plastic particles, fecal sampling, the separation procedure, and image analysis for particles of different sizes and densities. ImageJ from US National Institutes of Health (Bethesda, MD; <https://imagej.nih.gov/ij/>).

The MRT in the 2 compartments was calculated by inverting their rate-constant coefficients: $MRT1 = 1/k1$ and $MRT2 = 1/k2$. The TMRT in the digestive tract was calculated as the sum of all 3 times: $TMRT = MRT1 + MRT2 + TT$.

The use of Grovum and Williams' model allowed us to obtain physiological correspondence of the different compartments. Based on the study of Mambrini and Peyraud (1997), we considered MRT1 as the time required for particles to flow out of the rumen toward distal digestive compartments, TT as the transit time of concentrates in the intestines' tubular section, and MRT2 as the time spent in the cecum, as well as in other compartments or processes that were not clearly identified. Mambrini and Peyraud (1997) demonstrated that some of MRT2 is due to the time required to comminute large forage particles in the rumen. MRT2 is also due in part to ruminal processes such as particle mixing.

The Grovum and Williams double exponential model was also chosen based on comparison between different modes and previous work on the subject (Mambrini, 1990; Mambrini et al., 1994). Those authors compared different models with the same data set and found that models from Grovum and Williams (1973) and Ellis (1978), with a time-dependent passage rate following a gamma 2 or 3 distribution (E2 or E3), adjust best to data with the most precise estimation of parameters of the equation. We adjusted our data on these 3 models and the Grovum and Williams' one fitted best (SEM of 22, 28, and 34 respectively for Grovum and Williams, E2, and E3 respectively).

Statistical Analyses

Split-plot ANOVA was performed to estimate nested effects of the densities on the particle recovery rate, MRT1, MRT2, TT, and TMRT using the MIXED model procedure of SAS Enterprise Guide 6.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC):

$$Y_{ijkl} = \mu + P_i + A_j + S_k + D_l + (SD)_{kl} + (AD)_{il} + e_{ijkl},$$

where Y_{ijkl} is the adjusted response variable of the model, μ is the overall mean, P_i is the effect of period i ($n = 4$), A_j is the random effect of animal j ($n = 4$), S_k is the effect of particle size k ($n = 3$), D_l is the effect

of particle density l ($n = 4$), $(SD)_{kl}$ is the effect of the interaction between size k and density l , $(AD)_{il}$ is the random effect of the interaction between animal i and density l , and e_{ijkl} is the residual error. The MRT1 and TMRT data were analyzed after being log transformed to ensure normal distribution of their residuals.

To highlight interactions between size and density on MRT, orthogonal contrasts [linear (L) and quadratic (Q)], and the interactions [quadratic \times linear ($Q \times L$), quadratic \times quadratic ($Q \times Q$) and linear \times linear ($L \times L$)] were tested to study the overall shape of response of size and density on different MRT in the gastrointestinal tract. Significance was declared at $P < 0.05$.

RESULTS

Particle Recovery Rate

The recovery rate depended on the size and density of the particle. The lowest recovery rate (23.1%, $SD = 11.7$) was observed for particles of density 0.9. For 2- and 3-mm particles, the recovery rate was highest for those of density 1.1 (90.1%, $SD = 8.3$), followed by those of density 1.3 (73.6%, $SD = 3.8$) and 1.5 (68.6%, $SD = 2.9$). For 1-mm particles, the mean recovery rate of those with densities 1.1 to 1.5 (41.4%, $SD = 13.4$) was 36 percentage points lower than that of the other 2 sizes combined (Table 2).

Response of TMRT and its Compartments to Particle Size and Density

The MRT1 averaged 39% of TMRT, but TMRT was correlated with MRT1 ($TMRT = 1.02 \times MRT1 + 23.1$; $R^2 = 0.92$), with similar standard deviations for each variable (22.58 and 21.11 h for TMRT and MRT1, respectively), which implied that variations in MRT1 were mirrored in TMRT. Both TMRT and MRT1 had a quadratic response to density (Table 3); TMRT and MRT1 were shortest for particles of densities 1.1 and 1.3 and longest for those of density 0.9. Similar quadratic trends were observed for MRT2, which was shortest for particles of densities 1.1 and 1.3 and longest for those of density 1.5. Particle density had no influence on TT.

Increasing particle size linearly increased TMRT and TT. As particle size increased from 1 to 3 mm, TMRT and TT increased linearly by 13.9 and 1.5 h, respectively. Unlike density, particle size had no significant effect on MRT1 and MRT2.

Table 2. Percentage of plastic particles recovered¹ for each combination of size and density of particles

Density	Size (mm)		
	1	2	3
0.9	9.3	37.5	22.5
1.1	26.0	98.5	81.8
1.3	48.0	69.8	77.3
1.5	50.2	65.9	71.3

¹Particles recovered over a period of 106 h.

Table 3. Mean retention times (MRT, h) in the entire digestive tract and its 3 compartments (MRT1, MRT2, and TT) for the 3 sizes (1, 2, and 3 mm) and 4 densities (0.9, 1.1, 1.3, and 1.5) of plastic particles, with P-values of the contrasts

Item ¹	MRT (h)												Contrasts (P-value) ²			
	Size (mm)			Density				Main					Interaction size × density			
	1	2	3	0.9	1.1	1.3	1.5	SEM	L	Q	L	Q	L × Q	L × L	Q × Q	
TMRT	38.0	43.1	50.9	64.0	29.5	31.2	51.2	5.77	<0.001	0.77	0.10	<0.001	0.04	0.56	0.89	
MRT1	16.0	20.6	24.6	39.6	8.9	10.5	22.6	5.79	0.14	0.95	0.20	<0.001	0.09	0.98	0.87	
MRT2	9.8	9.1	10.7	10.6	7.8	7.5	13.5	1.67	0.68	0.52	0.29	0.03	0.36	0.62	0.81	
TT	12.3	13.4	15.6	13.8	12.8	13.3	15.1	1.07	<0.001	0.50	0.21	0.08	0.54	0.02	0.21	

¹TMRT = total MRT; MRT1 = MRT in the first compartment; MRT2 = MRT in the second compartment; TT = time until plastic particles first appear in the feces.

²L = linear; Q = quadratic; L × Q = linear size × quadratic density; L × L = linear size × linear density; Q × Q = quadratic size × quadratic density.

Effect of Interaction between Size and Density on TT and TMRT

The increase in TMRT as particle size increased was greater for densities 0.9 and 1.5 than for densities 1.1 and 1.3. The effect of particle density on TMRT was greatest for 3-mm particles and much smaller for 1-mm particles (quadratic × linear interaction, $P < 0.04$; Figure 2). At densities of 0.9 and 1.5, 3-mm particles had a mean MRT 31 and 17.5 h longer, respectively, than those of 1-mm particles. No difference was observed for densities of 1.1 and 1.3, indicating that particle size had no effect on TMRT for this range of density.

The incremental increase in TT with particle size was even greater as particle density increased (linear density × linear size interaction, $P < 0.02$; Figure 3). The slope of the relation between TT and size increased by 0.4, 0.9, 1.9, and 3.5 h/mm of diameter for densities 0.9, 1.1, 1.3, and 1.5, respectively. The denser and larger the particles were, the longer the TT.

DISCUSSION

Fecal Recovery of Plastic Particles and Reliability of the Method

Recovery rates of particles in our study were consistent with those of other studies (King and Moore, 1957; DesBordes and Welch, 1984; Ehle and Stern, 1986; Murphy et al., 1989). Those studies' highest recovery rates for densities 1.0 to 1.5 (70.6%, mean of the 4 studies; Figure 4) were similar to our recovery rates for 2- and

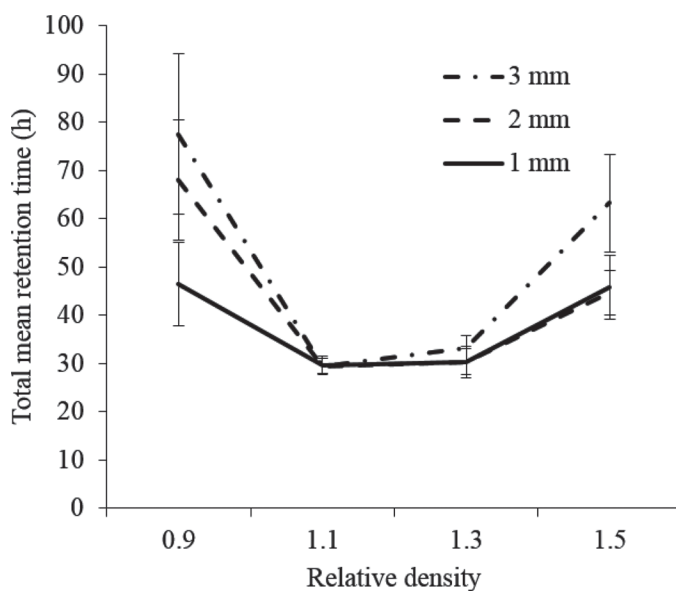


Figure 2. Influence of relative density (0.9–1.5) and diameter (1–3 mm) on total mean retention time in the entire digestive tract.

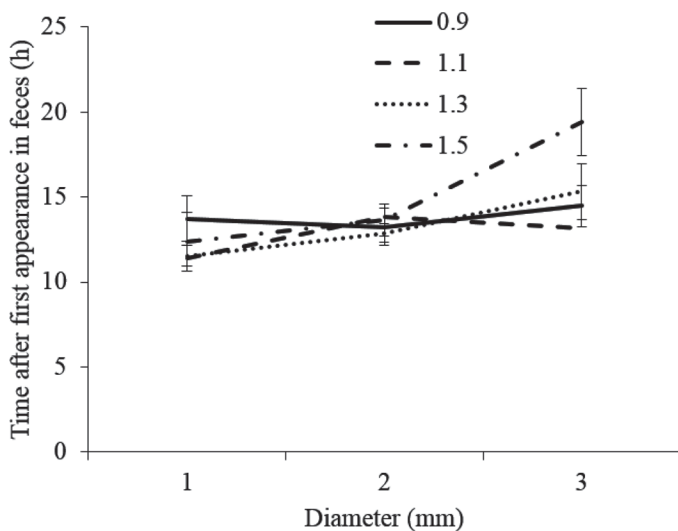


Figure 3. Influence of relative density (0.9–1.5) and diameter (1–3 mm) of plastic particles on the time until they first appear in the feces, according to the model of Grovum and Williams (1973), equivalent to mean retention time in the intestines' tubular section (Mambrini and Peyraud, 1997).

3-mm particles in the same range of density (81.9%, Table 2). This indicates that our innovative method for image analysis is effective for counting particles.

Recovery rates in our study for 2- and 3-mm particles were lower for densities 0.9 and 1.5 (30.0 and 68.6%, respectively) than for densities 1.1 and 1.3 (90.2 and 73.6%, respectively; Table 2). This agrees with data from the literature, which also observed lower recovery rates for particles with a density lower than 1.0 (average of the studies: 17.7%; Figure 4) or higher than 1.5 (average of the studies: 46.7%). This low recovery rates for 2- and 3-mm particles may be related to the increase in TMRT (Figure 5) rather than a problem with the method. The low recovery rate for particles of density 0.9 may indicate that this density is too low for sedimentation to occur in the rumen and for particles to pass out of the rumen through the reticulo-omasal orifice, as observed by Campling and Freer (1962), DesBordes and Welch (1984), Ehle and Stern (1986), and Welch (1990). Those authors observed slow and uniform excretion of particles with densities lower than 1.0 when feces were sampled 10 d after the particles were inserted into the rumen. The period over which feces were collected may explain these low rates of particle recovery. Similar to other studies using plastic particles (King and Moore, 1957; Kaske et al., 1992) or concentrates with lactating cows (Mambrini and Peyraud, 1997; Zebeli et al., 2007; Krämer et al., 2013), our collection period lasted 106 h; however, a longer collection period might have increased the particle recovery rate. The longer periods reported in the literature (mean

8.3 d; Welch and Smith, 1978; Welch, 1982; DesBordes and Welch, 1984; Ehle and Stern, 1986; Murphy et al., 1989; Kaske and Engelhardt, 1990; Prigge et al., 1990; Clauss et al., 2011) did not facilitate complete recovery of particles of low or high density. In our study, the experimental design and collection of particles in different sieves based on their size avoided confounding particles from a given period if they were still being excreted during the subsequent period. Nevertheless, these low recovery rates might have induced an underestimation of the MRT, as all particles have not been recovered (i.e., some particles were still in the digestive tract with, therefore, a longer MRT) but relative MRT between size-density combinations still indicate those that escape the rumen the fastest.

The recovery rate of 1-mm particles with densities of 1.1 to 1.5 was 30 percentage points lower in our study than in other studies (King and Moore, 1957; DesBordes and Welch, 1984; Ehle and Stern, 1986; Murphy et al., 1989), and we observed no linear relationship between the particle recovery rate and TMRT as we did for the 2 other sizes ($R^2 = 0.08$; Figure 5). This indicates that the low recovery rate of 1-mm particles might have resulted from a problem with the method, as these particles displayed static electricity when sieved. Consequently, they could have clung to fecal residues during water separation despite the surfactant used to avoid this problem. In contrast, the 2- and 3-mm particles were likely large enough to overcome static electricity during water separation. Thus, results for 1-mm particles must be taken with more caution than the others, despite the consistent results.

Finally, based on observations during the first period of our trial, we decided not to distinguish ruminated and nonruminated particles, as the proportion of ruminated particles was very low during this period. For the same reason, the number of particles reduced by rumination (i.e., particles passing through their recovering sieve) have not been recorded. However, other studies (DesBordes and Welch, 1984; Murphy et al., 1989; Clauss et al., 2011; Lauper et al., 2013) have reported high proportion of ruminated particles. We assumed that our low proportion of ruminated particles might be linked to higher DMI of our animals compared with literature. Nevertheless, it cannot be precluded that the nonseparation of ruminated and nonruminated particles might have influenced our MRT.

Influence of DMI on TMRT of Plastic Particles

In our study, the TMRT of plastic particles of densities 0.9 to 1.3 was much shorter (44 h) than reported in previous studies (76.3 h; Figure 6). Voluntary DMI was much higher in our study, which used high-producing

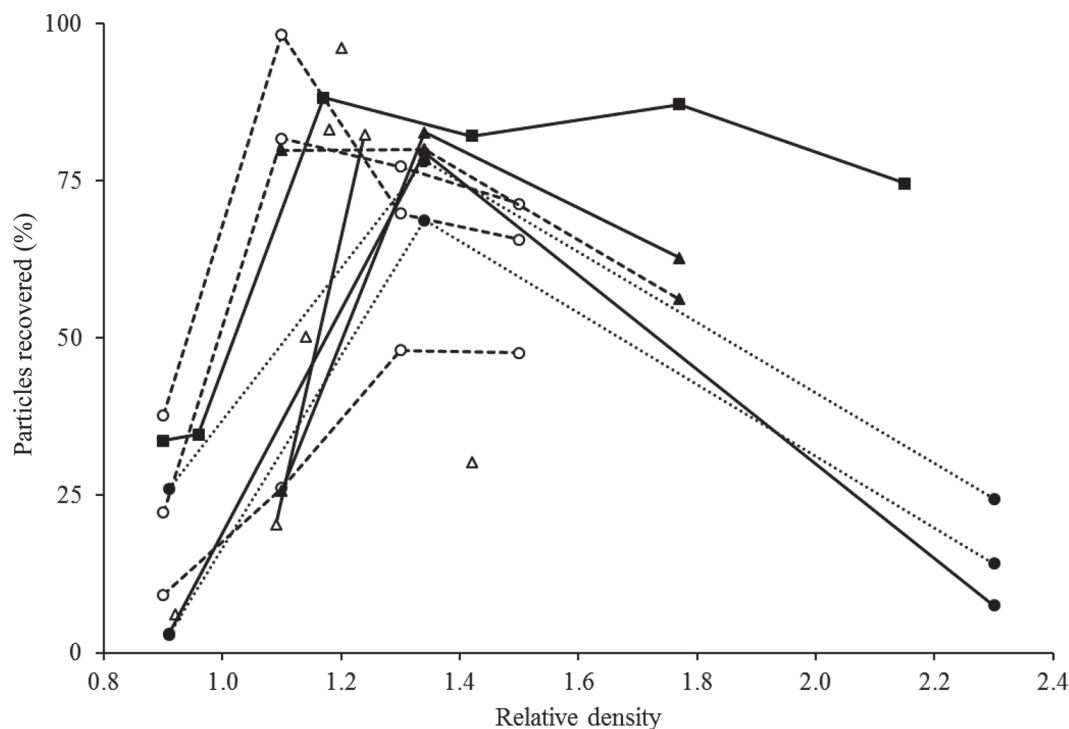


Figure 4. Influence of the relative density of plastic particles on the percentage of particles recovered from the digestive tract of cattle. Lines connect particles with the same size in a given experiment (hatched lines = particles size ≤ 3 mm; solid lines = particles size between 3 and 5 mm; dotted lines = particles size > 5 mm). ■ = DesBordes and Welch (1984); ● = Ehle and Stern (1986); Δ = King and Moore (1957); \blacktriangle = Murphy et al. (1989); ○ = present study.

dairy cows (157 g of DM/kg of $BW^{0.75}$) than in the previous studies conducted with dry cows, steers, or sheep on maintenance diets (mean 84 g of DMI/kg of $BW^{0.75}$; Welch and Smith, 1978; Ehle and Stern, 1986;

Kaske and Engelhardt, 1990; Prigge et al., 1990; Clauss et al., 2011). It is well established that the TMRT of forage particles decreases as DMI increases (Colucci et al., 1982; Shaver et al., 1986). We observed the same relation for the MRT1 of plastic particles, with shorter MRT than those of other studies due to higher DMI (Figure 7). Allen (1996) also reported that an increase in voluntary DMI decreased MRT in the reticulo-rumen, probably through specific mechanisms that control flow through the reticulo-omasal orifice. Consequently, the restriction on feed intake (95% of DMI) may have resulted in a slight increase of the TMRT but because the restriction applied was not severe, the effect on TMRT must be minimal.

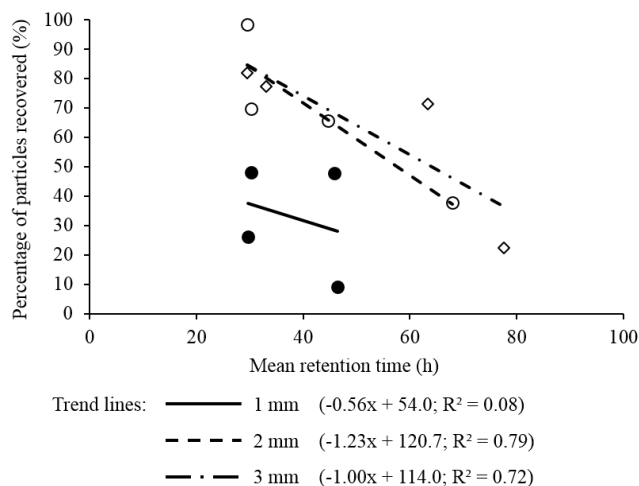


Figure 5. Percentage of particles recovered as a function of their mean retention time (h) in the digestive tract for the size 1 (●), 2 (○), and 3 mm (◇). Each dot represents the mean for all 4 cows for a particle size-density combination.

Influence of Density on the MRT of Plastic Particles

The TMRT was shortest for densities 1.1 to 1.3 and sharply increased for densities 0.9 and 1.5. This response curve agrees with data from the literature, for which the shortest TMRT were generally observed for particles of densities 1.1 to 1.4 (Figure 6). King and Moore (1957) observed the shortest MRT for particles of density 1.24, whereas Campling and Freer (1962) observed that TMRT increased for particle densities of 1.4 or more. DesBordes and Welch (1984) observed the

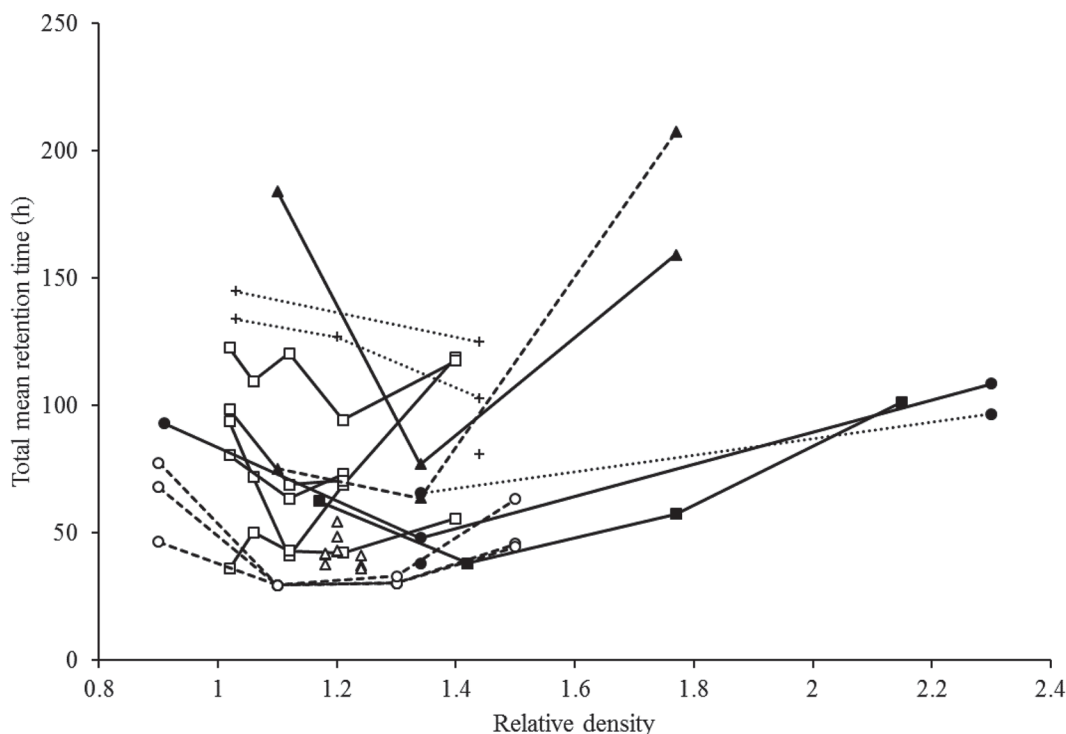


Figure 6. Influence of the relative density of plastic particles on the total mean retention time in cattle. Lines connect particles with the same size in a given experiment (hatched lines = particles size ≤ 3 mm; solid lines = particles size between 3 and 5 mm; dotted lines = particles size > 5 mm). Note: We calculated total mean retention time for the studies of DesBordes and Welch (1984) and Murphy et al. (1989) by adjusting their cumulative percentage of particles recovered with the model of Grovum and Williams (1973). \square = Campling and Feer (1962); $+$ = Clauss et al. (2011); \blacksquare = DesBordes and Welch (1984); \bullet = Ehle and Stern (1986); \triangle = King and Moore (1957); \blacktriangle = Murphy et al. (1989); \circ = present study.

shortest MRT for particles of density 1.42 and TMRT increasing moderately from densities 1.4 to 1.7 and more rapidly from 1.7 to 2.15.

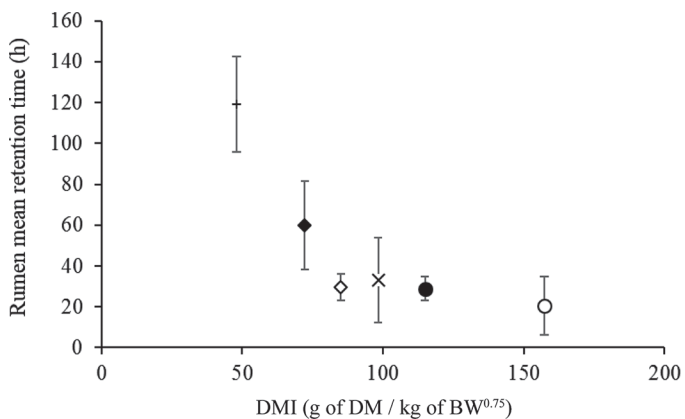


Figure 7. Rumens mean retention time of plastic particles as a function of DMI of animals on maintenance diets (\blacklozenge , \diamond , \bullet , and \times) and lactating cows (\circ). Each dot represents the mean of rumens mean retention time for particles of all sizes and densities tested in each study. \bullet = Ehle and Stern (1986); $+$ = Clauss et al. (2011); \blacklozenge = Kaske and Englhart (1990); \times = Prigge et al. (1990); \diamond = Welch and Smith (1978); \circ = present study.

As for TMTR, MRT1 was shortest for densities 1.1 and 1.3 and increased for densities 0.9 and 1.5. This is consistent with Ehle and Stern (1986), Kaske and Englhart (1990), and Murphy et al. (1989), who reported minimum MRT in the entire digestive tract and the rumen for the same range of densities (1.34, 1.44, and 1.34, respectively). Therefore, it appears that particles with densities ranging from 1.1 to 1.4 have the shortest MRT in the rumen. Particles with a density higher than 1.4 or 1.5 probably separate from the rumen fiber mat better than particles with a lower density, but they are not readily transported with liquids once they are in the ventral section of the rumen, which could explain the longer MRT, as Campling and Freer (1962) suggested. A density of 1.0 or lower is too low to allow sedimentation from the rumen fiber mat and, thus, passage of particles out of the rumen.

Influence of Particle Size on the MRT of Plastic Particles

The influence of particle size on TMRT is consistent with results of other studies, where increasing the size of particles increases MRT (Campling and Freer, 1962;

Welch and Smith, 1978; Welch, 1982; Ehle and Stern, 1986; Kaske and Engelhardt, 1990; Clauss et al., 2011). From a meta-analysis of literature data, Lechner-Doll et al. (1991) demonstrated an exponential response curve for TMRT as particle size increases from 1 to 20 mm. In our study, TMRT had a linear response to particle size; however, we tested a smaller range of sizes that is consistent with that of concentrate particles. Therefore, the shape of the response does not necessarily contradict those of other studies.

Prigge et al. (1990) found that MRT in the rumen increased for nylon particles with diameters larger than 3 mm (19.3, 20.3, and 60.1 h for 1, 3, and 5 mm, respectively), which is consistent with our results. The critical size threshold theory, first suggested by Poppi et al. (1980), established a threshold of 3 to 4 mm for cattle, although it may vary with the level of intake and the type of diet (Van Soest et al., 1986). In our study, particle size was smaller than the critical size, and the intake levels were high; thus, the lack of effect of particle size on MRT1 was not surprising.

We observed a linear increase in TT as particle size increased. Ehle and Stern (1986) and Siciliano-Jones and Murphy (1986) reported that particle size had no influence on TT [average 16.3 h (SD = 1.3) for density 1.34 and 31.5 h (SD = 4.2) for density 2.3; Ehle and Stern, 1986] for diameters of 3 to 12 mm, which indicates that particles smaller than 3 mm might transit the tubular section of the digestive tract faster. More studies are required to confirm this hypothesis; however, the influence of TT on TMRT remained smaller than that of MRT1.

Overall Response of MRT to the Size and Density of Plastic Particles

Our experiment was designed to study the interaction between particle size and density on MRT. Two interactions were detected. Particle size appears to have little effect on TMRT and MRT1 when particle density is 1.1 to 1.3. For particle densities outside of this range, the smaller the size, the shorter are the TMRT and MRT1. Murphy et al. (1989) performed an experiment with similar range of size (2–5 mm) and density (1.1, 1.34, and 1.77), which was in part consistent with ours, with size appearing to have less effect on rumen MRT for density 1.34 than for the 2 other densities (1.1 and 1.77). For densities 1.1 and 1.77, the influence of size is not as clear as in our study, as particles of size 2 mm had shorter MRT than 5 mm for density 1.1 but reversed order for density 1.77. However, Murphy et al. (1989) used an experimental diet based on 95% of rice straw, which cannot be used to feed lactating cows with high requirements, as rice straw is low digestibility

feed; thus, comparison between the study of Murphy et al. (1989) and ours must be taken with caution, as they refer to very different experimental conditions.

The TT increased as particle size and density increase, and the larger and denser the particle, the longer the TT. As mentioned, few studies have focused on the influence of the size of plastic particles on TT (Ehle and Stern, 1986; Siciliano-Jones and Murphy, 1986). These studies observed no size effect but did observe a density effect consistent with our results: particles of density 1.0 were retained an average of 18 to 19 h, and denser particles were retained 3 to 8 h longer (Kaske and Engelhardt, 1990).

Application to Feed Particles

Movement of a feed particle in the rumen and its passage through the reticulo-omasal orifice depends on processes such as mastication, hydration, comminution, colonization, and degradation. As time passes, the particle can pass more easily as some of its characteristics change, such as size, moisture content, and functional specific gravity (FSG). Retention time of feed particles in the rumen also depends strongly on fermentation and degradation, which are the factors that influence dynamics of the FSG of feed particles the most among the factors that influence their buoyancy (Lechner-Doll et al., 1991). First, fermentation produces gases on particle surfaces, which in turn decreases particle density (Hooper and Welch, 1985; Sutherland, 1986; Lechner-Doll et al., 1991; Wattiaux et al., 1992). Then, once degradation ends, a particle's FSG increases again as gas content decreases and the proportion of its higher-density components increases. Wattiaux et al. (1992) observed in vitro a decrease in FSG from 1.12 at 3 h after incubation to 1.05 at 9 h for alfalfa hay due to fermentation gases, and then an increase up to 1.31 at 30 h when the gases were released.

Plastic particles are biologically inert. Their original size and density tend to remain constant regardless of their MRT; thus, their dynamics do not accurately represent how feed particles pass through the rumen. However, accurate description of MRT response curves, by testing the ranges of size and density generally observed for particles in the rumen, enabled us to identify characteristics required for particles to leave the rumen as quickly as possible to limit their degradation. Because the FSG of concentrates begins to decrease once they arrive in the rumen, the closer that particle density is to 1.3, the more time it will take for its density to decrease to less than 1.1. Therefore, a density ranging from 1.2 to 1.3 seems to be an optimum to minimize the retention time in the rumen.

Concerning particle size, many authors (Bjorndal et al., 1990; Michalet-Doreau and Cerneau, 1991; Wat-

tiaux et al., 1992; Bhatti and Firkins, 1995; Wadhwa et al., 1998) have shown that degradation rate decreases as the surface-to-mass ratio of particles increases. Consequently, large particles ferment more slowly than small particles and require more time to degrade (Bjorndal et al., 1990). They can escape the rumen less degraded than smaller particles, provided their MRT is not too long. A particle with a size near the critical threshold (i.e., 3 mm and no more than 4 mm) may have a higher probability of escaping the rumen less degraded. Based on our data, we assume that a spherical concentrate particle with a FSG of 1.2 to 1.3 and a diameter of 3 to 4 mm will more likely leave the rumen without being greatly degraded, thus increasing the proportion of particles escaping the rumen within a given time period.

CONCLUSIONS

This study was designed to describe the combined effect of the size and density of plastic particles on MRT in different parts of the gastrointestinal tract of lactating cows and to determine the size and density combination that passed most rapidly out of the rumen. Description of response curves of MRT enabled us to determine characteristics required for concentrate particles to leave the rumen quickly, to limit their ruminal degradation, and to increase escape protein. Particles with densities of 1.2 to 1.3 had the lowest MRT in the entire digestive tract and in the rumen. Particles of 1 to 3 mm in diameter with this range of density had little influence on MRT. However, given the effect of particle size on the rate of ruminal degradation, a 3- to 4-mm diameter feed particle would have a higher probability of leaving the rumen less degraded. These assumptions require testing feeds subjected to microbial fermentation to assess the increase in RUP in the feed when size and density are fixed. In addition, combining these physical properties with chemical protection, which delays the rate of ruminal fermentation of protein, could be a promising strategy to further increase RUP.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the European Union and the Regional councils of Pays de la Loire and Bretagne (France), which funded the project “DY+,” carried out by the competitive cluster “Valorial.” Manufacture of the plastic particles was supported by the cooperative Agrial. We would thank the physiology team of Méjus-seaume (P. Lambertson, D. Chevrel, P.-Y. Pennober, J.-L. Harel, J.-Y. Thebault, and J. Lassalas; Le Rheu, France) for their help with the experiment.

REFERENCES

- Allen, M. S. 1996. Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. *J. Anim. Sci.* 74:3063–3075.
- Barry, T. N. 1976. The effectiveness of formaldehyde treatment in protecting dietary protein from rumen microbial degradation. *Proc. Nutr. Soc.* 35:221–229.
- Bayourthe, C., and D. Ali-Haimoud-Lekhal. 2014. Les extraits de plantes chez le ruminant: effets sur les fermentations dans le rumen et la qualité lipidique des produits animaux. *INRA Prod. Anim.* 27:317–328.
- Bhatti, S. A., and J. L. Firkins. 1995. Kinetics of hydration and functional specific gravity of fibrous feed by-products. *J. Anim. Sci.* 73:1449–1458.
- Bjorndal, K. A., A. B. Bolten, and J. E. Moore. 1990. Digestive fermentation in herbivores: Effect of food particle size. *Physiol. Zool.* 63:710–721.
- Broderick, G. A., R. J. Wallace, and E. R. Orskov. 1991. Control of Rate and Extent of Protein Degradation. T. Tsuda, Y. Sasaki, and R. Kawasima, ed. Academic Press, San Diego, CA.
- Campling, R. C., and M. Freer. 1962. The effect of specific gravity and size on the mean time of retention of inert particles in the alimentary tract of the cow. *Br. J. Nutr.* 16:507–518.
- Clauss, M., I. Lechner, P. Barboza, W. Collins, T. A. Tervoort, K.-H. Südekum, D. Codron, and J. Hummel. 2011. The effect of size and density on the mean retention time of particles in the reticulorumen of cattle (*Bos primigenius f. taurus*), muskoxen (*Ovibos moschatus*) and moose (*Alces alces*). *Br. J. Nutr.* 105:634–644. <https://doi.org/10.1017/S0007114510004101>.
- Colucci, P. E., L. E. Chase, and P. J. V. Soest. 1982. Feed intake, apparent diet digestibility, and rate of particulate passage in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 65:1445–1456. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82367-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82367-9).
- DesBordes, C. K., and J. G. Welch. 1984. Influence of specific gravity on rumination and passage of indigestible particles. *J. Anim. Sci.* 59:470–475.
- Ehle, F. R., and M. D. Stern. 1986. Influence of particle size and density on particulate passage through alimentary tract of Holstein heifers. *J. Dairy Sci.* 69:564–568. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(86\)80439-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(86)80439-8).
- Ellis, W. C. 1978. Determinants of grazed forage intake and digestibility. *J. Dairy Sci.* 61:1828–1840.
- Grovum, W. L., and V. J. Williams. 1973. Rate of passage of digesta in sheep: 3. Differential rates of passage of water and dry matter from the reticulo-rumen, abomasum and caecum and proximal colon. *Br. J. Nutr.* 30:231–240.
- Hooper, A. P., and J. G. Welch. 1985. Effects of particle size and forage composition on functional specific gravity. *J. Dairy Sci.* 68:1181–1188. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)80945-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)80945-0).
- INRA. 2007. Alimentation Des Bovins, Ovins et Caprins. Besoins Des Animaux—Valeurs Des Aliments. Editions Quae, Versailles, France.
- Kaske, M., and W. V. Engelhardt. 1990. The effect of size and density on mean retention time of particles in the gastrointestinal tract of sheep. *Br. J. Nutr.* 63:457–465.
- Kaske, M., S. Hatiboglu, and W. V. Engelhardt. 1992. The influence of density and size of particles on rumination and passage from the reticulo-rumen of sheep. *Br. J. Nutr.* 67:235. <https://doi.org/10.1079/BJN19920027>.
- King, K. W., and W. E. C. Moore. 1957. Density and size as factors affecting passage rate of ingesta in the bovine and human digestive tracts. *J. Dairy Sci.* 40:528–536. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(57\)94516-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(57)94516-2).
- Krämer, M., P. Lund, and M. R. Weisbjerg. 2013. Rumen passage kinetics of forage- and concentrate-derived fiber in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:3163–3176. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6146>.
- Krizsan, S. J., H. Gidlund, F. Fatehi, and P. Huhtanen. 2017. Effect of dietary supplementation with heat-treated canola meal on ruminal nutrient metabolism in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:8004–8017. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12625>.
- Lauper, M., I. Lechner, P. S. Barboza, W. B. Collins, J. Hummel, D. Codron, and M. Clauss. 2013. Rumination of different-sized par-

- ticles in muskoxen (*Ovibos moschatus*) and moose (*Alces alces*) on grass and browse diets, and implications for rumination in different ruminant feeding types. *Mamm. Biol.* 78:142–152. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2012.06.001>.
- Lechner-Doll, M., M. Kaske, and W. V. Engelhardt. 1991. Factors affecting the mean retention time of particles in the forestomach of ruminants and camelids. Pages 455–482 in *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*. T. Tsuda, Y. Sasaki and R. Kawasima, ed. Academic Press, San Diego, CA.
- Mambrini, M. 1990. Etude du temps de séjour des résidus alimentaires dans le tube digestif des vaches laitières: Aspects méthodologiques et facteurs de variation. Sciences Biologiques Thesis. Université de Rennes, Rennes, France.
- Mambrini, M., and J. L. Peyraud. 1997. Retention time of feed particles and liquids in the stomachs and intestines of dairy cows. Direct measurement and calculations based on faecal collection. *Reprod. Nutr. Dev.* 37:427–442.
- Mambrini, M., J. L. Peyraud, H. Hetault, A. Stephant, and M. Texier. 1994. Mean retention time in digestive tract and digestion of fresh perennial ryegrass by lactating dairy cows: Influence of grass maturity and comparison with a maize silage diet. *Reprod. Nutr. Dev.* 34:9–23.
- Michalet-Doreau, B., and P. Cerneau. 1991. Influence of foodstuff particle size on *in situ* degradation of nitrogen in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 35:69–81. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(91\)90100-7](https://doi.org/10.1016/0377-8401(91)90100-7).
- Min, B., T. Barry, G. Attwood, and W. McNabb. 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. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00041-5](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00041-5).
- Murphy, M. R., P. M. Kennedy, and J. G. Welch. 1989. Passage and rumination of inert particles varying in size and specific gravity as determined from analysis of faecal appearance using multicompartments models. *Br. J. Nutr.* 62:487–492.
- Poppi, D. P., B. W. Norton, D. J. Minson, and R. E. Hendricksen. 1980. The validity of the critical size theory for particles leaving the rumen. *J. Agric. Sci.* 94:275–280. <https://doi.org/10.1017/S0021859600028859>.
- Prigge, E. C., B. A. Stuthers, and N. A. Jacquemet. 1990. Influence of forage diets on ruminal particle size, passage of digesta, feed intake and digestibility by steers. *J. Anim. Sci.* 68:4352–4360.
- Shaver, R. D., A. J. Nyles, L. D. Satter, and N. A. Jorgensen. 1986. Influence of amount of feed intake and forage physical form on digestion and passage of prebloom alfalfa hay in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 69:1545–1559. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(86\)80571-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(86)80571-9).
- Sherrod, L. B., and A. D. Tillman. 1964. Further studies on the effects of different processing temperatures on the utilization of solvent-extracted cottonseed protein by sheep. *J. Anim. Sci.* 23:510–516. <https://doi.org/10.2527/jas1964.232510x>.
- Siciliano-Jones, J., and M. R. Murphy. 1986. Passage of inert particles varying in length and specific gravity through the post-ruminal digestive tract of steers. *J. Dairy Sci.* 69:2304–2311.
- Sutherland, T. M. 1986. Particle separation in the forestomachs of sheep. Pages 43–73 in *Aspects of Digestive Physiology in Ruminants*. A. Dobson and M.J. Dobson, ed. Comstock Publishing Associates. Ithaca, NY.
- Van Soest, P. J., C. J. Sniffen, and M. S. Allen. 1986. Rumen dynamics. Pages 21–42 in *Aspects of Digestive Physiology in Ruminants*. A. Dobson and M.J. Dobson, ed. Comstock Publishing Associates. Ithaca, NY.
- Vérité, R., M. Journet, J. Flechet, R. Lefavre, B. Marquis, and M. Vérité. 1977. Utilisation des tourteaux traités au formol par les vaches laitières. II. – Effets sur la production laitière du traitement des tourteaux et du niveau d’apport azoté au début de la lactation. *Ann. Zootech.* 26:183–205.
- Verite, R., B. Michalet-Doreau, P. Chapoutot, J. L. Peyraud, and C. Poncet. 1987. Révision du système des Protéines Digestibles dans l’Intestin (P.D.I.). *Bull. Tech. INRA* 70:19–34.
- Wadhwa, M., D. Paul, P. Kataria, and M. P. S. Bakshi. 1998. Effect of particle size of corn grains on the release of nutrients and *in sacco* degradability. *Anim. Feed Sci. Technol.* 72:11–17. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(97\)00185-5](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(97)00185-5).
- Waghorn, G. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—Progress and challenges. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147:116–139. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09.013>.
- Wattiaux, M. A., L. D. Satter, and D. R. Mertens. 1992. Effect of microbial fermentation on functional specific gravity of small forage particles. *J. Anim. Sci.* 70:1262–1270.
- Wattiaux, M. A., L. D. Satter, and D. R. Mertens. 1993. Factors affecting volume and specific gravity measurements of neutral detergent fiber and forage particles. *J. Dairy Sci.* 76:1978–1988. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77531-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77531-1).
- Welch, J. G. 1982. Rumination, particle size and passage from the rumen. *J. Anim. Sci.* 54:885–894. <https://doi.org/10.2134/jas1982.544885x>.
- Welch, J. G. 1990. Inert plastics as indicators of physiological processes in the gastrointestinal tract of ruminants. *J. Anim. Sci.* 68:2930–2935.
- Welch, J. G., and A. M. Smith. 1978. Particle sizes passed from rumen. *J. Anim. Sci.* 46:309–312. <https://doi.org/10.2134/jas1978.461309x>.
- Whitelaw, F. G., T. R. Preston, and G. S. Dawson. 1961. The nutrition of the early-weaned calf. II. A comparison of commercial groundnut meal, heat-treated groundnut meal and fish meal as the major protein source in the diet. *Anim. Prod.* 3:127–133.
- Zebeli, Q., M. Tafaj, I. Weber, J. Dijkstra, H. Steingass, and W. Drochner. 2007. Effects of varying dietary forage particle size in two concentrate levels on chewing activity, ruminal mat characteristics, and passage in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:1929–1942. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-354>.

APPENDIX

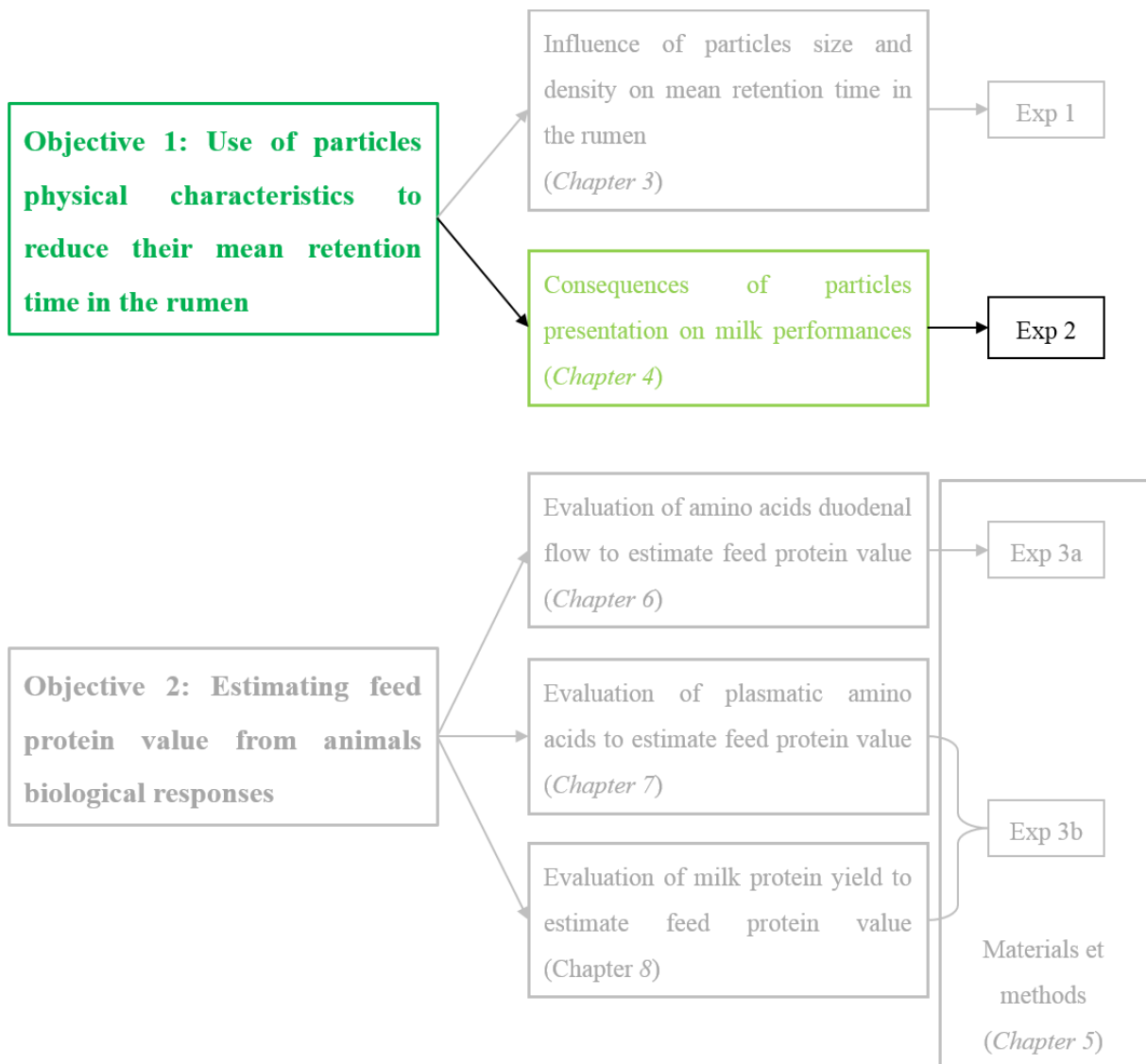
Table A1. Mean retention times (MRT, h) in the entire digestive tract and its 3 compartments (MRT1, MRT2, and TT) for the 3 sizes (1, 2, and 3 mm) and 4 densities (0.9, 1.1, 1.3, and 1.5) of plastic particles

MRT ¹ (h)	1 mm				2 mm				3 mm				SEM
	0.9	1.1	1.3	1.5	0.9	1.1	1.3	1.5	0.9	1.1	1.3	1.5	
TMRT	46.4	29.6	30.3	45.8	67.9	29.5	30.3	44.6	77.6	29.5	33.1	63.3	8.3
MRT1	24.5	9.5	10.6	19.2	43.6	8.9	9.9	20.2	50.7	8.3	11.0	28.4	9.0
MRT2	8.2	8.7	8.2	14.2	11.1	6.8	7.5	10.8	12.4	8.0	6.8	15.5	2.9
TT	13.7	11.4	11.5	12.4	13.2	13.8	12.9	13.6	14.5	13.2	15.3	19.4	1.5

¹TMRT = total MRT; MRT1 = MRT in the first compartment; MRT2 = MRT in the second compartment; TT = time until plastic particles first appear in the feces.

Part 1: Influence of particle size and density on the mean retention time in the rumen

Chapter 4 – Consequences of particles presentation on milk performances



Résumé

Augmenter l'efficacité d'utilisation des protéines des animaux est un des enjeux de l'alimentation des vaches laitières qui peut être obtenu par l'augmentation de la quantité de protéines digestibles d'origine alimentaire arrivant au duodénum. Un des leviers utilisables pour parvenir à cet objectif consiste à réduire le temps de séjour moyen dans le rumen en jouant sur la taille des particules. Les procédés de préparation des aliments concentrés en pellets par broyage et agglomération facilitent la distribution, mais peuvent affecter la dynamique des particules de concentrés et donc les performances de production. L'objectif de cet essai a été d'étudier l'influence de la forme de présentation des particules de tourteau de soja sur les performances laitières des animaux. Deux formes de tourteau de soja (Brute et Granulés) ont été distribués avec une même ration à 24 vaches laitières en lactation selon un schéma en inversion de deux périodes de deux semaines. La production laitière a été légèrement plus élevée lorsque les animaux ont reçu le tourteau de soja sous forme Brute que sous forme Granulés (35,5 vs 35,0, $P < 0,08$). Il n'y a pas eu de différence significative entre les deux traitements sur la composition du lait. L'effet sur la production peut s'expliquer par l'ingestion accrue pour la forme Brute. Le délitement des tourteaux dans le rumen ne semble pas être un phénomène de nature à modifier la disponibilité des protéines et il conviendrait de vérifier si le délitement des pellets ne délivre pas de trop petites particules propices à une fermentation plus rapide du soja dans le rumen et donc à un moindre apport de protéines métabolisables.

Abstract

Increasing protein efficiency of animals is one of the challenges of dairy cows nutrition that can be achieved by increasing the amount of digestible proteins of dietary origin at the duodenum. One of the ways that can be used to achieve this goal is to reduce the mean retention time in the rumen by adjusting the particle size. Feed preparation processes of concentrates in pellets by grinding and agglomeration facilitate distribution, but may affect concentrate particle dynamics and thus production performance. The aim of this trial was to study the influence of the form of soybean meal particles on the milk performance of animals. Two forms of soybean meal (Raw and Pellets) were distributed with the same ration to 24 milking dairy cows in a cross-over design of two 2-weeks periods. Milk production was slightly higher when the animals received soybean meal in Raw form rather than in Pellet form (35.5 vs. 35.0, $P < 0.08$). There was no significant difference between the two forms on milk composition. The effect on

production may be explained by increased ingestion for Raw form. Pellet disintegration does not appear to be a phenomenon likely to affect the availability of protein and it should be verified whether the disintegration of pellets does not produce too small particles that are conducive to faster rumen fermentation in the rumen and therefore to a lesser contribution of metabolisable proteins.

4.1. Introduction

Reducing mean retention time of dietary particles in the rumen could be a way to increase the quantity of dietary digestible protein at the duodenum and so increase protein efficiency of the animals. Mean retention time in the rumen is influenced by size of plastic particles (Chapter 3 or Dufreneix et al., 2019) or forage particles (Kennedy, 2005), but with possible antagonistic effects. Small particles are more able to pass through the reticulo-omasal orifice, but they can also be fermented more rapidly by microbes, thus reducing their metabolisable protein value. In practice, **soya bean meal (SBM)**, like many other concentrates is offer as a pellet form after being finely ground. This form is more convenient to deliver and to manage on farm but the fineness of the grinding before the pelleting process may influence the protein value if the pellet is too rapidly desegregated in a liquid phase. The objective of this chapter is to determine whether grinding and pelleting SBM is able to increase the amount of undegradable protein in the rumen and consequently, milk performances of dairy cows. Two SBM distributions forms (Raw and Pellets) were tested on 24 lactating dairy cows according to a cross-over design of two 2-weeks periods.

4.2. Materials and methods

4.2.1. Animals, experimental design and diets

24 cows (13 multiparous and 11 primiparous balanced in the two groups) from the INRA experimental farm Méjusseume (Le Rheu, France) were used in the experiment (mean \pm standard deviation; 35.8 ± 4.9 kg milk/day; 23.1 ± 3.16 kg of **Dry Matter Intake (DMI)**/day; 113 ± 17.6 day in milk at the beginning). The experimental design was a cross-over design of two 2-weeks periods, where two forms of the same SBM with the same specific density (Raw and Pellet) were distributed to the animals (Table 4.1). Each cow was fed with the two types of

SBM in a sequence of two periods with Raw – Pellet for the group 1 and Pellet – Raw for the group 2.

Table 4.1. Specific density and size distribution (in %) of the two forms of soya bean meal

	Soya bean meal size distribution	
	Raw	Pellet
Specific density	1.308	1.301
Sieve size		
3.15 mm	11.2	99.4
2 mm	17.9	0.2
1 mm	22.6	0.1
0.2 mm	47.9	0.1
<0.2 mm	0.5	0.0
GM ¹	0.59	3.13

¹ GM = Geometric mean of particle size (mm)

SBM represented 15% of a global ration including 65% of maize silage, 10% of dehydrated lucerne and 10% energetic concentrate (Table 4.2). Cows were housed in free-stalls and individually fed twice a day after each milking (started at 7:00 and 16:30). They were allowed 10% refusals and had unlimited access to water. Procedures related to the care and use of animals in the experiments were approved by an animal committee of the French Ministry of Agriculture in accordance with European Union Directive 2010/63 (European Commission, 2010).

4.2.1. Measurements and samplings

4.2.1.1. Feed intake

Each diet ingredient was weighed individually before distribution as a total mixed ration. Intake was recorded by weighing amount of feed offered and orts daily for each cow during the whole experimental period. To calculate DMI, the composition of refusals was assumed to be similar to the offered diet. The DM content (60°C, 48h) of maize silage was determined each day. For chemical analyses, samples of maize silage were pooled for each period and frozen, while the dehydrated lucerne, energy concentrate and SBM were sampled weekly. Samples of each feed were pooled over the entire experimental period for analysis. All samples were ground with a 3-blade knife mill through a 0.8-mm screen. The organic matter content was determined by

ashing for 5h at 550°C in a muffle furnace (Association Française de Normalisation, 1997). Nitrogen concentration was determined using the Dumas method (Association Française de Normalisation, 1997) with a LECO Nitrogen Determinator (LECO, St. Joseph, MI, USA). Concentrations of NDF, ADF and ADL were measured according to Van Soest *et al.* (1991) using a Fibersac extraction unit (Ankon Technology, Fairport, NY, USA). Fat content was measured by ether extraction. Starch was analysed by polarimetry (LABOCEA, Ploufragan, France). Nutritional values of feeds were calculated from their chemical compositions according to INRA (2007).

Table 4.2. Chemical composition and nutritional values of feeds (in g/kg DM unless otherwise indicated; Dry Matter: DM)

Variable	Maize silage	Concentrate ¹	Soya bean meal	Dehydrated
				lucerne
Organic matter	965	866	901	892
Crude protein	75	115	488	173
Neutral detergent fibre	418	209	104	449
Acid detergent fibre	228	88	61	338
Acid detergent lignin	26	17	9	87
Starch	278	366	66	30
Fatty acids	14	26	35	17
Net energy, UFL/kg DM ²	0.94	0.93	1.22	0.71
Metabolisable protein ³				
g PDIE/kg DM	67	99	214	92
g PDIN/kg DM	46	79	329	108

¹ Contained (in %) 20 wheat, 20 maize, 20 barley, 20 beet pulp, 15 wheat feed flour, 3 sugar cane molasses, 1 rapeseed oil, 1 salt + mineral

² UFL: amount of net energy for milk production contained in 1 kg of a reference barley (87% dry matter, 2,700 kcal of metabolisable energy), based on the INRA feeding system (INRA, 2007)

³ PDIE: truly digestible (dietary + microbial) protein when available energy decreases microbial growth; PDIN: truly digestible (dietary + microbial) protein when available degradable nitrogen decreases microbial growth, based on the INRA feeding system (INRA, 2007)

4.2.1.2. Size and functional specific gravity characterization

The two distributed forms (Raw and Pellet) were characterized according to their size and specific density (Table 4.1). The size distribution was realized on four different sieves (3.15, 2, 1 and 0.2 mm) and feeds were sieved during 20 min each (Vibratory Sieve Shaker AS 200 basic, Retsch, Germany). Specific density included both density of feeds and gas and/or water associated to the feed. It was obtained according to the pycnometer method. Briefly, the mass of an irregular solid was determined by weighing. When the solid was placed in a pycnometer filled with distilled water of known density, the volume of the liquid which overflowed was equal to the volume of the solid. The mass of the liquid which overflowed was determined as the difference between the sum of the mass of the pycnometer filled with liquid plus the mass of the solid and the mass of the pycnometer filled with liquid after the solid has been placed inside. The volume occupied by this mass is determined from the known density of the liquid. The specific density of the solid is determined from these measurements of mass and volume.

4.2.1.3. Milk yield and composition

Milk yield was recorded at each milking and fat and protein contents were determined 3 d/week by infrared analysis (Lillab, Châteaugiron, France), separately on the morning and evening milking during the whole experiment.

4.2.2. Statistical analysis

Effects of Raw and Pellet form on milk production and milk composition were determined using data from the last week of each period. The following MIXED model procedure of SAS Enterprise 6.1 was applied:

$$Y_{i,j,k,l} = \mu + P_i + A_{j(i)} + W_k + T_l + (PT)_{il} + e_{ijkl}$$

where $Y_{i,j,k,l}$ is the variable studied, μ is the mean, P_i is the effect of parity i , $A_{j(i)}$ is the random effect of cow j in parity group i , W_k is the effect of period k , T_l is the effect of treatment l , $(PT)_{il}$ is the effect of the interaction between parity i and dietary treatment l , and e_{ijkl} is the residual error. Values were considered significant at $P < 0.05$ and trend was considered at $P \leq 0.10$.

4.3. Results and discussion

Generally, Raw treatment of SBM showed higher value of intake and milk performances than Pellet treatment. Differences were significant for the supply of energy and metabolisable protein but only trends were observed for DMI and milk yield.

Table 4.3. Adjusted means of diet composition, milk production and composition by soya bean meal size distribution of 24 dairy cows (DMI: dry matter intake; MP: metabolisable protein; RSD: residual standard deviation).

Variable	Soya bean meal size distribution		RSD	P-value
	Raw	Pellet		
Diet / ration				
DMI, kg DM/d	23.0	22.7	0.32	0.07
Net energy, UFL/d ¹	21.4	21.1	0.28	0.04
MP, g PDIE/d ²	2207	2170	30.6	0.02
Milk				
Milk yield, kg/d	35.5	35.0	0.86	0.08
Protein content,				
g/kg	30.8	30.5	0.41	0.35
Fat content, g/kg	38.7	38.5	0.70	0.63
Protein yield, g/d	1090	1071	22.7	0.11
Fat yield, g/d	1372	1356	31.4	0.25

¹ UFL: amount of net energy for milk production contained in 1 kg of a reference barley (87% dry matter, 2,700 kcal of metabolisable energy), based on the INRA feeding system (INRA, 2007)

² PDIE: truly digestible (dietary + microbial) protein when available energy decreases microbial growth, based on the INRA feeding system (INRA, 2007)

The higher value DMI of the Raw treatment could have been due to the preference of the cows for this form of presentation, which was not expected. But the disintegration of Pellet form in the rumen may also have led to very small particles sizes, which are more likely to be fermented by micro-organisms (Stern et al., 1994; Lykos and Varga, 1995; Wadhwa et al., 1998). It implies a higher duodenal protein supply, which in turn could have increased DMI (Faverdin et al., 2003). The higher milk yield with Raw compared Pellet treatment are more likely related to the difference in DMI between the two treatments. Indeed, literature shows variable responses

of DMI and milk performance to the presentation form or size of concentrates. Studying the effect of pelleted and non-pelleted ground sunflower seeds, Dos Santos et al. (2011) reported no effect on DMI, milk yield, protein content and yield but a decrease of fat content with pelleted concentrates. However, Fredin et al. (2015) reported no effect of particle size of corn grains on DMI and milk performance. On soybeans, Scott et al. (1991) and Tice et al. (1993) reported no effect of particle size on DMI and milk performances. Dhiman et al. (1997) have studied the effect of four size of roasted soybeans on milk performances and they reported a significant effect on milk yield and milk protein yield with on optimum for the size 2.92 mm and a decrease of milk fat yield with the decrease of size.

These variables responses may be linked to different factors: the absence of controlled ingestion, the low number of animals in some studies, an absence of clear separation between the different size distributions or differences of response between feeds. In our study, we probably have a lack of controlled ingestion and clear separation between tested sizes, which would need further investigations.

We know for the previous chapter (Chapter 3; Dufreneix et al., 2019) that size and density of plastic particles influence the mean retention time in the rumen. We have assumed that a dietary particle of 1.1 to 1.3 specific density and 3-4 mm size will have the shortest mean retention time in the rumen and so may increase the quantity of dietary digestible protein at the duodenum. It appears difficult from literature to conclude on an effect of particle size on milk performances, which would have confirmed our assumption. However, the study performed by Dhiman et al. (1997) is interesting as they have tested, and found, effects of size distribution of roasted soybeans on milk performances: they reported an optimum of milk yield and milk protein yield for a 2.92 mm size, which is consistent with our assumption of a size of 3 to 4 mm. Besides, in Dhiman et al. (1997) soybeans were roasted i.e. protected from ruminal degradations. Therefore, the reduction of mean retention time by variations of physical characteristics of particle may not be sufficient to increase digestible protein at the duodenum but these effects may be increased by the association with a process aimed at reducing ruminal degradability such as heat in Dhiman et al. (1997) study. Nevertheless, these results need confirmation with studies designed to highlight such potential interactions.

Conclusion

This trial was design to study the effect of physical form of SBM on milk performances. A trend of higher milk yield was observed for Raw compared to Pellet treatment mainly linked to

higher DMI. A lower intake with the pellet form can be due either to a lower preference of cows for the pellet form or to effect of grinding on fermentation and protein availability. If the pellet form disaggregates rapidly in the rumen, only very small particles are present with a possible lower protein escape and a faster degradation of particles, which can lead to a small reduction in intake. A specific digestive study should be pertinent to explain this response and perhaps to reconsider the form of presentation maximizing the protein values of feeds.

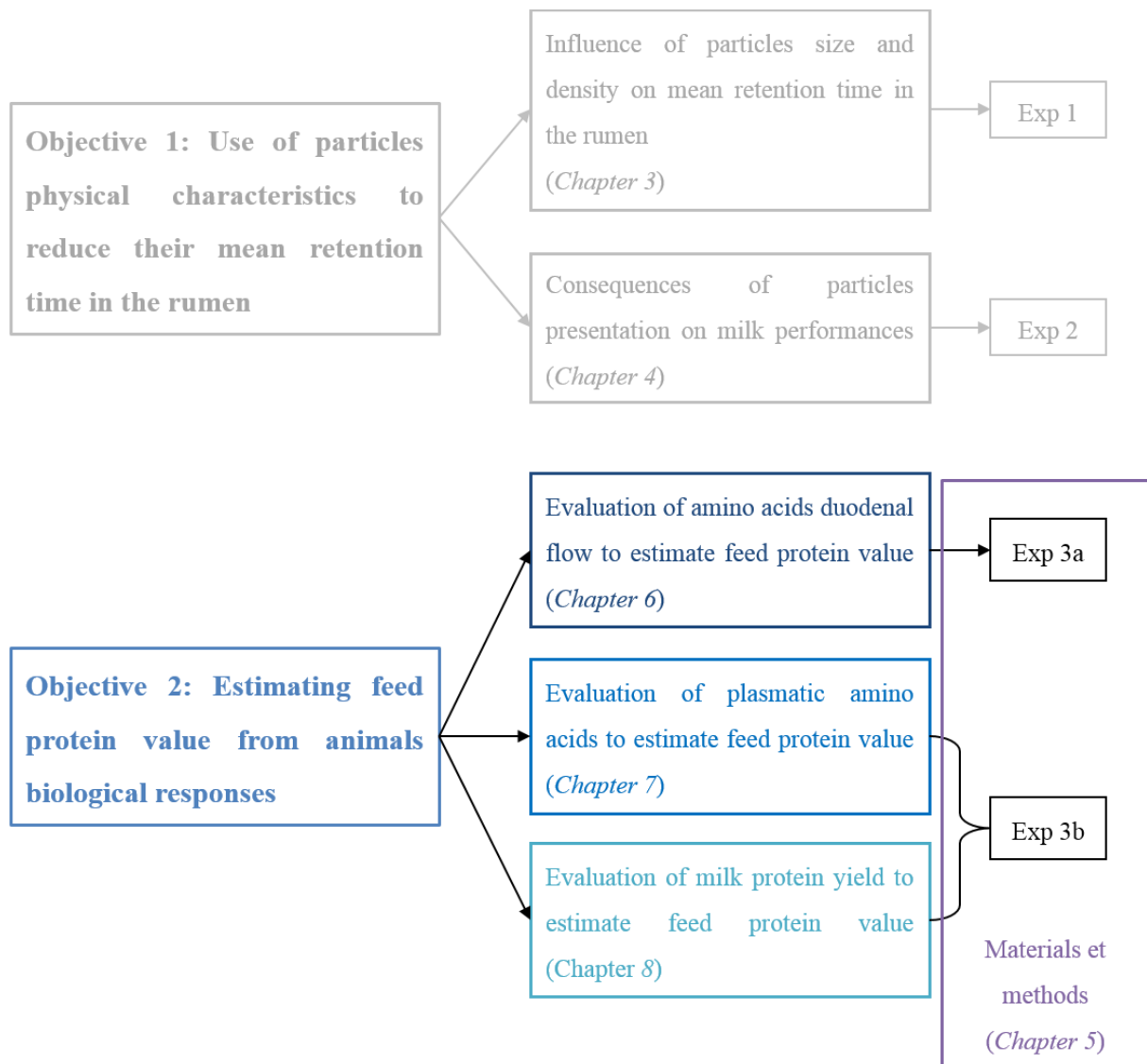
4.4. Reference

- Association Française de Normalisation 1997. Aliments des animaux - Dosage de l'azote - Méthode par combustion (DUMAS) - NF V18-120; Dosage des cendres brutes - NF V18-101. Association Française de Normalisation, Saint-Denis La Plaine, France.
- Dhiman TR, Korevaar AC and Satter LD 1997. Particle size of roasted soybeans and the effect on milk production of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 80, 1722–1727.
- Dos Santos WBR, Santos GTD, da Silva-Kazama DC, Cecato U, de Marchi FE, Visentainer JV and Petit HV 2011. Production performance and milk composition of grazing dairy cows fed pelleted or non-pelleted concentrates treated with or without lignosulfonate and containing ground sunflower seeds. *Animal Feed Science and Technology* 169, 167–175.
- Dufreneix F, Faverdin P and Peyraud J-L 2019. Influence of particle size and density on mean retention time in the rumen of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 102, 3010–3022.
- Faverdin P, M'hamed D and Vérité R 2003. Effects of metabolizable protein on intake and milk production of dairy cows independent of effects on ruminal digestion. *Animal Science* 76, 137–146.
- Fredin SM, Ferraretto LF, Akins MS, Bertics SJ and Shaver RD 2015. Effects of corn-based diet starch content and corn particle size on lactation performance, digestibility, and bacterial protein flow in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 98, 541–553.
- INRA 2007. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux - Valeurs des aliments. Editions Quae, Versailles (FRA).
- Kennedy PM 2005. Particle dynamics. In *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism - Second Edition* (eds. J. Dijkstra, J.M. Forbes and J. France), pp. 123–156. Cambridge, USA.
- Lykos T and Varga GA 1995. Effects of Processing Method on Degradation Characteristics of Protein and Carbohydrate Sources In Situ. *Journal of Dairy Science* 78, 1789–1801.
- Scott TA, Combs DK and Grummer RR 1991. Effects of roasting, extrusion, and particle size on the feeding value of soybeans for dairy cows. *Journal of Dairy Science* 74, 2555–2562.
- Stern MD, Varga GA, Clark JH, Firkins JL, Huber JT and Palmquist DL 1994. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science* 77, 2762–2786.
- Tice EM, Eastridge ML and Firkins JL 1993. Raw soybeans and roasted soybeans of different particle sizes. 1. digestibility and utilization by lactating cows. *Journal of Dairy Science* 76, 224–235.

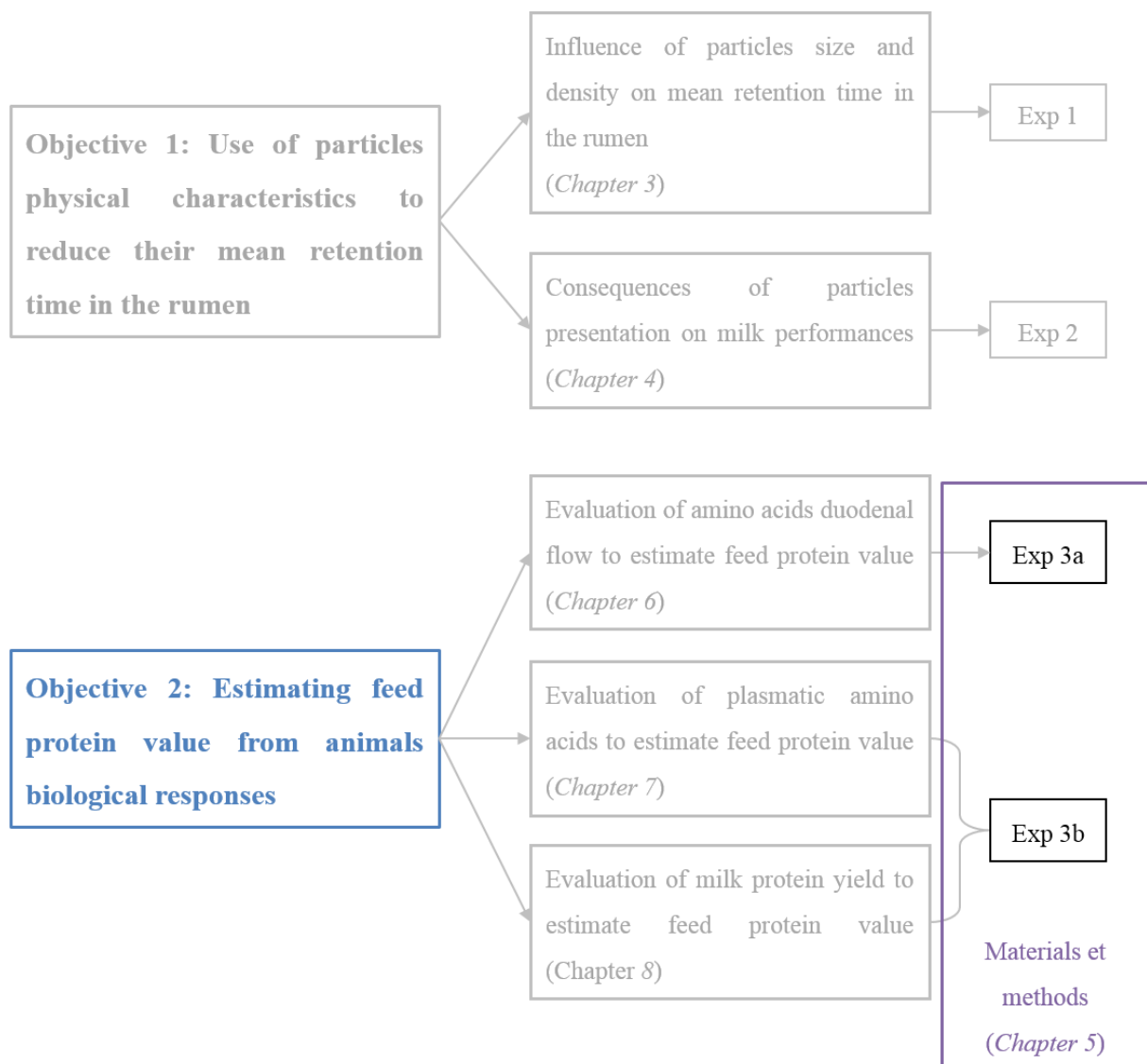
Van Soest PJ, Robertson JB and Lewis BA 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583–3597.

Wadhwa M, Paul D, Kataria P and Bakshi MPS 1998. Effect of particle size of corn grains on the release of nutrients and in sacco degradability. *Animal Feed Science and Technology* 72, 11–17.

Part 2 – Estimating feed protein value from biological responses



Chapter 5 – Materials and methods



Two experiments including four fistulated lactating dairy cows (Exp 3a) and 24 dairy cows in lactation (Exp 3b) were carried out to assess different methods to estimate the protein value of feeds. The methods were the use of duodenal flow of amino acids (Chapter 6), variations in plasmatic amino acids concentration (Chapter 7) and milk protein yield responses (Chapter 8). This chapter aims to describe the materials and methods employed for these three chapters. The same experimental treatments were applied to all animals, composed of four dietary treatments of increasing level of metabolisable proteins. Two dietary control treatments of known protein value were used to determine the biological response of animals from which the unknown protein value of two medium dietary treatments were estimated. Specific measurements performed on fistulated animals (Exp 3a) or dairy cows (Exp 3b) are specified below.

5.1. Animals, experimental design and diets

Four rumen and duodenal fistulated multiparous cows from the INRA experimental farm Méjusseume (Le Rheu, France) were used in Exp 3a (mean \pm SD; 39.6 \pm 2.7 kg milk/day; 710 \pm 79 kg BW; 79 \pm 25 day in milk at the beginning). Four dietary treatments were applied in a 4 \times 4 Latin square design during four 3-week periods. Cows were attached in individual stalls and individually fed twice a day at 8:00 and 20:00. The cows had unlimited access to water and mineral stone. They were milked twice a day at 7:30 and 16:30 in their stall.

A total of 24 cows, composed of 8 multiparous (mean \pm SD; 36.5 \pm 1.3 kg milk/day; 23.4 \pm 1.1 kg of DMI/day; 674 \pm 20 kg BW; 206 \pm 9 day in milk at the beginning) and 16 primiparous (29.9 \pm 3.2 kg milk/day; 20.8 \pm 0.8 of DMI/day; 632 \pm 40 kg BW; 210 \pm 18 day in milk at the beginning; 25.7 \pm 4 months of age at calving) cows from the INRA experimental farm Méjusseume (Le Rheu, France), were used in the Exp 3b. They were divided into 6 blocks of 4 cows homogeneously grouped by parity and production level (based on daily milk yield during a 15-day pre-experimental period). In each block, a 4 \times 4 Latin square design with the same four dietary treatments as in Exp 3a was applied during four 3-week periods (Table 5.1). Cows were housed in free-stalls and individually fed twice a day after each milking (started at 7:00 and 16:30). The cows had unlimited access to water and mineral stone.

Table 5.1. Latin square distribution of the four dietary treatments¹ in each of the 6 blocks of 4 dairy cows homogenised according to parity (*M*: multiparous; *P*: primiparous) and milk production level (*PL*) for the Exp 3b.

Parity	PL (kg/d) ²	Block	Cow	Period			
				1	2	3	4
M	37.5	1	1	LC	ML	MH	HC
			2	ML	HC	LC	MH
			3	MH	LC	HC	ML
			4	HC	MH	ML	LC
M	35.5	2	5	LC	ML	MH	HC
			6	ML	HC	LC	MH
			7	MH	LC	HC	ML
			8	HC	MH	ML	LC
P	33.6	3	9	LC	ML	MH	HC
			10	ML	HC	LC	MH
			11	MH	LC	HC	ML
			12	HC	MH	ML	LC
P	30.8	4	13	LC	ML	MH	HC
			14	ML	HC	LC	MH
			15	MH	LC	HC	ML
			16	HC	MH	ML	LC
P	28.3	5	17	LC	ML	MH	HC
			18 ³	ML	HC	LC	MH
			19	MH	LC	HC	ML
			20	HC	MH	ML	LC
P	27.0	6	21	LC	ML	MH	HC
			22	ML	HC	LC	MH
			23	MH	LC	HC	ML
			24	HC	MH	ML	LC

¹ Dietary treatments are distinguished by increasing protein content: low control (LC), medium low (ML), medium high (MH) and high control (HC)

² Mean milk production per block during a 15-day pre-experimental period

³ Cow excluded from the experiment due to inflammation of the hock

In the two trials, cows were fed a basal mixed ration composed of 78% maize silage, 9.5% dehydrated lucerne, 7.5% soya bean meal, 5% energy concentrate and minerals (5.5% P, 27% Ca and 4% Mg) (Table 5.2). The amounts of mixed rations offered, including concentrates for treatments, were limited and calculated to supply the net energy required to cover the expected

mean milk production of cows within a block during the experiment. Consequently, they differed among blocks.

Table 5.2. Chemical composition and nutritional values of feeds (in g/kg DM unless otherwise indicated; DM: Dry Matter)

Variable	Maize silage	Concentrate ¹	Soya bean meal	Dehydrated
				lucerne
Dry matter, %	30.1	89.6	89.6	93.0
Organic matter	963	951	927	886
Crude protein	58	109	489	170
Neutral detergent fibre	445	238	119	449
Acid detergent fibre	233	96	67	334
Acid detergent lignin	15	16	5	84
Starch	229	464	49	31
Fatty acids	21	48	25	25
Net energy, UFL/kg DM ²	0.90	1.08	1.16	0.58
Metabolisable protein ³				
g PDIE/kg DM	66	97	252	92
g PDIN/kg DM	36	73	358	114

¹ Contained (in %) 20 wheat, 20 maize, 20 barley, 20 beet pulp, 15 wheat feed flour, 3 sugar cane molasses, 1 rapeseed oil, 1 salt

² UFL: amount of net energy for milk production contained in 1 kg of a reference barley (87% dry matter, 2,700 kcal of metabolisable energy), based on the INRA feeding system (INRA, 2007)

³ PDIE: truly digestible (dietary + microbial) protein when available energy decreases microbial growth; PDIN: truly digestible (dietary + microbial) protein when available degradable nitrogen decreases microbial growth, based on the INRA feeding system (INRA, 2007)

The four experimental treatments were isoenergetic and differ by increasing **Metabolisable Protein** (MP) level. A fixed quantity of concentrate was added to the mixed ration. For **Low Control** (LC) and **High Control** (HC) the concentrate was composed exclusively of energetic concentrate and soya bean meal, respectively, with known protein contents. The two medium treatments, used to validate the method for estimating protein value, contained a mix of these two feeds (**Medium Low**: ML and **Medium High**: MH) (Table 5.3). Urea was added in proportion to all diets to provide an unlimited supply of degradable nitrogen in the rumen. A supply of 80 g of urea was added to replace each kg of soya bean meal to maintain a constant

indicator of degradable nitrogen available for microbes ((PDIN-PDIE)/UFL), with a small excess of about 10 g/UFL (UFL: milk feed units).

Table 5.3. *Distribution of soya bean meal and energetic concentrate in four dietary treatments¹ enriched with urea to ensure the same microbial synthesis in dairy cows*

Treatment	Soya bean meal (kg)	Energetic concentrate (kg)	Urea (kg)	PDIE ² (g/kg DM)
LC ¹	0	3.4	0.28	97
ML	1.1	2.4	0.18	151
MH	2.0	1.2	0.09	204
HC	3.3	0	0	252

¹ Dietary treatments are distinguished by increasing protein content: low control (LC), medium low (ML), medium high (MH) and high control (HC)

² PDIE: truly digestible (dietary + microbial) protein when available energy decreases microbial growth, based on the INRA feeding system (INRA, 2007)

5.2. Measurements and samplings

The feed intake, milk yield and composition, and blood sampling were measured similarly for each cow in the two experiments (Exp 3a and 3b).

5.2.1. Feed intake

For Exp 3a, each diet ingredient was weighed individually before manual distribution as a total mixed ration. Intake was recorded by manual weighing amount of feed offered and orts daily for each cow during the whole experimental period. During the last week of each period, 250-g of corn silage was collected on day 15, 17 and 19, pooled by period and cows and then frozen (- 20°C) for chemical analysis. 300-g of soya bean meal and energetic concentrate was collected on d 19, pooled over the whole experimental trail and frozen (- 20°C). If orts were present, DM content (60°C, 48h) were determined and a 250-g samples was collected and frozen (- 20°C) for chemical analysis to correct diet nutriment intake.

For Exp 3b, each diet ingredient was weighed individually before distribution as a total mixed ration. Intake was recorded by weighing amount of feed offered and orts daily for each cow during the whole experimental period. DMI was calculated assuming that refusals had the same composition than the offered diet.

For the both experiments, the DM content (60°C, 48h) of corn silage was determined daily whereas DM contents of the other feeds were determined once a week.

5.2.2. Milk yield and composition

Milk yield was recorded at each milking and fat and protein contents were determined 2 d/week during the first two weeks and 3 d/week during the last week of each period by infrared analysis, separately on the morning and evening milking. Lactose was measured 1 d/week during the whole experimental period and milk urea was measured 1 d/week during the last week of each period by infrared analysis (Lillab, Châteaugiron, France). A sample of milk (10 ml) was also taken during a morning milking of the last week and stored at + 4°C for urea analysis by enzymatic method.

5.2.3. Blood sampling

Blood was sampled from the tail during the morning meal at the end of each period. At each sampling, about 1 x 10 mL of blood was collected in heparinized syringes (S. Monovette, Sarstedt, Nümbrecht, Germany) for urea, glucose, non-esterified fatty acids and **amino acid** (AA) analyses. Samples were immediately centrifuged (2,000 x g for 15 min at 4°C) and plasma was aliquoted and stored at -80°C for AA analyses and at -20°C for urea, glucose and non-esterified fatty acids analyses.

5.2.4. Specific measurements of digestibility trial (Exp 3a)

5.2.5. Total tract digestibility and urine sampling

The distribution of the different samples within an experimental period is summarized in Table 5.4.

Total tract digestibility was determined by daily total faeces collection over 4 days (from d 16 to 19). To separate urine from faeces, a flexible pipe connected to a 30-L container containing 500 mL of 20% sulphuric acid was fixed to each cow. Faeces were weighted at 09h00 and mixed before sampling: an aliquot of 300g of the total daily excretion was pooled per period and per animal for DM content. Total urine excretion was weighted at the same time and an aliquot of 0.5% was sampled and pooled per animal and stored at – 20°C for N and urea determination.

5.2.6. Nutrient flow

Duodenal nutrient flows were determined using **polyethylene glycol (PEG)** and **ytterbium chloride (Yb)** as liquid and particle phase markers and **Diaminopimelic Acid (DAPA)** as microbial marker. PEG and Yb solutions were infused continuously into the rumen via the ruminal cannula using peristaltic pumps from d 10 to 19 (i.e. 6 d before duodenal samplings) to ensure a steady state before sampling. A daily quantity of 277 g of PEG dissolved in 2.5 L of water was infused for each cow after an initial overload of 250 g of PEG dissolved in 1 L of water on d 10. A daily quantity of 2 g of Yb dissolved in 1 L of water was infused for each cow after an initial overload of 2 g of Yb dissolved in 1 L of water on d 10. From d 16 to 19, 250-g of the daily faecal excretion was sampled, pooled per cow, and frozen at - 20°C for Yb and chemical composition analysis and conserved at + 4 °C for PEG analysis. Thirteen duodenal samples of 300 mL were collected from d 16 to 18, to provide a representative sample of duodenal contents of a 12h-feeding. 250 mL of each sample were pooled per animal and per period and frozen (- 20°C) for Yb, DAPA and chemical analysis. 40 mL of each sample were pooled per animal and per period and stored at + 4°C for PEG analysis. To obtain a reference sample of bacteria, 2 L sample representative of ruminal content was collected before, 3 and 6 h after the morning feeding only once at the beginning of the trial on d10. Samples were pooled per animal and period and centrifuged at 1,000g during 30 min at + 4°C. The supernatant was collected and ultra-centrifuged using a continuous flow centrifuge during 15 min at 40.000g. Pellets collected after the ultra-centrifugation are frozen (- 20°C) for DAPA and nitrogen analysis.

5.2.7. Characteristics of ruminal fluid

On d 19, 100 mL of ruminal fluid was collected by suction through a pipe inserted in the ventral sac just before and 1, 2, 3, 4, 6 and 8 h after the morning feeding. Samples were immediately strained through a 250-µm-pore nylon filter and pH was determined directly. 4 mL was added with 4 mL of sodium chloride (20%) for ammonia (NH₃) content determination, and 8 ml was added with 0.5 mL phosphoric acid (5%) for **Volatile Fatty Acids (VFA)** determination before being frozen (- 20°C).

Table 5.4. Samplings distribution over one experimental period for rumen and duodenal fistulated cows (Exp 3a)

		W1						W2						W3								
		M	T	W	T	F	S	S	M	T	W	T	F	S	S	M	T	W	T	F	S	S
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Feeds		* * *																				
Markers																						
	Overload	*																				
	Perfusion	* * * * * * * * * *																				
Samples																						
	Ruminal characteristics	*																				
	Bacteria	*																				
	Duodenum	Blank ¹ * * *																				
	Faeces	Blank ¹ * * * *																				
	Urine	* * * *																				
	Milk	* * * * * * *																				
	Blood	*																				

¹ Only once at the beginning of the trial

5.3. Chemical analysis

All frozen samples were freeze-dried and ground with a 3-blade knife mill through a 0.8-mm screen. The **organic matter** (OM) content was determined by ashing for 5h at 550°C in a muffle furnace (Association Française de Normalisation, 1997). The concentrations of NDF, ADF and ADL were measured according to Van Soest et al. (1991) using a Fibersac extraction unit (Ankon Technology, Fairport, NY, USA). Fat content was measured by ether extraction and starch analyses were performed by polarimetry (LABOCEA, Ploufragan, France). Nitrogen concentration for all samples was determined by the Dumas method (Association Française de Normalisation, 1997) with a LECO Nitrogen Determinator (Leco, St Joseph, MI, USA). Nutritive values of feeds were calculated from their chemical composition according to INRA (2007).

Milk and blood urea, blood glucose, blood non-esterified fatty acids and ruminal NH₃ were analysed using colorimetric enzymatic reactions on a multiparameter analyser (KONE

Instruments Corporation, Espoo, Finland). Milk samples were first ultracentrifuged before urea analysis. Ruminant volatile fatty acids were analysed by gas chromatography on an Agilent 7890A gas chromatograph apparatus (Agilent Technologies, Santa Carla, USA) using isocaproic acid as internal control.

Blood plasma AA concentrations were determined using a UPLC/MS (Waters Acquity Ultra Performance LC system, Waters Corp.) as described by Haque et al. (2012). Duodenal AA concentrations were determined by gas chromatography performed by Adisseo France S.A.S. Duodenal and bacterial samples for DAPA determination were hydrolysed in 50 mL of hydrochloric acid 6N at 104°C during 20h. Norvaline was used as internal marker. After hydrolysis, 2mL were taken and evaporated on an evaporator EZ2-Plus HCl (Genevac – SP scientific, Warminster, PA, USA). The pellet obtained was taken over in 1mL of deionised water (Milli-Q water system, Merck, Darmstadt, Germany) and passed through a 0.2-µm filter. The pH was then adjusted to 8.85. The derivatization of the samples was performed using a MassTrak AAA derivatization kit (Waters Corporation, Milford, MA, USA) following the procedure of Hong et al. (2009). Samples were analysed using a UPLC/MS (Waters Acquity Ultra Performance LC system, Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipped with an Acquity Tunable UV Detector and a mass detector (Simple Quadripole Detector) to detect the small amounts of DAPA. The column used was a MassTrak AAA column (2.1 × 150 mm, 1.7 µm; Waters Corp.).

Faecal and duodenal samples for Yb were mineralized, solubilized in boiling nitric acid, diluted and filtered before being analysed by atomic absorption using a Varian SpectrAA 220G Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometer (LabX, Midland, Canada) by the standard addition method. Faecal and duodenum samples for PEG concentration determination were analysed using the turbidimetric method of Hyden (1955) modified by Malawer and Powel (1967).

All samplings and chemical analysis performed on rumen and duodenal fistulated animals (Exp 3a) are summarized in Figure 5.1. Milk and blood samplings concerned all the animals of the two experiments (Exp 3a and b).

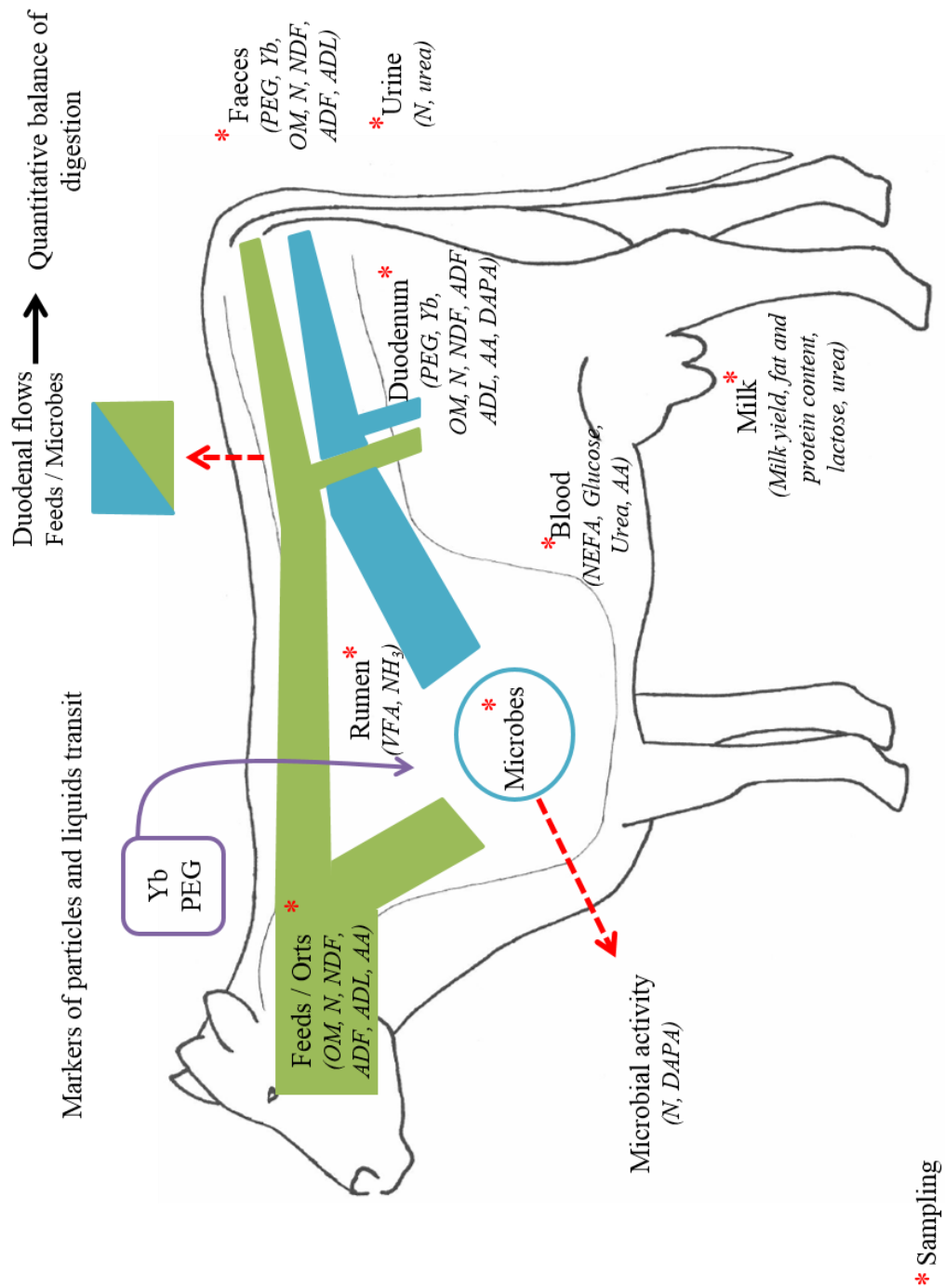


Figure 5.1. Samplings and chemical analysis performed on rumen and duodenal fistulated animals during an experimental period of Exp 3a (OM: organic matter; N: nitrogen; NDF: neutral detergent fiber; ADF: acid detergent fiber; ADL: acid detergent lignin; DAPA: diaminopimelic acid; VFA: volatile fatty acid; NH₃: ammoniac; Yb: ytterbium; PEG: polyethylene glycol). Milk and blood samplings concerned all the animals of the two experiments (Exp 3a and b).

5.4. Statistical analysis

Effects of dietary treatments on milk production, milk composition and blood composition were determined using data from the last two weeks of each period. Nitrogen flows and digestibility were determined using data from the last week of each period. The following MIXED model procedure of SAS Enterprise 6.1:

$$Y_{i,j,k,l} = \mu + P_i + A_{j(i)} + W_k + T_l + (PT)_{il} + e_{ijkl}$$

where $Y_{i,j,k,l}$ is the variable studied, μ is the mean, P_i is the effect of parity i , $A_{j(i)}$ is the random effect of cow j in parity group i , W_k is the effect of period k , T_l is the effect of dietary treatment l , $(PT)_{il}$ is the effect of the interaction between parity i and dietary treatment l , and e_{ijkl} is the residual error. Orthogonal contrasts (linear and quadratic) were applied to the means of variables to test the overall response. Values were considered significant at $P < 0.05$.

5.5. Ethics statement

Procedures related to the care and use of animals in the experiments were approved by an animal committee of the French Ministry of Agriculture (APAFiS #5686-201606132002401 v3) in accordance with European Union Directive 2010/63 (European Commission, 2010).

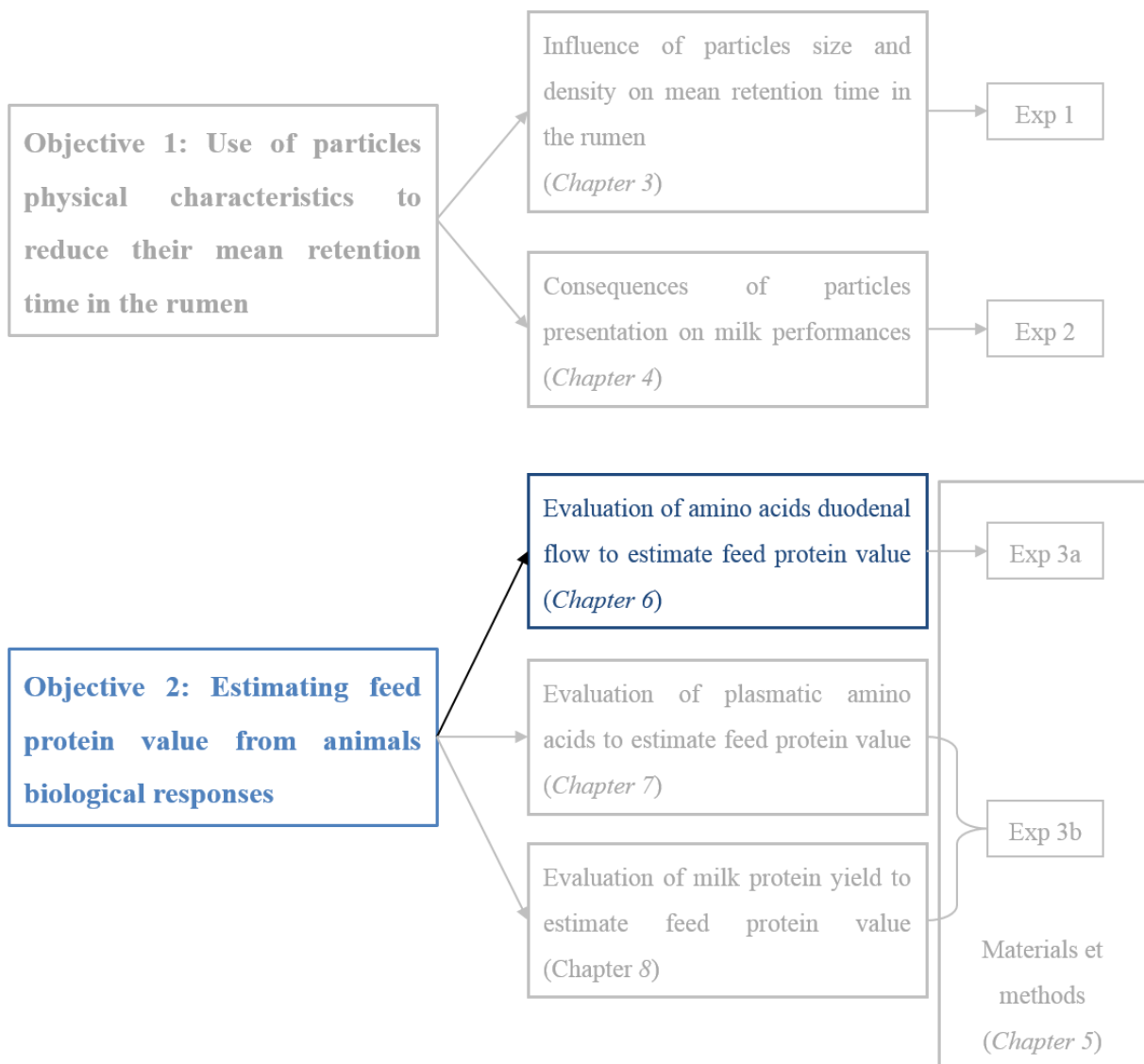
5.6. Acknowledgements

These studies were supported by the European Union, the Regional council of Pays de la Loire and the Research Council of Brittany in the project “DY+” (no. RPDC160116CR0520040) conducted by the cluster organisation “Valorial”. We would like to thank all the animal technicians of the Méjusseume experimental station, especially G. Bouillet and D. Sidaner for managing the Exp 3b, P. Lamberton, D. Chevrel, A. Chauvin, J.-L. Harel, J.-Y. Thebault for the care of the animals and managing the Exp 3a and the laboratory technicians M. Texier, C. Mustière, N. Huchet and T. Le Mouël for all of the analyses.

5.7. References

- Association Française de Normalisation 1997. Aliments des animaux - Dosage de l'azote - Méthode par combustion (DUMAS) - NF V18-120; Dosage des cendres brutes - NF V18-101. Association Française de Normalisation, Saint-Denis La Plaine, France.
- Haque MN, Rulquin H, Andrade A, Faverdin P, Peyraud JL and Lemosquet S 2012. Milk protein synthesis in response to the provision of an “ideal” amino acid profile at 2 levels of metabolizable protein supply in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95, 5876–5887.
- Hong P, Wheat TE and Diehl DM 2009. Analysis of physiological amino acids with the Masstrak™ amino acid analysis solution. In Waters application notes, pp. 1–6. Milford, MA, USA.
- Hyden S 1955. A turbidimetric method for the determination of higher polyethylene glycol in biologicals materials. *Ann. roy Agric. Cool. Sweden* 21, 139–145.
- INRA 2007. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux - Valeurs des aliments. Editions Quae, Versailles (FRA).
- Malawer SJ and Powel DW 1967. An improved turbidimetric analysis of polyethylene glycol utilizing an emulsifier. *Gastroenterology* 53, 250–256.
- Van Soest PJ, Robertson JB and Lewis BA 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583–3597.

Chapter 6 – Evaluation of amino acids duodenal flow to estimate feed protein value



Résumé

L'estimation de la valeur protéique des aliments est réalisée par différentes méthodes dont la méthode *in vivo* qui sert de référence malgré certaines limites (faible nombre d'animaux, variabilité lié à l'utilisation de marqueur). L'objectif principal de cet essai était d'estimer la valeur protéique de quatre régimes alimentaires à partir de la mesure du flux d'**acides aminés** (AA) total au duodénum en comparaison de celle prédite par le système d'alimentation INRA (2007). L'objectif secondaire est d'étudier la possibilité d'estimer les différentes fractions (endogène, microbienne et les quatre aliments composant la ration) à partir du profil en AA au duodénum et de déterminer si elles reflétaient bien la composition des différents régimes expérimentaux. Quatre régimes alimentaires de valeur PDI croissante obtenue par substitution d'un concentré énergétique par un tourteau de soja (CB : Contrôle Bas, 97 g PDIE/kg MS ; MB : Médium bas, 143 g PDIE/kg MS ; MH : Médium Haut, 195 g PDIE/kg MS ; CH : Contrôle Haut, 252 g PDIE/kg MS) ont été distribués à quatre vaches laitières fistulées au rumen et au duodénum. L'augmentation de la teneur en PDI de la ration entraîne une augmentation linéaire significative du flux total AA au duodénum. L'estimation de la valeur protéique des régimes alimentaires à partir du flux total d'AA duodénaux retrace bien l'augmentation en PDI qu'ils apportent. En relatif du CB, les régimes alimentaires MB, MH et CH diffèrent seulement de 9 g PDIE/kg MS par rapport aux valeurs obtenues avec INRA (2007). L'estimation des différentes fractions duodénales à partir du profil en AA au duodénum illustre bien la substitution du concentré énergétique par le tourteau de soja voulue par les différents régimes alimentaires. En revanche, la méthode reste sensible aux profils AA utilisés pour la fraction microbienne de référence et pour la fraction alimentaire entrant dans l'intestin.

Abstract

Estimating feed protein value is performed by various methods developed over the years whose *in vivo* method serves as a reference despite certain limits (low number of animals, variability related to the use of markers). The main objective of this trial was to estimate the protein value of four dietary treatments from the measurement of the total **amino acid** (AA) flow at the duodenum compared to that predicted by the INRA feeding system (2007). The secondary objective is to study the possibility of estimating the different fractions (endogenous, microbial and the four feeds composing the ration) from the AA profile at the duodenum and to determine if they reflect the composition of the different experimental diets. Four dietary treatments of increasing metabolisable protein (MP) value obtained by substituting an energetic concentrate

with a soya bean meal (LC: Low Control, 97 g PDIE / kg DM, ML: Medium Low, 143 g PDIE / kg DM, MH: Medium High, 195 g PDIE / kg MS, HC: High Control, 252 g PDIE / kg DM) were distributed to four rumen and duodenum-fistulated dairy cows. Measurement of duodenal flow shows that the increasing of MP induced a significant linear increase in total AA duodenal flow. The estimation of feed protein value from the total AA duodenal flow reflected the increase in MP intake. Relative to LC, dietary treatments ML, MH and HC differed only 9 g PDIE/kg DM from the values obtained with INRA (2007). The estimation of the different duodenal fractions from the AA duodenum profile clearly illustrates the substitution of the energy concentrate by the soya bean meal desired by the different experimental diets. However, the method remains sensitive to the AA profiles used for the microbial and feeds fractions.

6.1. Introduction

The prediction of protein supply in ruminants is always complex due to the important role of the microbial digestion and nutrient reorganisation in the rumen. The digestive approach measuring protein duodenal flow can be considered as the reference method to assess protein supply to the ruminants. However, it is a complex methodology requiring duodenal fistulated cows, which limits the number of measurements. Besides, the estimation of the different duodenum supplies (microbial, dietary and endogenous) requires the use of flow and microbial markers, which induce uncertainty of measurements in duodenal flow and microbial duodenal flow (Broderick and Merchen, 1992; Dewhurst et al., 2000; Firkins et al., 2006). The main objective of this chapter is to assess the precision of total **Amino Acids** (AA) duodenal flow to estimate feed protein value of feedstuff generally predicted by the INRA feeding system (2007). The secondary objective concerns the possibility to better valorise the composition of duodenal AA flow to predict the different fraction of AA supply in the duodenum, which may avoid the use of microbial markers. Four dietary treatments of increasing level of **Metabolisable Protein** (MP) were applied in a Latin square design on four rumen and duodenal fistulated lactating dairy cows (Exp 3a) to assess the estimation of protein feed value when MP supply increase. The two control treatments (**Low Control** (LC) and **High Control** (HC)) were composed exclusively of energetic concentrate and soya bean meal, respectively, with known protein contents. The two medium treatments, used to validate the method for estimating protein value, contained a mix of these two feeds (**Medium Low**: ML and **Medium High**: MH). The material

and methods applied in this experiment is described in Chapter 5 and the principles of the two methods used to achieve the two objectives are presented below.

6.2. Principle of the estimation methods

The MP contents obtained with the first method (estimation of feed protein value from total AA duodenal flow) were compared to the MP contents predicted with the INRA feeding system version 2007 as diet formulation was performed with this version. Only the endogenous flow was estimated using the update equation from INRA (2018).

The estimation of the different fractions of AA supply in the duodenum from AA composition of duodenal flow (second method) was compared to flows predicted with version 2018 of the INRA feeding system.

6.2.1. Estimation of feed protein value from total AA duodenal flow

6.2.1.1. Calculation of duodenal flows of amino acids of microbial, endogenous and alimentary origin using digestive markers

Duodenal flows were calculated by dividing the average daily quantities of Yb and PEG recovered in faeces divided by their concentration in duodenal digesta. The fraction of microbial **Nitrogen** (N) in duodenal digesta was calculated by dividing the DAPA:N value in duodenal digesta by the DAPA:N value in the isolated microbial fraction. This fraction was multiplied by 0.8 to take into account the proportion of AA in microbial proteins (Vérité et al., 1987). The fraction of endogenous N were estimated using the following equation assuming a duodenal flow of endogenous protein of 2.3 g N/ kg of DMI and a proportion of 50% of AA in endogenous CP (INRA 2018):

$$\text{Endogenous AA duodenal flow} = 2.3 \times \text{DMI} \times 0.5$$

where DMI is the daily DM intake.

The fraction of dietary AA duodenal flow were obtained by subtracting microbial AA fraction and endogenous AA fraction from total AA duodenal fraction.

6.2.1.2. Estimating MP content from total AA duodenal flow

Estimated MP content of each dietary treatment (**Low Control**: LC; **Medium Low**: ML; **Medium High**: MH; **High Control**: HC) were calculated as the sum of microbial and dietary MP. Microbial MP values were calculated from microbial N duodenal flow considering an intestinal digestibility of 80% (Vérité et al., 1987). Intestinal digestibilities for dietary MP were

obtained from the weighted sum of the digestibility of each feed (70, 70, 90 and 85% respectively for maize silage, dehydrated lucerne, soya bean meal and energetic concentrate). The estimated MP content obtained at this stage corresponded to the protein value of the mixed diet (basal ration + dietary treatments). As the MP content of the basal ration could be calculated using its INRA (2007) feed values, it was subtracted from the estimate MP content of the mixed diet to estimate the MP contents (in g PDIE/kg DM) of each dietary treatments.

6.2.2. Estimation of the different fractions of AA supply in the duodenum from AA composition of duodenal flow

The AA composition of microbes and endogenous duodenal fractions were obtained from INRA (2018) and the composition of each feeds were measured as described in the materials and methods (Chapter 5). The profile of AA is given in Table 6.1. We assumed that the AA profile of undegraded dietary fraction of each feed was the same as in the original protein (Rulquin and Vérité, 1993) and the average composition of microbial AA flowing into the duodenum was the same as the composition of microbes in the rumen fluid. The AA flow of each fraction (endogenous, microbial and each distributed feed) was calculated by optimization from the AA composition of these fractions and the measured total AA flow at the duodenum (Flow). As the intakes of maize silage, alfalfa, degradable nitrogen and energy intake do not significantly differ among treatments, we considered the AA duodenal flow of microbial protein, endogenous protein, maize silage and lucerne undegradable proteins were constant for the 4 treatments.

The actual duodenal flow of each i of the 18 AA, AA_{ik} for each treatment (k) was calculated using the product of the duodenal flow and its AA concentration with the simple equation:

$$FlowAA_{ik_{obs}} = Flow_k \times [AA_{ik_{obs}}] \quad (6.1)$$

The optimisation has consisted to find the best proportion α_{ik} of each of the 6 fractions of AA_i (endogenous, microbes, maize silage, dehydrated lucerne, soybean meal and energy concentrate) minimizing the function of optimisation (FnOpt) simultaneously for the 4 treatments (k).

$$FlowAA_{ik_{pred}} = \sum_{j=1}^6 \alpha_{jk} \times [AA_{ij}] \quad (6.2)$$

The α_{ik} for endogenous, microbes, maize silage and lucerne proteins are supposed to be common for the 4 treatments, but change with treatments for soybean meal and energy concentrate. The FnOpt function was built as the sum of square of the difference between

observed and predicted flow of each AA for the 4 treatments, divided by the observed AA flow of each AA to give to them a comparable weight in the optimisation.

$$FnOpt = \sum_{k=1}^4 \sum_{i=1}^{16} \frac{(FlowAA_{ik_{obs}} - FlowAA_{ik_{pred}})^2}{FlowAA_{ik_{obs}}} \quad (6.3)$$

We added 4 constraints to ensure that for each treatment the predicted total flow of AA was equal to the actual total flow of AA.

$$\sum_{i=1}^{16} FlowAA_{ik_{obs}} = \sum_{i=1}^{16} FlowAA_{ik_{pred}} \quad (6.4)$$

Table 6.1. Amino acids (AA) profiles of microbial, endogenous and each distributed feeds.

AA composition (%)			Maize		Soya	
	Microbial ¹	Endogenous ¹	silage	Concentrate ²	bean meal	Dehydrated lucerne
Essential	48.1	46.2	43.1	41.6	45.5	46.5
Arg	4.90	5.16	2.58	5.68	7.54	5.26
His	1.80	3.77	2.15	2.75	2.68	2.28
Ile	5.90	4.88	5.36	4.31	5.03	5.47
Leu	7.70	5.02	11.80	7.97	7.97	8.72
Lys	8.00	7.67	3.43	4.49	6.31	5.61
Met	2.50	1.53	1.93	1.56	1.38	1.52
Phe	5.30	4.88	4.29	4.31	5.28	5.54
Thr	5.80	6.83	4.72	4.77	4.11	5.12
Val	6.20	6.42	6.87	5.77	5.16	6.57
Nonessential	51.9	53.8	56.9	58.4	54.5	53.48
Ala	7.80	5.86	10.73	5.13	4.47	6.23
Asp	12.10	9.62	9.01	7.88	11.93	14.46
Gly	5.70	6.69	5.58	4.95	4.37	5.67
Glu	13.30	13.11	15.67	22.64	19.43	11.35
Pro	3.70	6.56	8.37	8.43	5.45	7.13
Ser	4.60	6.83	4.72	5.22	5.35	5.40
Tyr	4.70	5.16	2.79	4.12	3.54	3.67

¹ INRA (2018)

² Contained (in %) 20 wheat, 20 maize, 20 barley, 20 beet pulp, 15 wheat feed flour, 3 sugar cane molasses, 1 rapeseed oil, 1 salt

The optimisation was performed using the nonlinear GRG algorithm of the Excel solver.

The results obtained with this method were compared to a simulation performed with INRA (2018) system from ingested quantities of each feed including the effects of digestive interactions.

6.3. Results

6.3.1. Biological responses to dietary treatments

6.3.1.1. Intake, milk yield and composition and blood composition

MP intake increased linearly between the LC and HC treatments as expected (194 ± 51 g PDIE/d between two consecutive treatments; Table 6.2).

Table 6.2. Adjusted means of diet composition, milk production and composition by treatment¹ of 4 dairy cows (DMI: dry matter intake; MP: metabolisable protein; RSD: residual standard deviation).

Variable	Treatments ¹				RSD	P-value	Contrasts (P-value)	
	LC	ML	MH	HC			Linear	Quadratic
Diet / ration								
DMI, kg DM/d	20.5	20.8	21.6	21.3	0.66	0.64	0.29	0.70
Refusals, kg DM/d	3.5	2.8	1.6	1.4	0.65	0.18	0.04	0.76
Net energy, UFL/d ²	18.6	19.0	19.8	19.7	0.63	0.50	0.18	0.69
MP, g PDIE/d ³	1723	1917	2163	2307	62.5	0.002	0.0004	0.70
Milk								
Milk yield, kg/d	32.4	33.5	34.7	34.7	1.00	0.39	0.12	0.59
Protein content,								
g/kg	28.9	29.8	30.0	29.3	0.22	0.04	0.14	0.01
Fat content, g/kg	36.2	35.6	36.3	35.7	0.42	0.60	0.64	0.93
Protein yield, g/d	893	956	1023	994	33.2	0.13	0.05	0.22
Fat yield, g/d	1109	1150	1229	1193	40.0	0.27	0.11	0.37

¹ Dietary treatments are distinguished by increasing protein content: low control (LC), medium low (ML), medium high (MH) and high control (HC)

² UFL: amount of net energy for milk production contained in 1 kg of a reference barley (87% dry matter, 2,700 kcal of metabolisable energy), based on the INRA feeding system (INRA, 2007)

³ PDIE: truly digestible (dietary + microbial) protein when available energy decreases microbial growth, based on the INRA feeding system (INRA, 2007)

For the protein-rich treatments (MH and HC), refusals were lower than for the low-protein treatments (LC and ML). Consequently, although they were expected to remain constant, dry matter intake and energy supplies increased between LC and HC (+1.1 UFL/d) although the differences failed to be significant.

Milk protein yield increased linearly with MP intake ($P < 0.05$) although MH value was numerically slightly greater than HC value. Milk protein content showed a quadratic response to MP intake. Between treatments, milk yield and fat yield showed the same trends as DM intake and milk fat content was not affected.

6.3.1.2. Organic matter, NDF, ADF and ADL flows and digestibility

With increasing MP intake, **Organic Matter** (OM) intake and apparent and true ruminal digestibility of OM were not affected but OM apparent total digestibility increased linearly (table 6.3). **Neutral Detergent Fiber** (NDF) and **Acid Detergent Fiber** (ADF) digestibility in the digestive tract and the proportion digested in the rumen were not affected. The duodenal flow of ADL was not affected by the treatment and was 11% higher than the faecal flow.

6.3.1.3. Nitrogen and AA flow and digestibility

With increasing MP intake, N intake and total AA flow into the duodenum increased linearly (Table 6.4). Total N duodenal flow followed the same trend but the effect was not significant ($P = 0.11$) probably because the variability was high (RSD = 31.6). Microbial AA flow do not follow the same trend. It was the lowest for the ML treatment (236 g/d) and averaged 347 g/d for the three others treatments. Because endogenous flow is low and varied as a proportion of DMI, AA dietary duodenal flows varied in an opposed pattern of AA of microbial origin and was maximal for ML treatment. Total N digestibility increased linearly across treatments although the response was not significant.

With increasing MP intake, total urinary N linearly increased and this effect is mostly due to urea N increase. The flow of urinary non-urea N remained almost unchanged and averaged 25.7 g/d.

Table 6.3. Influence of increase amount of MP intake on organic matter, NDF, ADF and ADL digestion of 4 fistulated cows (ADF: acid detergent fibre; ADFDI: ADF digestible intake; ADL: acid detergent lignin; DOMI: digestible organic matter intake; NDF: neutral detergent fibre; NDFDI: NDF digestible intake; OM: organic matter; OMI: organic matter intake; RSD: residual standard deviation).

Variable	Treatments ¹				RSD	P-value	Contrasts (P-value)	
	LC	ML	MH	HC			Linear	Quadratic
OM								
Intake (kg/d)	19.2	19.5	20.3	20.1	0.64	0.59	0.24	0.70
Digestibility (%)								
apparent total	0.72	0.73	0.74	0.74	0.006	0.12	0.03	0.36
apparent ruminal (% OMI)	59	65	67	63	4.7	0.69	0.52	0.34
true ruminal (% OMI) ²	69	64	71	74	4.3	0.43	0.30	0.44
NDF								
Intake (kg/d)	7.8	7.8	8.4	7.8	0.20	0.19	0.63	0.19
Digestibility (%)								
total	55	57	60	58	1.6	0.21	0.13	0.21
ruminal (%NDFDI)	77	91	87	76	9.8	0.66	0.90	0.25
ADF								
Intake (kg/d)	4.3	4.3	4.6	4.4	0.11	0.22	0.34	0.19
Digestibility (%)								
total	55	57	60	57	1.8	0.36	0.23	0.24
ruminal (% ADFDI)	80	92	95	82	9.4	0.64	0.82	0.24
ADL (kg/d)								
Intake	0.50	0.50	0.52	0.49	0.014	0.55	0.68	0.36
Duodenum	0.41	0.37	0.40	0.42	0.038	0.82	0.73	0.44
Faeces	0.36	0.35	0.36	0.35	0.008	0.66	0.79	0.77

¹ Dietary treatments are distinguished by increasing protein content: low control (LC), medium low (ML), medium high (MH) and high control (HC)

² Calculated from (OMI – OM flowing into the duodenum + microbial OM flowing into the duodenum)

Table 6.4. Influence of increase amount of MP intake on nitrogen digestion of 4 fistulated cows (AA: amino acid; DMI: Dry Matter Intake; N: nitrogen; NDOM: non-digestible organic matter; RSD: residual standard deviation).

Variable	Treatments ¹				RSD	P-value	Contrasts (P-value)	
	LC	ML	MH	HC			Linear	Quadratic
N intake (g/d)	525	560	602	628	14.0	0.008	0.001	0.77
Duodenum (g/d)								
total N	550	561	612	622	31.6	0.35	0.11	0.98
total AA	2634	2844	3001	3333	161.8	0.11	0.02	0.76
Microbial N AA ^{2,3}	337	236	332	372	78.0	0.05	0.15	0.04
dietary N AA ^{2,4}	0	70	44	14	46.4	0.06	0.66	0.02
Faecal N (g/d)	141	145	153	149	9.2	0.83	0.49	0.68
Urinary N								
total (g/d)	149	161	187	190	11.8	0.13	0.03	0.75
as urea-N (g/d)	125	134	159	165	0.11	0.09	0.02	0.88
as non-urea N (g/d)	23.6	26.4	27.6	25.3	13.60	0.23	0.32	0.74
Total N digestibility	0.73	0.74	0.75	0.76	0.014	0.47	0.15	0.86

¹ Dietary treatments are distinguished by increasing protein content: low control (LC), medium low (ML), medium high (MH) and high control (HC)

² Two missing data among the data set (14 data)

³ calculated with DAPA as microbial marker

⁴ dietary N flow: AA N flow – microbial AA flow – endogenous AA flow; Endogenous AA flow = $2.3 \times \text{DMI} \times 0.5$ (INRA, 2018)

Essential and nonessential AA flow increased linearly with MP supply. All individual AA flow increased with treatments excepted Met and Gly flow, which only tended to increase (P=0.06; Table 6.5). Arg and Phe flow had the strongest responses to MP supply and none of the individual AA had a quadratic response. The AA composition for each dietary treatment are given in Annexe 6.1.

Table 6.5. Influence of the increase of MP intake on amino acid duodenal flow of 4 fistulated cows (AA: amino acid; RSD: residual standard deviation).

AA flow (g/d)	Treatments ¹				RSD	P-value	Contrasts (P-value)	
	LC	ML	MH	HC			Linear	Quadratic
Essential	1247	1344	1435	1571	75.2	0.10	0.02	0.81
Arg	132	145	155	174	7.7	0.04	0.007	0.75
His	57	62	66	74	3.5	0.07	0.01	0.72
Ile	141	152	164	178	8.4	0.08	0.02	0.85
Leu	221	238	252	278	13.1	0.09	0.02	0.74
Lys	195	209	224	237	12.7	0.20	0.05	0.95
Met	38	40	43	45	2.4	0.24	0.06	0.94
Phe	123	135	145	161	7.2	0.05	0.009	0.80
Thr	135	145	153	168	8.3	0.14	0.03	0.76
Val	164	175	186	203	9.8	0.12	0.03	0.77
Nonessential	1385	1490	1572	1743	86.6	0.11	0.02	0.72
Ala	169	179	188	206	11.1	0.21	0.05	0.71
Asp	289	315	337	372	18.0	0.08	0.02	0.80
Gly	158	167	169	192	10.3	0.21	0.06	0.50
Glu	371	399	424	469	22.7	0.10	0.02	0.74
Pro	118	127	133	149	7.5	0.11	0.03	0.65
Ser	128	138	147	163	7.9	0.09	0.02	0.70
Tyr	109	119	126	138	6.5	0.09	0.02	0.89

¹ Dietary treatments are distinguished by increasing protein content: low control (LC), medium low (ML), medium high (MH) and high control (HC)

6.1.1.1. Ruminal characteristics

Ruminal pH, total VFA concentration and molar proportion of acetic, propionic and butyric acids were not affected by the treatment. **Ammoniac** (NH₃) concentration linearly decreased when the MP supply increased (Table 6.6; Annexe 6.2) which is accompanied by a decrease in urea content in the diet. Isoacids showed a linear increase between LC and HC treatment and minor acids had a quadratic response with the lowest value for MH (2.7%)

Table 6.6. Influence of increase amount of MP intake on pH and ruminal fermentations of 4 fistulated cows. Values are the means of the kinetics performed just before and 1, 2, 3, 4, 6 and 8 hours after the morning meal (VFA: volatile fatty acid; NH₃: ammoniac; RSD: residual standard deviation).

Variable	Treatments ¹				RSD	P-value	Contrasts (P-value)	
	LC	ML	MH	HC			Linear	Quadratic
pH	6.2	6.2	6.2	6.1	0.06	0.73	0.40	0.76
NH ₃ (mg/L)	172	140	147	115	8.9	0.02	0.007	0.99
VFA (mmol/L)	110	113	115	115	4.5	0.84	0.42	0.79
VFA (molar %)								
acetic	59	59	60	59	0.5	0.48	0.62	0.44
propionic	20	21	19	21	0.8	0.25	0.93	0.54
butyric	15	14	16	14	0.6	0.29	0.46	0.43
isoacids ²	2.3	2.4	2.6	2.8	0.09	0.03	0.006	0.39
minor acids ³	3.2	2.9	2.7	3.1	0.15	0.19	0.70	0.05
acetic/propionic	3.7	3.5	4.1	3.5	0.24	0.28	0.89	0.43

¹ Dietary treatments are distinguished by increasing protein content: low control (LC), medium low (ML), medium high (MH) and high control (HC)

² isobutyric acid + isovaleric acid

³ valeric acid + caproic acid

6.1.2. Methods of estimation

6.1.2.1. Estimation of MP content from total AA duodenal flow

MP contents of the experimental diets estimated from AA duodenal flow were correlated with their MP content predicted according to the PDI systems (INRA, 2007) and the slope was close to 1 ($y = 0.97x + 88.94$; $R^2 = 0.97$). However, estimated MP contents were 35% higher than those predicted with INRA (2007; Table 6.7). Relative to LC, dietary treatments ML, MH and HC were estimated at 69, 99 and 159 g PDIE/kg DM (Figure 6.1) and differs on average from 9 ± 12 g PDIE/kg DM compared to the values estimated with INRA (2007).

Table 6.7. Metabolisable protein (MP) content of dietary treatments (g PDIE/kg DM) estimated from amino acid (AA) duodenal flow and predicted with INRA (2007) feed unit system.

	Treatments ¹ , g PDIE/kg DM			
	LC	ML	MH	HC
Predicted MP content ²	97	143	195	252
Estimated MP content	174	243	273	333

¹ Dietary treatments are distinguished by increasing protein content: low control (LC), medium low (ML), medium high (MH) and high control (HC); PDIE: truly digestible (dietary + microbial) protein when available energy decreases microbial growth; DM: dry matter

² MP content calculated using the feed unit system of INRA (2007)

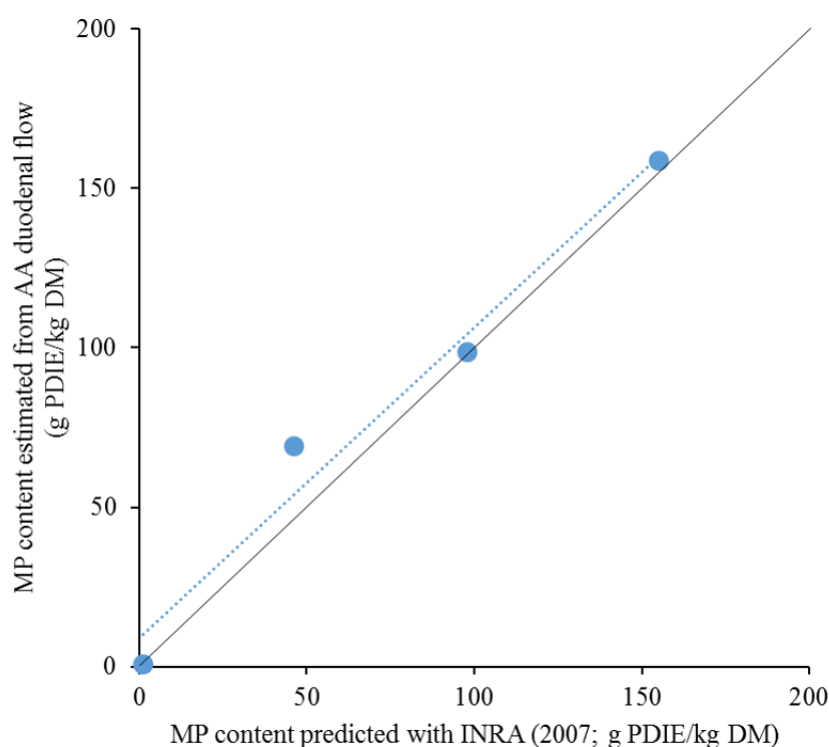


Figure 6.1. Comparison of metabolisable protein (MP) content measured from amino acids (AA) duodenal flow with MP content predicted with INRA (2007) feed unit system with their respective trend line. MP content of dietary treatments are expressed in relative to the lowest treatment (Low Control). The black line is the $y = x$ equation (PDIE: truly digestible (dietary + microbial) protein when available energy decreases microbial growth; DM: dry matter).

6.1.2.2. Estimation of the different fractions of AA supply in the duodenum from AA duodenal composition of duodenal flow

Estimated duodenal AA flows of the different fractions calculated by optimization or with the feeding system INRA (2018) are presented in Figure 6.2 (Annexe 6.3 and 6.4). Total AA duodenal flow increased with both method from LC to HC treatment, but value obtained with INRA (2018) were on average 10% lower than those obtained with optimization. AA flow from microbial, silage maize and dehydrated lucerne origin were constant across dietary treatments when estimated by optimization as imposed but endogenous AA duodenal flow was optimized as zero in the method. Endogenous and microbial AA duodenal flows according to INRA (2018) were similar for the four treatments (on average 284 ± 8.5 and 1270 ± 3.3 g/d respectively). Duodenal flows of AA of maize silage obtained by optimization were higher than those of INRA (2018) but the reverse was observed for dehydrated lucerne.

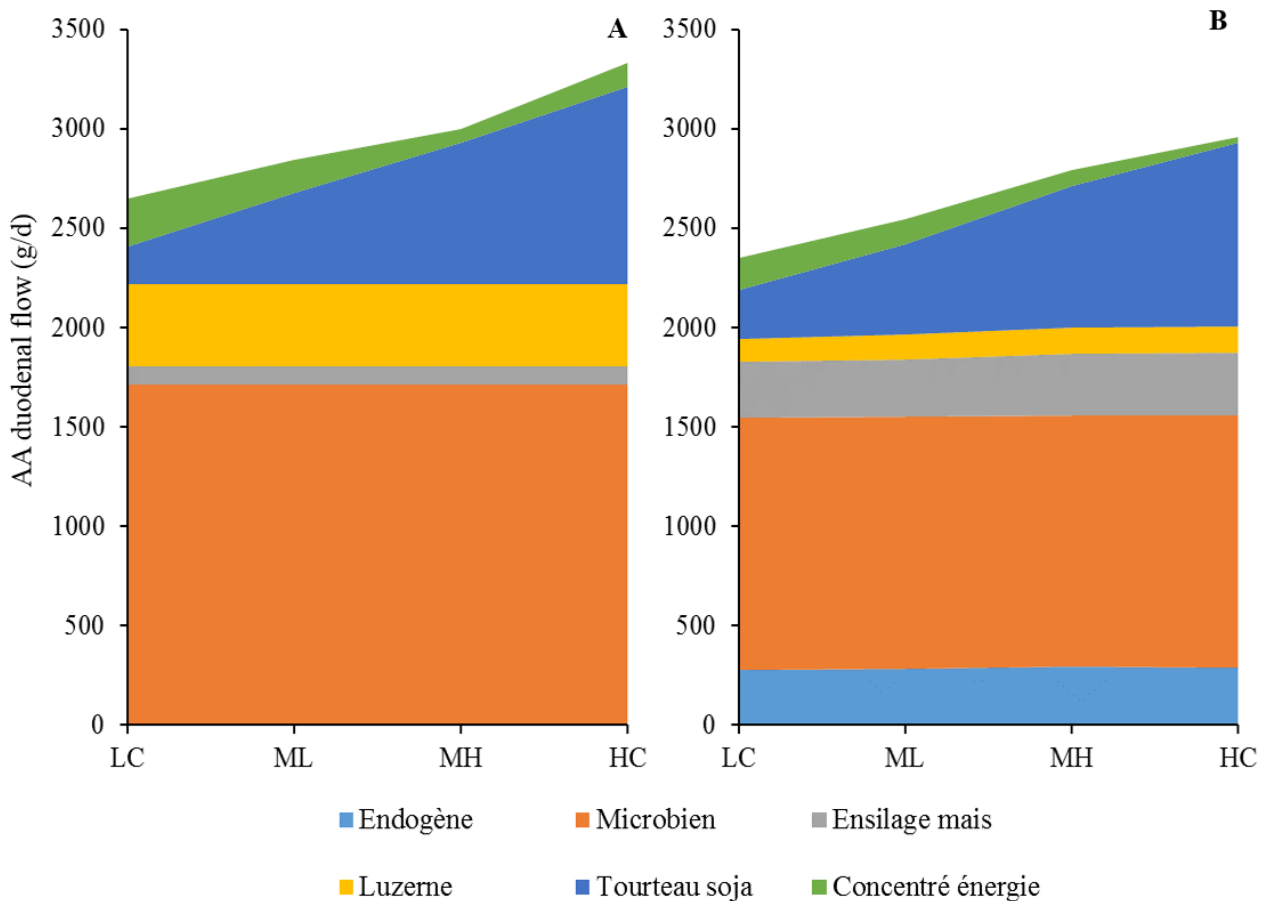


Figure 6.2. AA duodenal flow of endogenous (light blue), microbial (orange), maize silage (grey), dehydrated Lucerne (yellow), soya bean meal (dark blue) and energetic concentrate (dark green) fraction obtained from AA duodenal composition by optimization (A) or with INRA (2018) feeding system (B).

For both methods, the evolution of AA flow from soya bean meal and from energetic concentrate was consistent with the substitution of energetic concentrate by soya bean meal between treatments with decrease of energetic concentrate AA flow of 119 and 131 and increase of soya bean meal AA flow of 804 and 678 g/d respectively by optimization and INRA (2018).

6.2. Discussion

6.2.1. Biological responses to dietary treatments

6.2.1.1. Intake, milk yield and milk composition and digestion of OM

Cows consumed less than expected in the low-protein treatments (LC and ML) than in the protein-rich treatments (MH and HC), which explains the slight increase in net energy supplies of the protein-rich treatments. The increase in ingestion and energy supply with an increase in protein supply has been described in the literature (Cowan et al., 1981; Rico-Gomez and Faverdin, 2001; Broderick, 2003; Faverdin et al., 2003; Weiss and Wyatt, 2006): higher protein supply causes DM intake to increase. As animals eat more, the net energy supply also increases. Despite the slight restriction in the DM offered to the cows, the experiment did not completely eliminate the effect of MP supply on net energy intake. Nevertheless, this phenomenon remained very moderate and did not significantly affect the gaps that we wanted to create in terms of the approach of MP between treatments. This explains the slight linear increase observed in milk yield (Broderick, 2003; Raggio et al., 2004) Macleod et al., 1984; Brun-Lafleur et al., 2010) and milk protein yield (Krohn and Andersen, 1980; Macleod et al., 1984; Broderick, 2003; Brun-Lafleur et al., 2010; Daniel et al., 2016).

The increased in OM digestibility with increasing supply of MP thanks to soybean meal can be explained by the higher digestibility of soybean meal compared to energy concentrate (dr = 80, 82, 84 and 85 respectively from LC to HC treatments).

The increased supply of MP did not affect fibre digestion. This is in agreement with several studies where the supply of degradable N was maintained at a high level (Christensen et al., 1993; Cunningham et al., 1996). On the other hand, it is well established that the digestibility of N and fibers decrease when the supply of degradable N is not sufficient, which was not the case in our study. The ruminal NH₃ concentrations were high and far above the critical value 50 mg / L that is often cited to reduce fiber digestion (Peyraud et al., 1997).

6.2.1.2. Nitrogen and AA flow and digestibility

Total N duodenal flow tended to increase with the amount of N intake, which is consistent with literature although most authors reported a significant response (Klusmeyer et al., 1990; Christensen et al., 1993; Fanchone et al., 2013; Ipharraguerre and Clark, 2014). Our trend could mainly be explained by the high individual variability of animals (RSD = 31.6). The lower value of AA microbial flow for ML treatment is surprising and we could not find an explanation. It may be linked to the measurement of N microbial flow, which is one of the weak points of this type of trial leading to high variabilities in the measurements (Broderick and Merchen, 1992; Dewhurst et al., 2000; Firkins et al., 2006).

The increase of total, essential, non-essential and each AA flows with dietary treatments have been reported in literature (Klusmeyer et al., 1990; Christensen et al., 1993; Cunningham et al., 1996; Ipharraguerre et al., 2005; Fanchone et al., 2013; Ipharraguerre and Clark, 2014) and so have been the absence of effect of increasing amount of CP or N levels on Met duodenal flow. The substitution of the energetic concentrate by soya bean meal probably explained most of the absence of response for this AA. Rulquin et al. (1998) also reported in their prediction model of AA at the duodenum that Met and Gly had the highest biases between predicted and experimental concentration underlining high variations around these AA.

6.2.2. Estimation of MP content and each fraction of protein supply from AA duodenal flow

6.2.2.1. Estimating MP content from total AA duodenal flow

In absolute value, the estimated MP contents from total AA duodenal flows of the four dietary treatments were consistent with the increase of MP intake but 35% higher than MP contents predicted with INRA (2007). This over-estimation of MP contents may be linked to an over-estimation by at least 10% of duodenal flow linked to the use of PEG and Yb markers. Indeed, ADF and ADL flow at the duodenum were higher than their quantities excreted in feces (16 and 11% respectively) whereas they were supposed to remain constant especially ADL, which is not digestible in the digestive tract of the animals. In addition, different hypotheses were applied to estimated MP content from AA duodenal flow such as the estimation of endogenous AA duodenal flow, feed digestibility in the intestines and the variability of microbial N measurement, which may have contributed to the over-estimation obtained.

However, in relative to the LC, the MP contents of the three other dietary treatments were well estimated compared to those predicted with INRA (2007), which validate the method of estimating MP content from total AA duodenal flow in this case.

6.2.2.2. Estimation of the different fractions of AA supply in the duodenum from AA duodenal composition of duodenal flow

Both methods (by optimization and with INRA 2018) to estimate the different flows of AA supply in the duodenum from AA composition present the increase of MP content by the substitution of energetic concentrate by soya bean meal with on average the same variation of flow for these two feeds. Difference in total AA duodenal flow between the two methods may be explained by an over-estimation of duodenal flow already explained above. The influence of protein sources and microbial fraction on duodenal profile have already been reported in literature (Rulquin et al., 1998). We tested two other microbial AA profiles (Clark et al., 1992; Sok et al., 2017) to study their influence on the estimation of the different fractions (results not shown) with the same conclusions: the substitution of energetic concentrate by soya bean meal AA flow across the dietary treatments is well estimated and the repartition of the three remaining fractions differs with microbial AA composition used (endogenous AA flow not estimated in any case). Consequently, it appeared that the estimation of the different fractions of AA supply in the duodenum from AA duodenal composition of duodenal flow permitted a good quantification of MP content brought by the substitution of energetic concentrate by soya bean meal but this method also appeared dependant of the AA composition used for this estimation.

Conclusion

The first objective of this experiment was to estimate feed protein value from AA duodenal flow. Estimated MP contents were consistent with the increase of MP intake brought by the four dietary treatments. ML, MH and HC treatments differ from MP content estimated with INRA (2007) from 9 g PDIE/kg DM when expressed in relative to LC. However, the absolute value of MP content were over-estimated compared to the values predicted with the feeding system INRA (2007). This over-estimation may be linked to the over-estimation of measured duodenal flow with PEG and Yb marker and to the hypothesis applied to estimated feed protein value.

The second objective was to study the possibility to predict the different duodenal fraction of AA supply from the AA composition at the duodenum. Each flow was estimated either by an

optimization method or by INRA (2018). The two methods predicted well the substitution of energetic concentrate by soya bean meal AA duodenal flow consistent with the dietary treatments formulation. More generally, the optimization method was dependent of the microbial AA profile used and the method is probably dependent of feed AA profiles.

6.3. References

- Broderick GA 2003. Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 86, 1370–1381.
- Broderick GA and Merchen NR 1992. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. *Journal of Dairy Science* 75, 2618–2632.
- Brun-Lafleur L, Delaby L, Husson F and Faverdin P 2010. Predicting energy \times protein interaction on milk yield and milk composition in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93, 4128–4143.
- Christensen RA, Cameron MR, Klusmeyer TH, Elliott JP, Clark JH, Nelson DR and Yu Y 1993. Influence of amount and degradability of dietary protein on nitrogen utilization by dairy cows. *Journal of Dairy Science* 76, 3497–3513.
- Clark JH, Klusmeyer TH and Cameron MR 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 75, 2304–2323.
- Cowan RT, Reid GW, Greenhalgh JF and Tait CA 1981. Effects of feeding level in late pregnancy and dietary protein concentration during early lactation on food intake, milk yield, liveweight change and nitrogen balance of cows. *The Journal of Dairy Research* 48, 201–212.
- Cunningham KD, Cecava MJ, Johnson TR and Ludden PA 1996. Influence of source and amount of dietary protein on milk yield by cows in early lactation. *Journal of Dairy Science* 79, 620–630.
- Daniel JB, Friggens NC, Chapoutot P, Van Laar H and Sauvant D 2016. Milk yield and milk composition responses to change in predicted net energy and metabolizable protein: a meta-analysis. *Animal* 10, 1975–1985.
- Dewhurst RJ, Davies DR and Merry RJ 2000. Microbial protein supply from the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 85, 1–21.
- Fanchone A, Nozière P, Portelli J, Duriot B, Largeau V and Doreau M 2013. Effects of nitrogen underfeeding and energy source on nitrogen ruminal metabolism, digestion, and nitrogen partitioning in dairy cows. *Journal of Animal Science* 91, 895–906.
- Faverdin P, M'hamed D and Vérité R 2003. Effects of metabolizable protein on intake and milk production of dairy cows independent of effects on ruminal digestion. *Animal Science* 76, 137–146.
- Firkins JL, Hristov AN, Hall MB, Varga GA and St-Pierre NR 2006. Integration of ruminal metabolism in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 89, E31–E51.

- INRA 2007. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux - Valeurs des aliments. Editions Quae, Versailles (FRA).
- INRA 2018. INRA feeding system for ruminants. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.
- Ipharraguerre IR and Clark JH 2014. A meta-analysis of ruminal outflow of nitrogen fractions in dairy cows. *Journal of advances in dairy research* 2, 122.
- Ipharraguerre IR, Clark JH and Freeman DE 2005. Varying protein and starch in the diet of dairy cows. I. Effects on ruminal fermentation and intestinal supply of nutrients. *Journal of Dairy Science* 88, 2537–2555.
- Klusmeyer TH, McCarthy RD, Clark JH and Nelson DR 1990. Effects of source and amount of protein on ruminal fermentation and passage of nutrients to the small intestine of lactating cows. *Journal of Dairy Science* 73, 3526–3537.
- Krohn CC and Andersen PE 1980. Different energy and protein levels for dairy cows in the early weeks of lactation. *Livestock Production Science* 7, 555–568.
- Macleod GK, Grieve DG, McMillan I and Smith GC 1984. Effect of varying protein and energy densities in complete rations fed to cows in first lactation. *Journal of Dairy Science* 67, 1421–1429.
- Peyraud JL, Le Liboux S and Vérité R 1997. Effet du niveau et de la nature de l'azote dégradable sur la digestion ruminale d'un régime à base d'ensilage de maïs chez la vache laitière. *Reproduction Nutrition Development* 37, 313–328.
- Raggio G, Pacheco D, Berthiaume R, Lobley GE, Pellerin D, Allard G, Dubreuil P and Lapierre H 2004. Effect of level of metabolizable protein on splanchnic flux of amino acids in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 87, 3461–3472.
- Rico-Gomez M and Faverdin P 2001. La nutrition protéique modifie l'ingestion des vaches laitières : analyse bibliographique. pp. 285–288. Paris.
- Rulquin H, Guinard J and Vérité R 1998. Variation of amino acid content in the small intestine digesta of cattle: Development of a prediction model. *Livestock Production Science* 53, 1–13.
- Rulquin H and Vérité R 1993. Amino acid nutrition of dairy cows: productive effects and animal requirements. In *Recent advances in animal nutrition* (eds. P.C. Garnsworthy and D.J.A. Cole), pp. 55–77. Nottingham University Press, Nottingham, England.
- Sok M, Ouellet DR, Firkins JL, Pellerin D and Lapierre H 2017. Amino acid composition of rumen bacteria and protozoa in cattle. *Journal of Dairy Science* 100, 5241–5249.
- Vérité R, Michalet-Doreau B, Chapoutot P, Peyraud JL and Poncet C 1987. Révision du système des Protéines Digestibles dans l'Intestin (P.D.I.). *Bulletin techniques INRA* 70, 19–34.

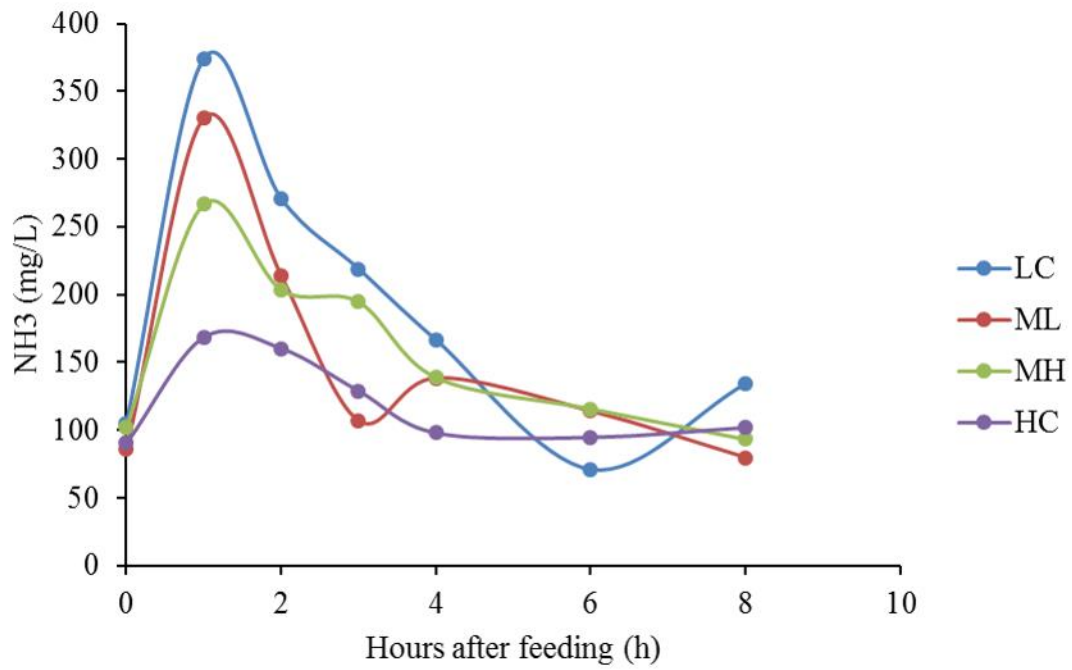
Weiss WP and Wyatt DJ 2006. Effect of Corn Silage Hybrid and Metabolizable Protein Supply on Nitrogen Metabolism of Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 89, 1644–1653.

6.4. Annexes

Annexe 6.1. Influence of increase amount of MP intake on amino acid duodenal flow of 4 fistulated cows (AA: amino acid; RSD: residual standard deviation).

AA composition (%)	Treatments ¹						Contrasts (P-value)	
	LC	ML	MH	HC	RSD	P-value	Linear	Quadratic
Essential								
Arg	5.17	5.29	5.32	5.43	0.036	0.01	0.003	0.88
His	2.26	2.26	2.28	2.30	0.016	0.31	0.09	0.63
Ile	5.53	5.52	5.65	5.56	0.021	0.02	0.07	0.10
Leu	8.68	8.65	8.65	8.66	0.043	0.96	0.73	0.71
Lys	7.64	7.62	7.73	7.40	0.061	0.04	0.06	0.04
Met	1.48	1.44	1.47	1.40	0.013	0.03	0.02	0.32
Phe	4.83	4.91	4.98	5.01	0.024	0.007	0.001	0.34
Thr	5.31	5.27	5.26	5.23	0.013	0.03	0.005	0.77
Val	6.43	6.39	6.39	6.34	0.013	0.02	0.005	0.89
Nonessential								
Ala	6.63	6.51	6.44	6.43	0.043	0.05	0.01	0.24
Asp	11.36	11.49	11.57	11.60	0.022	0.0008	0.0002	0.06
Gly	6.22	6.08	5.80	5.99	0.075	0.04	0.03	0.08
Glu	14.53	14.54	14.53	14.61	0.050	0.59	0.29	0.52
Pro	4.63	4.62	4.58	4.64	0.046	0.73	0.95	0.39
Ser	5.03	5.04	5.03	5.09	0.014	0.08	0.06	0.13
Tyr	4.28	4.35	4.33	4.31	0.028	0.41	0.72	0.15

¹ Dietary treatments are distinguished by increasing protein content: low control (LC), medium low (ML), medium high (MH) and high control (HC)



Annexe 6.2. Kinetic of ammoniac (NH_3) over time for the 4 dietary treatments distinguished by increasing protein content (low control (LC), medium low (ML), medium high (MH) and high control (HC))

Annexe 6.3. Endogenous, microbial and each feed AA flows estimated by optimization from AA composition of duodenal flow (AA: amino acid).

AA flow (g/d)	Treatments ¹			
	LC	ML	MH	HC
Total	2649	2844	3001	3333
Endogenous	0	0	0	0
Microbial	1711	1711	1711	1711
Maize silage	95	95	95	95
Dehydrated lucerne	414	414	414	414
Concentrate ²	240	167	71	121
Soya bean meal	188	457	711	992

¹ Dietary treatments are distinguished by increasing protein content: low control (LC), medium low (ML), medium high (MH) and high control (HC)

² Contained (in %) 20 wheat, 20 maize, 20 barley, 20 beet pulp, 15 wheat feed flour, 3 sugar cane molasses, 1 rapeseed oil, 1 salt

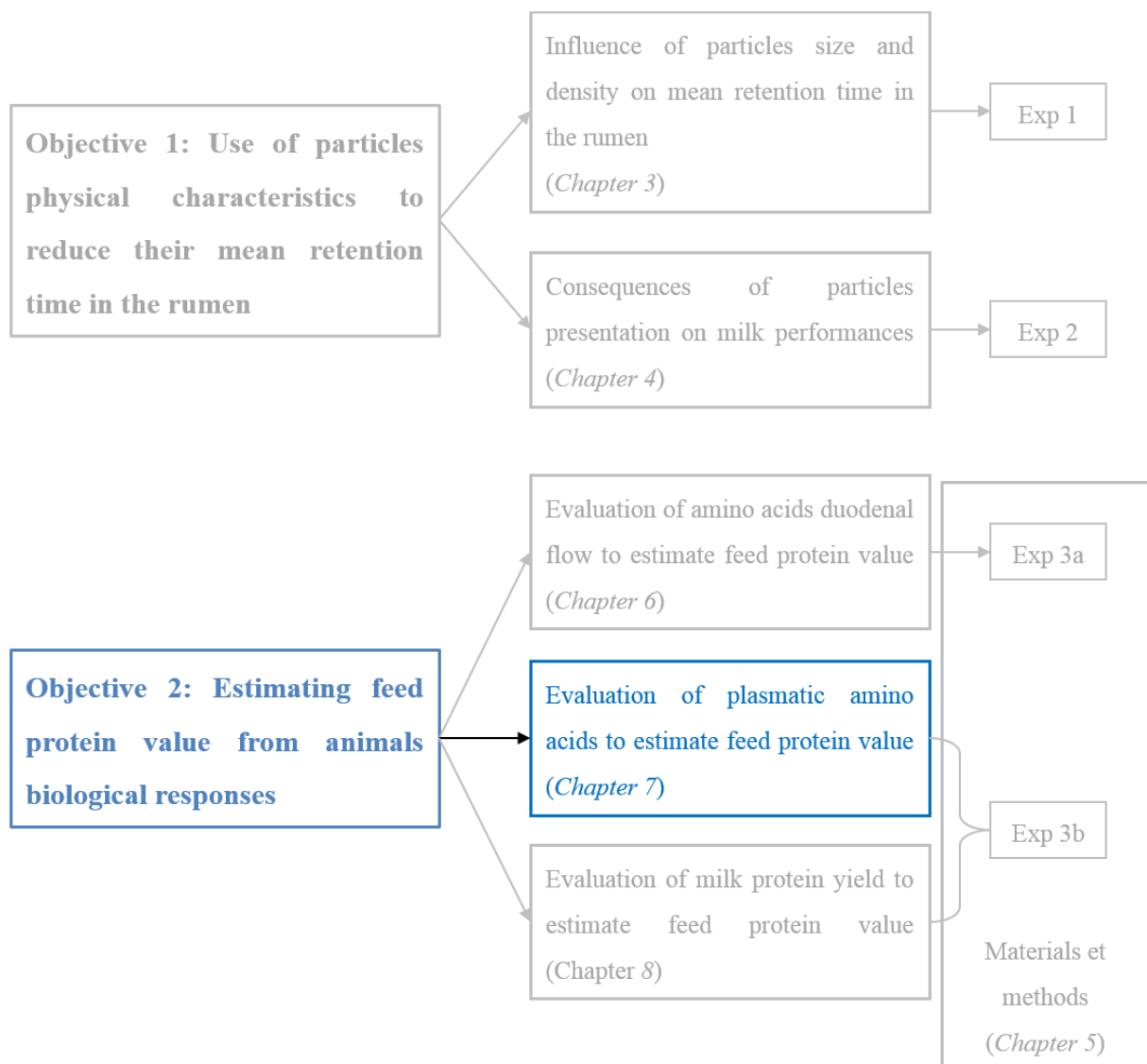
Annexe 6.4. Endogenous, microbial and each feed AA flows predicted by the feeding system INRA (2018; AA: amino acid).

AA flow (g/d)	Treatments ¹			
	LC	ML	MH	HC
Total	2350	2546	2793	2959
Endogenous	274	280	294	288
Microbial	1272	1270	1265	1272
Maize silage	280	290	312	315
Dehydrated lucerne	119	123	131	132
Concentrate ²	162	124	81	31
Soya bean meal	243	458	711	921

¹ Dietary treatments are distinguished by increasing protein content: low control (LC), medium low (ML), medium high (MH) and high control (HC)

² Contained (in %) 20 wheat, 20 maize, 20 barley, 20 beet pulp, 15 wheat feed flour, 3 sugar cane molasses, 1 rapeseed oil, 1 salt

Chapter 7 – Evaluation of plasmatic amino acids to estimate feed protein value



Résumé

L'estimation de la valeur protéique des aliments est réalisée actuellement par différentes méthodes (*in vivo*, *in vitro*, et *in sacco*) qui sont confrontées d'une part aux considérations en terme d'expérimentation et de bien-être animal et d'autre part à l'arrivée de nouveaux aliments ou additifs destinée à augmenter la fraction protéique alimentaire arrivant au duodénum pour lesquels ces méthodes ne sont pas utilisables. Nous avons testé les réponses des **Acides Aminés** (AA) plasmatiques aux apports en protéines métabolisables comme base pour une nouvelle méthode d'estimation de la valeur protéique des aliments. Le principe de la méthode repose sur l'utilisation de deux régimes contrôles de valeur protéique connue (CB : **Contrôle Bas** ; CH : **Contrôle Haut**) pour déterminer la réponse linéaire des AA plasmatiques à partir de laquelle la valeur protéique d'un aliment inconnu peut être déterminée. La méthode a été mise en place sur 24 vaches laitières en lactation réparties en 6 groupes de 4 vaches selon leur niveau de production et leur parité. Quatre régimes alimentaires d'apport croissant en protéines métabolisables, correspondant aux deux contrôles (CB et CH) ainsi que les deux régimes intermédiaires de valeur connue mais qui ont été considéré comme à déterminer (MB : **Médium Bas** ; MH : **Médium Haut**), ont été testés selon un schéma en carré Latin. La teneur en PDI de ces traitements alimentaires obtenue à partir de la réponse en AA plasmatique a été comparée à celle prédite par le système d'alimentation INRA (2007). Les teneurs sanguines en His et Val ont augmenté linéairement avec les apports en protéine alors que celle de Gly a diminué linéairement. Deux groupes d'AA ont également été testés (Groupe 1 : somme de His, Met, Phe et Tyr ; Groupe 2 : somme d'Ile, Leu, Lys et Val) qui ont tous les deux augmentés linéairement avec les régimes alimentaires. L'estimation de la valeur protéique a été la plus précise par rapport à celle prédite par le système INRA (2007) avec le Groupe 1 et la combinaison linéaire des trois AA (His, Val et Gly) pondérés de leur amplitude de réponse (nommé 3AA = $4 \cdot \text{His} + 2 \cdot \text{Val} - \text{Gly}$) : -2 et +4 g PDIE/kg MS pour ML et +6 et +8 g PDIE/kg MS pour ML et MH respectivement pour les deux réponses. Ainsi, l'estimation à partir de la réponse des AA plasmatiques pourrait servir de base à une nouvelle méthodologie pour estimer la valeur protéique des aliments ou des effets d'additifs alimentaires. Cependant, une généralisation à différentes sources protéiques apparaît difficilement applicable au vu de ce seul essai.

Abstract

The estimation of the feed protein value is currently performed by different methods (*in vivo*, *in vitro* and *in sacco*), which are confronted on the one hand to animal welfare considerations and on the other hand to new feed or additives aimed to increase the dietary protein fraction at the duodenum for which these methods can not be used. We tested plasmatic **Amino Acid** (AA) responses to metabolisable protein intakes as a basis for a new method for estimating the feed protein values. The principle of the method is based on the use of two known protein control treatments (LC: **Low Control**, HC: **High Control**) to determine the linear response of plasma AA from which the protein value of an unknown feed is determined. The method was implemented on 24 lactating dairy cows divided into 6 groups of 4 cows according to their production level and their parity. Four dietary treatments of increasing metabolisable protein intake, corresponding to the two controls (LC and HC) and two intermediate dietary treatments of known value but which were considered to be determined, (ML: **Medium Low**, MH: **Medium High**), were tested according to a Latin square design. The MP content of these dietary treatments obtained from the plasmatic AA response was compared to that predicted by the INRA feeding system (2007). Plasmatic His and Val concentrations increased linearly with metabolisable protein intake while Gly concentration decreased linearly. Two groups of plasmatic AA were also tested (Group 1: sum of His, Met, Phe and Tyr, Group 2: sum of Ile, Leu, Lys and Val) which both linearly increased with diets. The estimate of the feed proteins value was the most accurate compared to that predicted by the INRA feeding system (2007) with Group 1 and the linear combination of the three AA (His, Val and Gly) weighted by their amplitude response (named 3AA = $4 * \text{His} + 2 * \text{Val} - \text{Gly}$): -2 and +4 g PDIE / kg DM for ML and +6 and +8 g PDIE / kg DM for MH respectively for both responses. Thus, the estimate from the plasmatic AA response could be used as a basis for a new methodology to estimate feed protein value. However, a generalisation to different protein sources appears difficult to apply in view of this single trial.

7.1. Introduction

One way to spare vegetable proteins in dairy cows alimentation is to adjust diets formulation to the needs of the animals. It requires a precise knowledge of the protein value of feeds used by different feeding systems to determine the quantity of protein available for the animal at the duodenum also called metabolisable proteins. Some limits of the different protein value

estimation methods (*in vitro*, *in sacco* or *in vivo*) have already been reported (Broderick et al., 1991) and the increase concern of society for animal welfare threaten the use of fistulated animals needed to these methods. Besides, the development of new techniques to improve dietary protein fraction at the duodenum challenges these methods for a future inclusion in feeding system tables. In contrast, biological responses to changes in dietary protein intakes are better understood. An increase in dietary protein intake induces an increase in **plasmatic Amino Acids** (AA) responses, which is mainly reported as linear although some quadratic responses have been reported (Raggio et al., 2004; Gidlund et al., 2015; Martineau et al., 2017, 2019). Consequently, the latter represents the biological response to the MP actually ingested by the animal. The objective of this chapter is to evaluate the use of plasmatic AA responses to estimate feed protein value of unknown feeds. The principle rests on the use of two feeds of known protein value to determine the plasmatic AA responses of the animal from which the unknown protein value of another feed can be obtained. Four dietary treatments of increasing level of MP were applied in a Latin square design on 24 lactating dairy cows (Exp 3b) distributed according to their production level and parity. The two control treatments (**Low Control** (LC) and **High Control** (HC)) were composed exclusively of energetic concentrate and soya bean meal, respectively, with known protein contents. The two medium treatments, used to validate the method for estimating protein value, contained a mix of these two feeds (**Medium Low**: ML and **Medium High**: MH). The materials and methods applied in this experiment is described in Chapter 5 and the principle of the method used to estimate feed protein value from plasmatic AA responses is presented below.

7.2. Principle of the estimation of MP content using biological response of plasmatic AA

The following calculation method was used to estimate MP values of the ML and MH treatments, which were assumed to be unknown, using individual plasmatic AA responses of the two control treatments LC and HC of known MP content.

First, each plasmatic AA response was analysed to detect those that linearly increase with dietary treatments.

Then, each individual plasmatic AA, which responded linearly to MP intake (His, Val and Gly), was used to estimate MP values of the two medium treatment (ML and MH). Also, for these AA, we have tested a linear combination weighted from their amplitude of response to limit the individual variations and test the accuracy compared to individual responses (called the 3AA

response in the rest of the paper; $3AA = 4*His + 2*Val - Gly$). Also, the literature have defined two groups of AA according to their site of catabolism (Mephram, 1982; Lapierre et al., 2012): group 1 (sum of His, Met, Phe and Tyr) are more likely catabolised in the liver while group 2 (sum of Ile, Leu, Lys and Val) are more likely catabolised by the mammary gland. These two groups were tested like individual AA response when their linearity was validated.

The expression “variable” in each following equation is used as a generic term and must be replaced by either an individual plasmatic AA response, the weighted linear combination, group 1 or group 2. For each variable, the two control treatments (LC and HC) were used to determine the parameters (slope and intercept) of the following relation:

$$MP \text{ intake} = a * \text{variable} + b \quad (7.1)$$

where a and b are respectively the slope and intercept of the equation:

$$a = (MP \text{ intake}_{HC} - MP \text{ intake}_{LC}) / (\text{variable}_{HC} - \text{variable}_{LC}) \quad (7.2)$$

$$b = MP \text{ intake}_{HC \text{ or } LC} - a * \text{variable}_{HC \text{ or } LC} \quad (7.3)$$

Each variable of ML and MH treatments were used in equation (7.1) to obtain an estimate of the MP intake value for each of them.

The estimation of MP intake obtained at this stage corresponded to the protein value of the distributed ration (basal ration + ML or MH dietary treatment). As the composition of the basal ration was known and did not vary, its protein value was directly calculated with the feeds units system (INRA, 2007) then subtracted from the estimated MP intake estimated from the plasmatic AA response to finally obtained the protein value (in g PDIE/kg DM) of ML and MH treatments.

Finally, to assess the methodology, the composition of ML and MH treatments were known it was possible to calculate their protein value with (INRA, 2007). It allowed the comparison between the estimated values with the previous developed methodology and the predicted one with INRA (2007).

7.3. Results

A heatwave occurred during the last period of the experiment (four days over 20°C during the night and over 35°C during the day in the stable), causing large variations in DM intake and milk yield. Therefore, statistical analyses were performed only for the first three periods; including the fourth period increased the residual standard error of all variables due to differing sensitivity of cows to heat stress. One cow was excluded from the experiment due to

inflammation of the hock. The interaction between parity and dietary treatments was not significant consequently results are not presented.

7.3.1. Biological responses to dietary treatments

7.3.1.1. Dietary intake

MP intake increased linearly between the LC and HC treatments, as expected (175 ± 31 g PDIE/d between them; Table 7.1). Refusals decreased linearly between the LC and HC treatments. For the protein-rich treatments (MH and HC), refusals were low and intake almost reached expected levels, but for the low-protein treatments (LC and ML), refusals were significantly higher (0.7 and 0.4 kg DM/d higher than those of MH and HC, respectively) leading to the same level of DMI than protein-rich treatments although they were supposed to be slightly higher. Consequently, although it was expected to remain constant, energy supply increased slightly between LC and HC (+0.5 UFL/d).

Table 7.1. Adjusted means of diet composition, milk production and composition by treatment¹ (DMI: dry matter intake; MP: metabolisable protein; RSD: residual standard deviation).

Intake	Treatments ¹				RSD	P-value	Contrasts (P-value)	
	LC	ML	MH	HC			Linear	Quadratic
DMI, kg DM/d	21.2	21.3	21.3	21.2	0.17	0.87	0.83	0.54
Refusals, kg DM/d	1.2	0.9	0.5	0.5	0.11	<0.001	<0.001	0.19
Net energy, UFL/d ²	18.5	18.8	18.8	19.0	0.15	<0.001	<0.001	0.42
MP, g PDIE/d ³	1 796	2 002	2 146	2 320	16.9	<0.001	<0.001	0.14

¹Dietary treatments are distinguished by increasing protein content: low control (LC), medium low (ML), medium high (MH) and high control (HC)

² UFL: amount of net energy for milk production contained in 1 kg of a reference barley (87% dry matter, 2,700 kcal of metabolisable energy), based on the INRA feeding system (INRA, 2007)

³ PDIE: truly digestible (dietary + microbial) protein when available energy decreases microbial growth, based on the INRA feeding system (INRA, 2007)

7.3.1.2. Blood composition and amino acids concentrations

Blood urea increased both linearly and quadratically with MP intake but glucose concentrations did not differ significantly among the treatments (Table 7.2). Non-esterified fatty acid tended the response quadratically to MP levels. None of the AA had a quadratic response. Arg, Cys, Gly, His, Leu, Lys, Ser, Thr and Val had a linear response but Gly, His and Val had the strongest linear responses to protein supplies ($P < .0001$). However, Ala, Asp, Glu, Ile, Met, Phe, Pro, Trp and Tyr did not responded to dietary treatments. All the AA responding increased their plasmatic concentrations with MP supplies excepted Gly and Ser, which decreased. Gly decreased from 475 to 383 $\mu\text{mol/L}$ and both Val and His increased with increase of MP intake (49 and 23 $\mu\text{mol/L}$ between LC and HC respectively). Group 1 and group 2 both had a linear response to dietary treatments and group 2 had on average a response 2.3 higher than group 1 when responses were expressed in relative to LC.

7.3.2. Estimating MP values of feeds from plasmatic amino acids responses

The estimated value of ML and MH from plasma Gly, Val, His, 3AA, group 1 and group 2 responses is shown in Figure 7.1 (Annexe 7.1). The estimation with the 3AA relation is closer to the predicted value with INRA (2007) (+4 and +8 g PDIE/kg DM for ML and MH respectively) than individual AA responses. The response of each AA show over or under estimation of the protein value: -5, -13 and +30 g PDIE/kg DM for ML respectively for Gly, His and Val responses. Group 1 had the closest values to the predicted one with -2 and +6 g PDIE/kg DM respectively for ML and MH whereas group 2 was the more distant with a systematic underestimation estimated values of ML and MH compared to the predicted one (-20 and -38 g PDIE/kg DM respectively).

Table 7.2. Adjusted means of blood composition and plasmatic amino acids (AA) concentrations by treatments¹

Variables	Treatments ¹				RSD	P-value	Contrasts (P-value)	
	LC	ML	MH	HC			Linear	Quadratic
Blood composition								
Non-esterified fatty acids, $\mu\text{mol/L}$	110.4	122.4	147.9	126.4	11.26	0.04	0.06	0.08
Glucose, mg/dL	78.2	80.0	80.0	79.1	1.13	0.5	0.63	0.17
Urea, mg/dL	25.9	27.7	31.1	37.5	0.94	<.0001	<.0001	<.0001
Plasmatic AA concentrations, $\mu\text{mol/L}$								
Ala	248	250	253	259	11.55	0.88	0.41	0.83
Arg	71	74	78	89	4.28	0.01	0.004	0.24
Asp	3.8	3.9	4.1	4.3	0.22	0.25	0.06	0.62
Cys	10	11	12	12	0.69	0.12	0.03	0.45
Glu	38	41	39	39	2.06	0.59	0.61	0.36
Gly	475	442	406	383	15.49	<.0001	<.0001	0.67
His	43	57	63	66	3.25	<.0001	<.0001	0.06
Ile	87	91	90	97	4.71	0.47	0.14	0.69
Leu	87	91	95	104	4.65	0.09	0.01	0.52
Lys	67	67	67	81	4.51	0.07	0.03	0.11
Met	21	19	18	19	1.19	0.57	0.31	0.34
Phe	36	36	37	39	1.71	0.62	0.21	0.48
Pro	88	91	91	95	3.83	0.5	0.13	0.83
Ser	120	112	105	109	4.50	0.02	0.01	0.09
Thr	82	88	90	97	5.21	0.13	0.02	0.86
Trp	38	38	38	39	1.38	0.95	0.90	0.66
Tyr	39	39	41	44	2.67	0.53	0.15	0.36
Val	148	163	176	197	6.66	<.0001	<.0001	0.63
Group 1 ²	139	150	159	168	7.3	0.04	0.004	0.89
Group 2 ³	389	412	428	479	9.5	0.01	0.002	0.45

¹ Dietary treatments are defined by their protein level: LC, ML, MH and HC from the lowest to the highest (LC: low control; ML: medium low; MH: medium high; HC: high control)

² sum of His, Met, Phe and Tyr

³ sum of Ile, Leu, Lys and Val

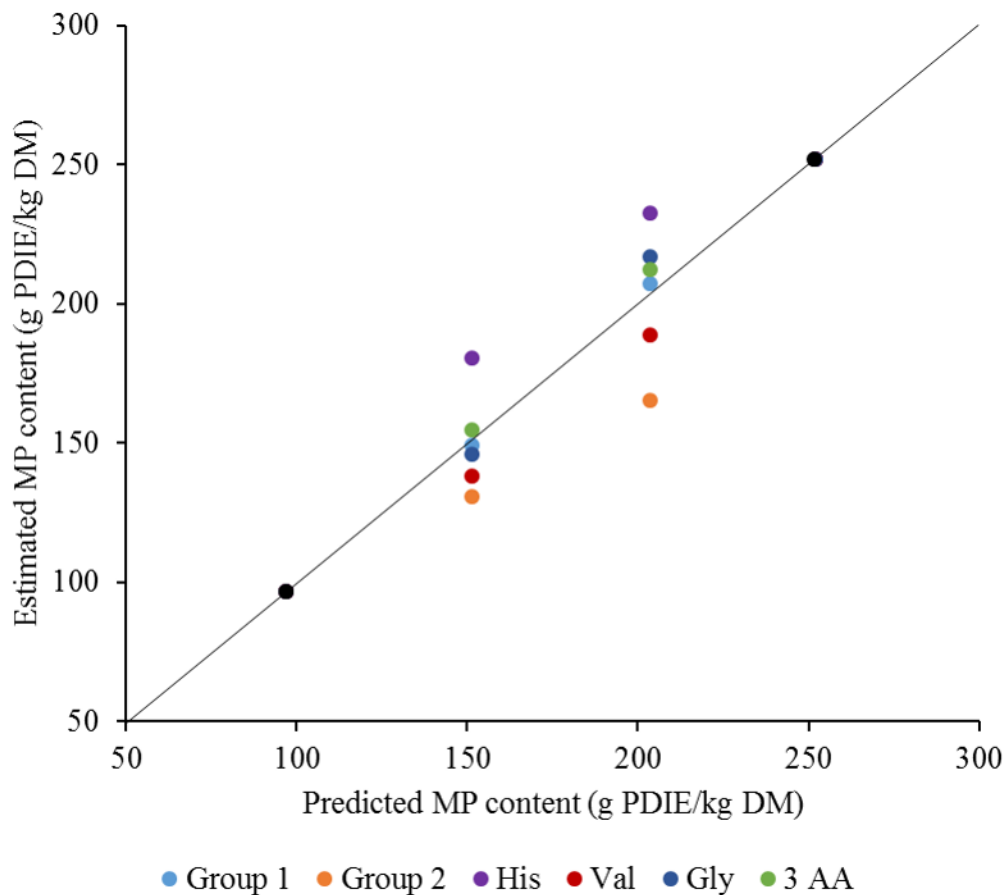


Figure 7.1. Comparison of metabolisable protein (MP) content of dietary treatments estimated from individual or grouped plasmatic AA responses with MP content predicted with INRA (2007) feed unit system. Group 1 is the sum of His, Met, Phe and Tyr. Group 2 is the sum of Ile, Leu, Lys and Val. 3AA is the weighted linear combination of His, Val and Gly ($3AA = 4*His + 2*Val - Gly$). Low and high control dietary diets are represented by black dots. The black line is the $y = x$ equation (PDIE: truly digestible (dietary + microbial) protein when available energy decreases microbial growth; DM: dry matter).

7.4. Discussion

7.4.1. Biological responses to dietary treatments

7.4.1.1. Dietary intake

Cows consumed less than expected in the low-protein treatments (LC and ML) than in the protein-rich treatments (MH and HC), which explains the slight increase in net energy supplies of the protein-rich treatments. The increase in ingestion and energy supply with an increase in protein supply has been described in the literature (Cowan *et al.*, 1981; Rico-Gomez and

Faverdin, 2001; Broderick, 2003; Faverdin *et al.*, 2003): higher protein supply causes DM intake to increase. As animals eat more, the net energy supply also increases. Despite the slight restriction in the DM offered to the cows, the experiment did not completely eliminate the effect of MP supply on net energy intake, which could partly explain the positive bias in the estimated MP value.

7.4.1.2. AA responses to dietary treatments

The trend of plasmatic AA response to MP intake is consistent with bibliography. Linear increase of His and Val with MP intake was reported (Shingfield *et al.*, 2003; Raggio *et al.*, 2004; Ouellet *et al.*, 2013; Rinne *et al.*, 2015) but Rinne *et al.* (1999) and Gidlund *et al.* (2015) reported a quadratic response and Rius *et al.* (2010b) and Cabrita *et al.* (2011) observed no response of these two AA. Gly decreased in our trial. When reported, Gly shows either a decrease (Rinne *et al.*, 1999, 2015; Ouellet *et al.*, 2013) or an absence (Blouin *et al.*, 2002; Shingfield *et al.*, 2003; Haque *et al.*, 2012; Gidlund *et al.*, 2015) of response to MP intake. Studies with perfusion of casein or AA at duodenum (Hogan *et al.*, 1968; Broderick *et al.*, 1970; Clark *et al.*, 1977; Whitelaw *et al.*, 1986; Doepel and Lapierre, 2010; Rius *et al.*, 2010a; Martineau *et al.*, 2017) reported either a decrease of Gly and increase of His and Val with MP or an absence of response. Whitelaw *et al.* (1986) reported an increase of Gly between 0 and 200 g/d of perfused casein and then a decrease from 200 to 600 g/d. The decrease of Gly with MP intake may be related to the important need for glucose synthesis for high producer animals as Gly and Ser are precursors of glycogenesis (Wu, 2009; Wang *et al.*, 2013; Martineau *et al.*, 2017). Martineau *et al.* (2017) reported in their meta-analysis that His have the higher response to increase of MP content although the response is dependant of MP supply in the diet and the ratio of duodenal microbial protein to MP supply; the response been the highest for a low ratio. Concerning the responses of Group 1 and Group 2, Martineau *et al.* (2017) also reported in their meta-analysis a linear increase of these two groups with casein perfusion. For other AA, the general trend of their responses referred to an increase with the increase of MP. Variability of responses among studies could be related to the different protein sources used to create level of MP as reported in trials studying the influence of difference feeds on plasmatic AA concentrations (Korhonen *et al.*, 2002; Shingfield *et al.*, 2003; Rinne *et al.*, 2015; Puhakka *et al.*, 2016).

7.4.2. Estimating MP values of feeds from plasmatic AA responses

The estimation of protein feeds values from plasma AA concentrations was performed as an exploratory method, which shows a good estimation with three plasmatic AA concentrations (His, Val and Gly), the weighted linear combination (3AA), Group 1 and 2 (Figure 7.1 and Annexe 7.1). The best estimations were obtained with 3AA response, which reduces the individual AA bias of His, Val and Gly and with Group 1. The less accurate estimated MP contents compared to those predicted with INRA (2007) were obtained with His and Group 2. However, the responses in plasma AA may be related to the nature of protein source brought into the diet and the limiting AA often differ according to the feedstuff (Patton et al., 2014). Martineau et al. (2019) reported in their meta-analysis different responses of plasmatic AA to their relative AA digestible in the intestines between studies where casein was perfused or feeding trials. Plasmatic Val concentration responds linearly to casein perfusion and curvilinearly in feeding trials. Plasmatic His concentration responds curvilinearly in both case, especially for high level of digestible His in the intestines. This implies that the hypothesis of linearity on which rests the present estimating feed protein value may not be validate for some protein sources or for some high variation ranges of AA intake.

Conclusion

The use of responses of certain plasmatic AA (His, Val and Gly) or groups (3AA, Group 1 and Group 2) to MP intake allowed an accurate estimation of feed protein value. However, more knowledge of the influence of different protein sources and plasmatic AA responses to MP or AA intake are needed before the method of estimating feed protein values for plasmatic AA responses can be generalised.

7.5. References

- Blouin JP, Bernier JF, Reynolds CK, Lobley GE, Dubreuil P and Lapierre H 2002. Effect of supply of metabolizable protein on splanchnic fluxes of nutrients and hormones in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 85, 2618–2630.
- Broderick GA 2003. Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 86, 1370–1381.
- Broderick GA, Kowalczyk T and Satter LD 1970. Milk production response to supplementation with encapsulated methionine per os or casein per abomasum. *Journal of Dairy Science* 53, 1714–1721.
- Broderick GA, Wallace RJ and Orskov ER 1991. Control of rate and extent of protein degradation. In *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants* (eds. T. Tsuda, Y. Sasaki and R. Kawasima), pp. 541–592. San Diego.
- Cabrita ARJ, Dewhurst RJ, Melo DSP, Moorby JM and Fonseca AJM 2011. Effects of dietary protein concentration and balance of absorbable amino acids on productive responses of dairy cows fed corn silage-based diets. *Journal of Dairy Science* 94, 4647–4656.
- Clark JH, Spires HR, Derrig RG and Bennink MR 1977. Milk production, nitrogen utilization and glucose synthesis in lactating cows infused postruminally with sodium caseinate and glucose. *The Journal of Nutrition* 107, 631–644.
- Cowan RT, Reid GW, Greenhalgh JF and Tait CA 1981. Effects of feeding level in late pregnancy and dietary protein concentration during early lactation on food intake, milk yield, liveweight change and nitrogen balance of cows. *The Journal of Dairy Research* 48, 201–212.
- Doepel L and Lapierre H 2010. Changes in production and mammary metabolism of dairy cows in response to essential and nonessential amino acid infusions. *Journal of Dairy Science* 93, 3264–3274.
- Faverdin P, M'hamed D and Vérité R 2003. Effects of metabolizable protein on intake and milk production of dairy cows independent of effects on ruminal digestion. *Animal Science* 76, 137–146.
- Gidlund H, Hetta M, Krizsan SJ, Lemosquet S and Huhtanen P 2015. Effects of soybean meal or canola meal on milk production and methane emissions in lactating dairy cows fed grass silage-based diets. *Journal of Dairy Science* 98, 8093–8106.
- Haque MN, Rulquin H, Andrade A, Faverdin P, Peyraud JL and Lemosquet S 2012. Milk protein synthesis in response to the provision of an “ideal” amino acid profile at 2 levels of metabolizable protein supply in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95, 5876–5887.

Hogan J, Weston R and Lindsay J 1968. Influence of protein digestion on plasma amino acid levels in sheep. *Australian Journal of Biological Sciences* 21, 1263.

INRA 2007. *Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux - Valeurs des aliments*. Editions Quae, Versailles (FRA).

Korhonen M, Vanhatalo A and Huhtanen P 2002. Effect of protein source on amino acid supply, milk production, and metabolism of plasma nutrients in dairy cows fed grass silage. *Journal of Dairy Science* 85, 3336–3351.

Lapierre H, Lobley GE, Doepel L, Raggio G, Rulquin H and Lemosquet S 2012. TRIENNIAL LACTATION SYMPOSIUM: Mammary metabolism of amino acids in dairy cows. *Journal of Animal Science* 90, 1708–1721.

Martineau R, Ouellet DR, Kebreab E, White RR and Lapierre H 2017. Relationships between postruminal casein infusion and milk production, and concentrations of plasma amino acids and blood urea in dairy cows: A multilevel mixed-effects meta-analysis. *Journal of Dairy Science* 100, 8053–8071.

Martineau R, Ouellet DR, Patton RA, White RR and Lapierre H 2019. Plasma essential amino acid concentrations in response to casein infusion or ration change in dairy cows: A multilevel, mixed-effects meta-analysis. *Journal of Dairy Science* 102, 1312–1329.

Mephram TB 1982. Amino Acid Utilization by Lactating Mammary Gland. *Journal of Dairy Science* 65, 287–298.

Ouellet DR, Valkeners D and Lapierre H 2013. Effects of metabolizable protein supply on N efficiency: plasma amino acid concentrations in dairy cows. In *Energy and protein metabolism and nutrition in sustainable animal production* (eds. J.W. Oltjen, E. Kebreab and H. Lapierre), pp. 453–454. Wageningen Academic Publishers, Wageningen.

Patton RA, Hristov AN and Lapierre H 2014. Protein Feeding and Balancing for Amino Acids in Lactating Dairy Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 30, 599–621.

Puhakka L, Jaakkola S, Simpura I, Kokkonen T and Vanhatalo A 2016. Effects of replacing rapeseed meal with fava bean at 2 concentrate crude protein levels on feed intake, nutrient digestion, and milk production in cows fed grass silage-based diets. *Journal of Dairy Science* 99, 7993–8006.

Raggio G, Pacheco D, Berthiaume R, Lobley GE, Pellerin D, Allard G, Dubreuil P and Lapierre H 2004. Effect of level of metabolizable protein on splanchnic flux of amino acids in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 87, 3461–3472.

- Rico-Gomez M and Faverdin P 2001. La nutrition protéique modifie l'ingestion des vaches laitières : analyse bibliographique. pp. 285–288. Paris.
- Rinne M, Jaakkola S, Varvikko T and Huhtanen P 1999. Effects of type and amount of rapeseed feed on milk production. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A - Animal Science* 49, 137–148.
- Rinne M, Kuoppala K, Ahvenjärvi S and Vanhatalo A 2015. Dairy cow responses to graded levels of rapeseed and soya bean expeller supplementation on a red clover/grass silage-based diet. *animal* 9, 1958–1969.
- Rius AG, Appuhamy JADRN, Cyriac J, Kirovski D, Becvar O, Escobar J, McGilliard ML, Bequette BJ, Akers RM and Hanigan MD 2010a. Regulation of protein synthesis in mammary glands of lactating dairy cows by starch and amino acids. *Journal of Dairy Science* 93, 3114–3127.
- Rius AG, McGilliard ML, Umberger CA and Hanigan MD 2010b. Interactions of energy and predicted metabolizable protein in determining nitrogen efficiency in the lactating dairy cow. *Journal of Dairy Science* 93, 2034–2043.
- Shingfield KJ, Vanhatalo A and Huhtanen P 2003. Comparison of heat-treated rapeseed expeller and solvent-extracted soya-bean meal as protein supplements for dairy cows given grass silage-based diets. *Animal Science* 77, 305–317.
- Wang W, Wu Z, Dai Z, Yang Y, Wang J and Wu G 2013. Glycine metabolism in animals and humans: implications for nutrition and health. *Amino Acids* 45, 463–477.
- Whitelaw FG, Milne JS, Ørskov ER and Smith JS 1986. The nitrogen and energy metabolism of lactating cows given abomasal infusions of casein. *British Journal of Nutrition* 55, 537.
- Wu G 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 37, 1–17.

7.6. Annexes

Annexe 7.1. Estimation of protein values for the medium dietary treatments¹ for 24 cows (MPY: Milk Protein Yield; AA: Amino acids) according to two different methods

Treatments ¹	Predicted value ² , g PDIE/kg DM	Estimated values, g PDIE/kg DM					
		3AA ³	Gly	Val	His	Group 1 ⁴	Group 2 ⁵
ML	151	155	146	138	181	149	131
MH	204	212	217	189	233	207	165

¹ Dietary treatments are defined by their protein level: LC, ML, MH and HC from the lowest to the highest (LC: low control; ML: medium low; MH: medium high; HC: high control)

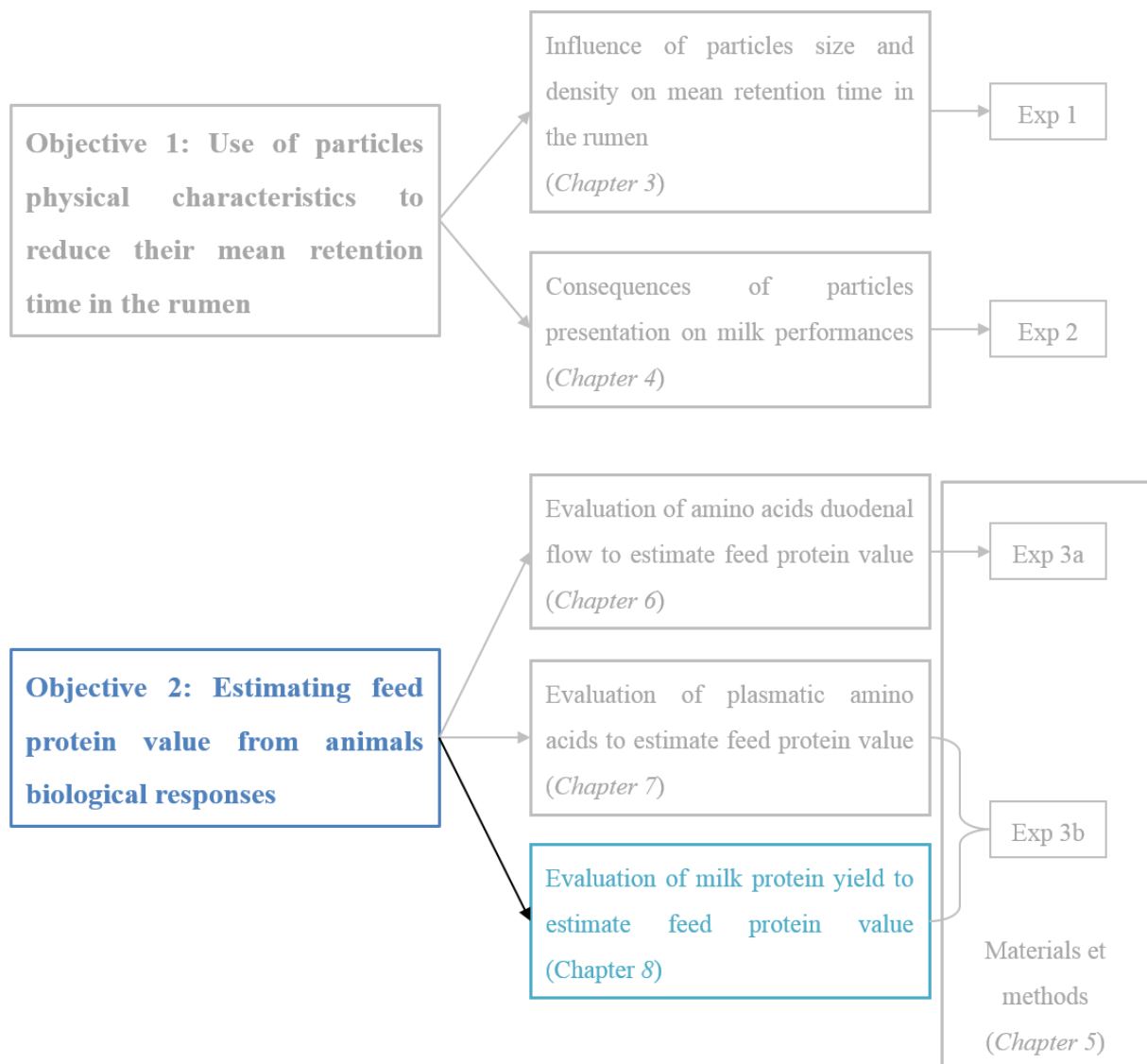
² Protein values predicted with the feeds unit system INRA (2007)

³ 3AA = linear weighted combination of the three plasma AA concentrations (4*His + 2*Val – Gly)

⁴ sum of His, Met, Phe and Tyr

⁵ sum of Ile, Leu, Lys and Val

Chapter 8 – Evaluation of milk protein yield to estimate feed protein value



Résumé

L'amélioration de la valeur protéique des aliments dans l'alimentation des ruminants est nécessaire pour réduire l'utilisation des ressources en protéines et l'excrétion d'azote dans l'environnement. Les méthodes classiques d'estimation de la valeur protéique des aliments (*in vivo*, *in vitro* et *in sacco*) montrent certaines limites (représentativité, biais dans les résultats), sont remises en cause en terme de bien-être animal par la société et ne permettent pas d'estimer de nouveaux processus visant à augmenter la proportion de protéines non dégradables dans le rumen (huiles essentielles ou tanins naturels). L'objectif de cette étude était de tester la réponse biologique des matières protéiques du lait (MP) à l'apport de protéines métabolisables (PDI) comme nouvelle méthode d'estimation de la valeur des protéines alimentaires. Quatre traitements alimentaires isoénergétiques, d'apport PDI croissant, ont été distribués selon un schéma du carré latin à 24 vaches réparties en 6 groupes homogènes (en fonction de la production laitière potentielle et de la parité) sur quatre périodes de 3 semaines. Les deux traitements contrôles contenaient soit 3,4 kg de MS de concentré énergétique (contrôle bas (CB), 97 g de PDIE / kg MS), soit 3,3 kg de MS de tourteau de soja (contrôle haut (CH), 252 g de PDIE / kg de MS). Deux traitements intermédiaires, combinant ces deux aliments (médium bas (MB), 151 g PDIE / kg MS et médium haut (MH), 204 g PDIE / kg MS), ont été utilisés pour évaluer leur teneur en protéines à partir de leur réponse en MP. L'augmentation de l'apport en PDI a significativement augmenté les MP (896 et 964 g de MP/j pour CB et CH, respectivement). Les valeurs protéiques des deux traitements intermédiaires estimées à partir de leurs réponses en MP étaient de 14 et 17 g de PDIE/kg MS plus élevés pour MB et MH, respectivement, que la valeur protéique théorique prédite par le système d'alimentation INRA (2007). Ce biais était en partie dû à la valeur des MP du traitement CH, qui se situe dans le domaine de l'apport PDI où les MP ne réagissent que marginalement à un apport accru en protéines. L'utilisation de MH comme contrôle haut au lieu de CH a réduit le biais de la valeur protéique de MB à +7 g PDIE/kg de MS par rapport à celle prédite par INRA (2007). Ces limites soulignent l'importance de la formulation des régimes afin de cibler la meilleure gamme de variation de la réponse des MP. Malgré cette légère surestimation, la réponse biologique des MP semble une approche pertinente pour estimer la valeur protéique des aliments.

Abstract

Improving feed protein values for ruminants is necessary to reduce the use of protein resources and nitrogen excretion in the environment. Classical methods to estimate feed protein value (*in vivo*, *in vitro* and *in sacco*) show some limits (representativeness, bias in results), are questioned by society about animal welfare consideration and are not suitable to estimate new processes aimed to increase the proportion of rumen undegraded protein in ruminant feeds (e.g. essential oils or natural tannins). The objective of this study was to test the biological response of the **milk protein yield** (MPY) to the supply of metabolisable protein as a new method to estimate feed protein value. Four isoenergetic dietary treatments, differing in their protein level, were fed using a Latin square design to 24 cows divided into 6 homogenous groups (based on potential production and parity of cows) over four 3-week periods. The two extreme treatments contained either 3.4 kg DM of energy concentrate (**Low Control** (LC), 97 g PDIE/kg DM) or 3.3 kg DM of soya bean meal (**High Control** (HC), 252 g PDIE/kg DM). Two medium treatments that combined these two feeds (**Medium Low** (ML), 151 g PDIE/kg DM; and **Medium High** (MH), 204 g PDIE/kg DM) were used to assess their protein contents from their MPY responses. Increasing protein supply significantly increased MPY (896 and 964 g protein/d for LC and HC, respectively). Protein contents of the two intermediate treatments estimated from their MPY responses were 14 and 17 g PDIE/kg DM higher for ML and MH, respectively, than the theoretical protein content predicted with INRA (2007). This bias was due in part to the MPY response to HC, which lay in the area of protein supply where MPY responds only marginally to increased protein intake. The use of MH as a high control instead of HC reduced the bias of ML from the theoretical protein content to +7 g PDIE/kg DM. These limitations emphasise the importance of formulating diets to target the best range of variation in MPY response. Despite this slight overestimation, MPY response seems a relevant approach to estimate the protein value of feeds.

8.1. Introduction

One way to spare vegetable proteins in dairy cows alimentation is to adequate diets formulation to the needs of the animals. It requires a precise knowledge of the protein value of feeds used by different feeding systems to determine the quantity of protein available for the animal at the duodenum also called metabolisable proteins. Some limits of the different protein value estimation methods (*in vitro*, *in sacco* or *in vivo*) have already been reported (Broderick et al.,

1991) and the increase concern of society for animal welfare threaten the use of fistulated animals needed to these methods. Besides, the development of new techniques to improve dietary protein fraction at the duodenum challenges these methods for a future inclusion in feeding system tables. In contrast, biological responses to changes in dietary protein intakes are better understood. An increase in dietary protein intake induces an increase in **milk protein yield** (MPY; Broderick (2003)), which tends to have a quadratic response (INRA, 2018), though the response can be modulated by energy intake (Brun-Lafleur *et al.*, 2010) or level of **Dry Matter Intake** (DMI; Faverdin *et al.*, 2003). When the energy supply remains constant, the increase in MPY primarily reflects variations in **metabolisable protein** (MP) intake, and a response curve of MPY to MP can be determined (Brun-Lafleur *et al.*, 2010; Daniel *et al.*, 2017). Consequently, the latter represents the biological response to the MP actually ingested by the animal. The objective of this chapter was to determine (1) whether the biological response of MPY can be used to estimate the protein value of feeds and (2) to evaluate the accuracy of the method. The principle is based on the observed MPY response to an unknown dietary treatment compared to that observed to two control treatments (low and high) with known MP contents. Calculations are based on the decrease in MP use efficiency (Sauvant *et al.*, 2015), which was assumed to be linear over the range of MP supply in this study, to predict the curvilinear MPY response to MP supply. Four dietary treatments of increasing level of MP were applied in a Latin square design on 24 lactating dairy cows (Exp 3b) distributed according to their production level and parity. The two control treatments (**Low Control** (LC) and **High Control** (HC)) were composed exclusively of energetic concentrate and soya bean meal, respectively, with known protein contents. The two medium treatments, used to validate the method for estimating protein value, contained a mix of these two feeds (**Medium Low**: ML and **Medium High**: MH). The materials and methods applied in this experiment is described in Chapter 5 and the principle of the method used to estimate feed protein value from MPY responses is presented below.

8.2. Principle of the estimation of MP content using biological response of milk protein yield

8.2.1.1. Estimating MP values using biological responses of MPY (Method A)

The following calculation method (“Method A”) was used to estimate MP values of the ML and MH treatments, which were assumed to be unknown, using the actual MPY for the two control treatments (LC and HC) of known MP content.

The method is based on the relation between MPY and MP use efficiency responses as protein intake increases (Sauvant *et al.*, 2015). In dairy cows, the curvilinear response of MPY to increased MP intake is due to the decrease in MP use efficiency as intake increases (law of diminishing returns). As each cow was its own control and feed intake was restricted, MP use efficiency was calculated according to the following equation:

$$\text{MP use efficiency} = \text{MPY} / \text{MP intake} \quad (8.1)$$

Then, assuming that the relation between MP use efficiency and MP intake was linear between LC and HC, MP use efficiency was also determined with the following equation:

$$\text{MP use efficiency} = a \times \text{MP intake} + b \quad (8.2)$$

where a and b are respectively the slope and intercept of the equation:

$$a = (\text{MP use efficiency}_{\text{HC}} - \text{MP use efficiency}_{\text{LC}}) / (\text{MP intake}_{\text{HC}} - \text{MP intake}_{\text{LC}}) \quad (8.3)$$

$$b = \text{MP use efficiency}_{\text{HC or LC}} - a \times \text{MP intake}_{\text{HC or LC}} \quad (8.4)$$

Eq. (1) and (2.1) were combined into a single second-degree polynomial equation to predict the curvilinear response of MPY as a function of MP intake:

$$a \times (\text{MP intake})^2 + b \times \text{MP intake} - \text{MPY} = 0 \quad (8.5)$$

The response of MPY to the ML and MH treatments were used in Eq. (8.5), whose positive solution provided an estimate of the MP intake of each of them.

The estimated MP intake obtained at this stage corresponded to the protein value of the mixed diet (basal ration + ML or MH treatment). The MP content of the basal ration was calculated using its INRA (2007) feed values and subtracted from the protein value of the mixed diet to estimate the MP contents (in g PDIE/kg DM) of the ML and MH treatments.

To assess the accuracy of the method, the estimated MP values of the ML and MH treatments were compared to their theoretical MP values calculated according INRA (2007).

8.2.1.2. Evaluating the influence of the high control treatment on the MP value estimated from the biological response (Method B)

The method may be less accurate when the MP intake increases, which decreases the marginal response of MPY. The following calculation method (“Method B”) was used to estimate the MP value of the ML treatment, which was assumed to be unknown, using the actual MPY of the LC and MH treatments, the latter of which was used as a control treatment with a lower MP content than HC. The calculation methods were identical to those described above for Method A.

8.2.1.3. Uncertainty analysis

Uncertainty analysis was performed to investigate the influence of variability in the MPY response and the effects of the number of cows in the experimental design on the accuracy of estimates of MP value. To do so, 40,000 MP data (10,000 per treatment) were randomly generated (Microsoft® Excel 2016) according to a normal distribution determined from the mean and SD obtained from the statistical analysis. Analysis was conducted separately for 24, 16, 12 and 8 cows, respecting the group distribution. MP values of the ML treatment were then estimated using Methods A and B.

8.3. Results

A heatwave occurred during the last period of the experiment (four days over 20°C during the night and over 35°C during the day in the stable), causing large variations in DM intake and milk yield. Therefore, statistical analyses were performed only for the first three periods; including the fourth period increased the residual standard error of all variables due to differing sensitivity of cows to heat stress. One cow was excluded from the experiment due to inflammation of the hock.

The interaction between parity and dietary treatments was not significant consequently results are not presented.

8.3.1. Intake, milk production, milk composition and MP efficiency

MP intake increased linearly between the LC and HC treatments, as expected (175 ± 31 g PDIE/d between each treatment; Table 8.1). Refusals decreased linearly between the LC and HC treatments. For the protein-rich treatments (MH and HC), refusals were low and intake

almost reached expected levels, but for the low-protein treatments (LC and ML), refusals were significantly higher (0.7 and 0.4 kg DM/d higher than those of MH and HC, respectively) leading to the same level of DMI than protein-rich treatments although they were supposed to be slightly higher. Consequently, although they were expected to remain constant, energy supply increased slightly between LC and HC (+0.5 UFL/d).

Table 8.1. Adjusted means of diet composition, milk production, and milk and blood composition by treatment¹ of 24 dairy cows (DMI: dry matter intake; MP: metabolisable protein; RSD: residual standard deviation).

Variable	Treatments ¹				RSD	P-value	Contrasts (P-value)	
	LC	ML	MH	HC			Linear	Quadratic
Diet / ration								
DMI, kg DM/d	21.2	21.3	21.3	21.2	0.17	0.87	0.83	0.54
Refusals, kg DM/d	1.2	0.9	0.5	0.5	0.11	<0.001	<0.001	0.19
Net energy, UFL/d ²	18.5	18.8	18.8	19.0	0.15	<0.001	<0.001	0.42
MP, g PDIE/d ³	1 796	2 002	2 146	2 320	16.9	<0.001	<0.001	0.14
Milk								
Milk yield, kg/d	27.8	28.9	29.1	29.5	0.60	<0.001	<0.001	0.11
Protein content,								
g/kg	32.4	32.7	32.9	32.9	0.51	0.02	0.004	0.16
Fat content, g/kg	40.5	39.6	39.8	39.6	0.91	0.2	0.11	0.38
Protein yield, g/d	896	940	956	964	13.7	<0.001	<0.001	0.02
Fat yield, g/d	1 117	1 137	1 154	1 161	20.2	0.06	<0.001	0.60
Lactose, g/kg	50.7	50.5	50.5	50.3	0.31	0.04	<0.001	0.62
Urea, mg/dL	21.7	23.2	26.5	32.6	0.87	<0.001	<0.001	<0.001
MP use efficiency ⁴	0.50	0.47	0.45	0.42	0.01	<0.001	<0.001	0.84

¹ Dietary treatments are distinguished by increasing protein content: low control (LC), medium low (ML), medium high (MH) and high control (HC)

² UFL: amount of net energy for milk production contained in 1 kg of a reference barley (87% dry matter, 2,700 kcal of metabolisable energy), based on the INRA feeding system (INRA, 2007)

³ PDIE: truly digestible (dietary + microbial) protein when available energy decreases microbial growth, based on the INRA feeding system (INRA, 2007)

⁴ MP use efficiency = milk protein yield / MP intake

MPY increased curvilinearly with MP intake ($P < 0.02$) with a difference of 68 g/d between LC and HC (Figure 8.1). The difference in MPY between treatments tended to decrease as MP intake increased (44, 16 and 8 g/d for ML–LC, MH–ML and HC–MH, respectively; Table 4). This curvilinear response is related to the linear decrease in MP intake efficiency (from 0.5 for LC to 0.42 for HC). Milk yield, protein content and fat yield increased linearly with MP intake; however, fat content was not affected (Table 4). As MP intake increased, milk urea increased quadratically, and lactose content in milk decreased linearly (but only slightly).

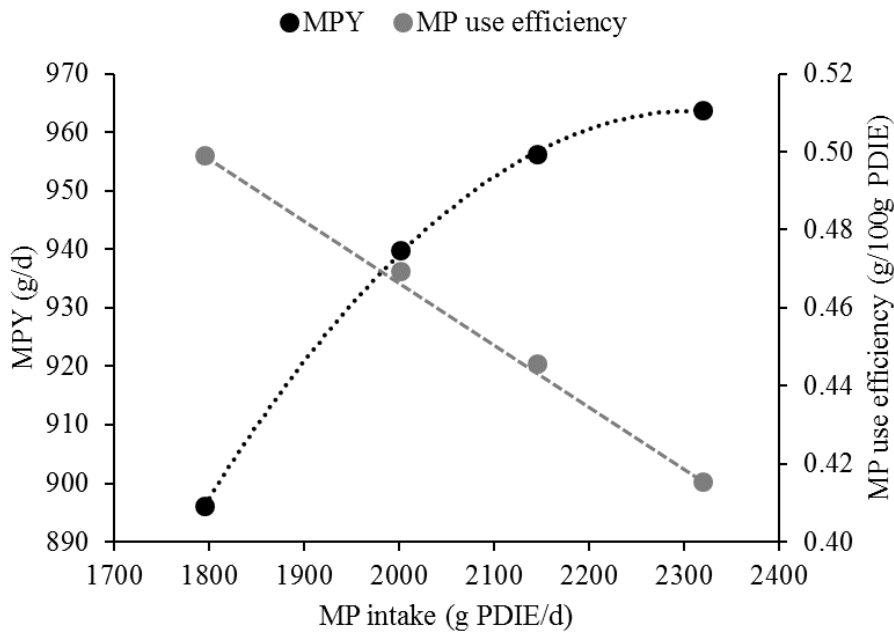


Figure 8.1. Responses of milk protein yield (MPY; dotted black line) and metabolisable protein (MP) use efficiency (grey points) to increased MP intake in dietary treatments of dairy cows. The dashed grey line is the linear relation between the two extreme dietary treatments (low control and high control). Dietary treatments are distinguished by increasing protein content: low control, medium low, medium high and high control. PDIE: truly digestible (dietary + microbial) protein when available energy decreases microbial growth, based on the INRA feeding system (INRA, 2007).

8.3.2. Estimating MP values of feeds from MPY responses

8.3.2.1. Estimating MP values using biological responses of MPY (Method A)

Method A estimated that the ML and MH treatments supplied 165 and 221 g PDIE/d, respectively, which was consistent with their relative MP contents. Compared to the theoretical

value calculated using INRA (2007), ML and MH were slightly overestimated (by 14 and 17 g PDIE/kg DM, respectively) (Table 8.2).

Table 8.2. *Estimated metabolisable protein (MP) values for the medium dietary treatments (medium low (ML) and medium high (MH))¹ for 24 dairy cows according to two methods*

Method	Treatment ¹	Theoretical MP value ² , g PDIE/kg DM	Estimated MP value, g PDIE/kg DM
A ³	ML	151	165
	MH	204	221
B ⁴	ML	151	158

¹ Dietary treatments are distinguished by increasing protein content: low control (LC), ML, MH and high control (HC)

² MP values calculated using the feed unit system of INRA (2007)

³ Method A: estimate using LC and HC as controls

⁴ Method B: estimate using LC and MH as controls

8.3.2.2. Evaluating the influence of the high control treatment on the MP value estimated from the biological response (Method B)

Replacing the HC treatment with MH as the high control treatment targeted more precisely the area where the MPY response is greatest. Method B estimated the MP value of the ML treatment as 158 g PDIE/kg DM, thus decreasing the bias observed with Method A to only +7 g PDIE/kg DM (Table 8.2). The uncertainty analysis with 24 cows led to the same conclusion (Figure 8.2), with Method B (160 ± 18 g PDIE/kg DM) estimating an MP value for ML closer to the theoretical value calculated using INRA (2007) than Method A did (167 ± 20 g PDIE/kg DM). Variability around the means was also slightly lower for Method B than for Method A.

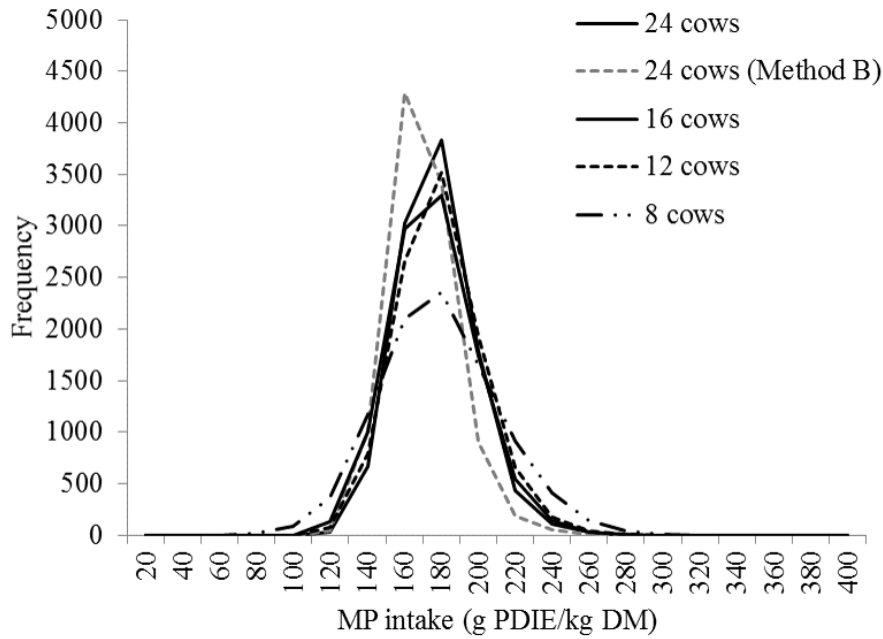


Figure 8.2. Frequency distribution of metabolisable protein (MP) in g PDIE/kg DM calculated with an uncertainty analysis of milk protein yield for the medium low (ML) treatment for 24, 16, 12 and 8 dairy cows, respecting the block distribution of the experimental design. Dietary treatments are distinguished by increasing protein content: low control (LC), ML, medium high (MH) and high control (HC). Black lines: estimate of ML with LC and HC as controls (Method A). Grey line: estimate of ML with LC and MH as controls (Method B). PDIE: truly digestible (dietary + microbial) protein when available energy decreases microbial growth, based on the INRA feeding system (INRA, 2007).

8.3.2.3. Influence of the number of cows on the accuracy of the estimated MP value

The mean \pm SD of MPY (g/d) used for the normal distribution in the uncertainty analysis were 939 ± 7.2 for 24 cows, 932 ± 8.3 for 16 cows, 951 ± 8.6 for 12 cows and 927 ± 12.4 for 8 cows. Mean MP contents (g PDIE/kg DM) of ML for 24, 16, 12 and 8 cows were 167 ± 20 (theoretical value: 151), 166 ± 23 (theoretical value: 151), 169 ± 23 (theoretical value: 153) and 169 ± 32 (theoretical value: 152), respectively (Figure 8.2). These means were thus 16, 15, 16 and 17 g higher than the theoretical values for 24 (Method A), 16, 12 and 8 cows, respectively. The mean MP value was always close to the theoretical value calculated with INRA (2007), with a systematic positive bias regardless of the number of cows. However, variability around the means increased when the experimental design contained only 8 cows.

8.4. Discussion

8.4.1. Biological responses to dietary treatments

Intake – Cows consumed less than expected in the low-protein treatments (LC and ML) than in the protein-rich treatments (MH and HC), which explains the slight increase in net energy supplies of the protein-rich treatments. The increase in ingestion and energy supply with an increase in protein supply has been described in the literature (Cowan *et al.*, 1981; Rico-Gomez and Faverdin, 2001; Broderick, 2003; Faverdin *et al.*, 2003): higher protein supply causes DM intake to decrease. As animals eat more, the net energy supply also increases. Despite the slight restriction in the DM offered to the cows, the experiment did not completely eliminate the effect of MP supply on net energy intake, which could partly explain the positive bias in the estimated MP value.

MPY response – We observed a quadratic increase in the response of MPY to protein intake, which is consistent with the literature, both linearly (Krohn and Andersen, 1980; Broderick, 2003) and quadratically (Macleod *et al.*, 1984; Brun-Lafleur *et al.*, 2010; Daniel *et al.*, 2016) (Table 4). The amplitude of the MPY response (68 g/d of MPY for a range of MP intake between LC and HC of 524 g MP/d) is higher than that observed by Krohn and Andersen (1980) (47 g/d for a range of MP intake of 562 g MP/d). However, Brun-Lafleur *et al.* (2010) observed an MPY response of 134 g/d for a range of MP intake of 560 g MP/d across treatments with the same level of energy. The lower MPY response in our study may be related to the later stage of lactation (257 d of lactation on average during the experiment) or to a shortage in essential amino acids in the protein-rich treatments. According to INRA (2018), digestible methionine supply, in particular, increase from 1.79% to 1.98% of PDI from the LC to HC treatments respectively, for a requirement of 2.4% of PDI. When amino acids are balanced in the diet, simulations performed with the INRA (2018) feeding system predict an MPY response of 96 g/d between LC and HC.

Response of milk production and milk composition – The milk yield response was linear, which is consistent with observations of Broderick (2003), Raggio *et al.* (2004) and Imran *et al.* (2017). The linear increase in fat yield with MP intake is consistent with literature data (Macleod *et al.*, 1984; Broderick, 2003; Colmenero and Broderick, 2006; Imran *et al.*, 2017). The linear decrease in milk lactose content as MP intake increased may have been due to a lactose production rate slower than the rate of milk volume production (Lemosquet *et al.* (2008). Milk and blood urea had the same linear and quadratic increase, due to an increase in MP intake and a decrease in MP use efficiency (Broderick and Clayton, 1997; Nousiainen *et al.*, 2004).

The slight difference between milk and blood composition is related to the time required for urea to balance between the two fluids, as blood samples were taken during the morning meal immediately after milking (Broderick, 2006).

Response of MP use efficiency – The response of MP use efficiency was linear ($P < 0.001$), thus validating our assumption and calculation method. This response is consistent with those found in the literature, which vary from 0.35 to 0.58 depending on the diet considered (Krohn and Andersen, 1980; Broderick, 2003; Metcalf *et al.*, 2008; Brun-Lafleur *et al.*, 2010). Recent meta-analysis (INRA, 2018; Moraes *et al.*, 2018) reported a nonlinear and convex decrease in MP use efficiency over a wide range of MP supply, although this relation can be assumed to be linear for small differences in MP supply (Sauvant *et al.*, 2015). Given these results, we expected to find a convex response for MP use efficiency even though the linearity assumption had been validated: efficiency values for ML and MH would have been below the linear relation between the two controls. We obtained the opposite result, however, with MP use efficiency of ML and MH slightly above the linear relation (+0.03 and +0.02 g in milk/g of intake, respectively) (Figure 1). The same concave response of MP use efficiency has been observed in other studies (Vérité and Delaby, 2000; Brun-Lafleur *et al.*, 2010; Bahrami-Yekdangi *et al.*, 2014). The concavity is slight but may have caused the overestimation of MP values. This concave response might have occurred because the response of MPY to MP intake peaked with the HC treatment, inducing a more rapid decrease in MP use efficiency.

8.4.2. Estimating MP values of feeds from MPY responses

8.4.2.1. Estimating MP values using biological responses of MPY

MP values of the medium treatments (ML and MH) estimated by Method A were accurate compared to the theoretical values but had a systematic bias (i.e. +8%). This overestimate may be due to the concave shape of the MPY response: as MP intake increased, marginal MP use efficiency decreased, decreasing the response of MPY. This relative lack of MPY response is more likely for protein-rich diets (high MP intake), as it may have been the case for the HC treatment. Vérité and Delaby (2000) show that the MPY response is negligible when the PDI/UFL ratio exceeds 110. In our study, the PDI/UFL ratio of the HC treatment was 123, placing it in an area with small marginal responses. Method B was designed to study the influence of the high control value on estimates by targeting the area where MPY response is greatest. Since the PDI/UFL ratio of the MH treatment was 114, method B's bias for ML decreased to only +7 g PDIE/kg DM, and its MP value from uncertainly analysis (160 g PDIE/kg DM) was closer to the theoretical value than that of Method A (167 g PDIE/kg DM).

The amount of MP supplied by the high control treatment is crucial to increase the accuracy of the estimated MP value. This requires focusing on formulation of both the basal ration and control treatments and offering them in amounts as a function of cows' potential milk production.

8.4.2.2. Influence of the number of cows on the accuracy of the estimated MP value

Decreasing the number of cows increased uncertainty in estimates of the MP value. Using fewer than 12 cows could increase variability in MPY responses to the point that it becomes too large to estimate MP values accurately. A group of 16 to 24 cows is required, depending on the degree of accuracy desired. However, the inability to use the fourth period of the Latin square design decreased the statistical power of our study; thus, 16 cows may be a good compromise between cost and accuracy.

Conclusion

Using the MPY response seems a suitable approach to estimate the protein value of feeds. This method can be performed with normal cows in facilities with equipment that can control concentrate supplies and feed intake. The validation of the method in this study is satisfactory and likely more sensitive than other methods, despite the observed bias. To decrease this bias, special care must be taken in formulating the diet to ensure that the protein intake does not exceed the amount at which the MPY response becomes too small. It is also important to control, as much as possible, potential interactions with the energy supply due to intake or microbial synthesis resulting from a shortage of degradable nitrogen.

8.5. References

- Bahrami-Yekdangi H, Khorvash M, Ghorbani GR, Alikhani M, Jahanian R and Kamalian E 2014. Effects of decreasing metabolizable protein and rumen-undegradable protein on milk production and composition and blood metabolites of Holstein dairy cows in early lactation. *Journal of Dairy Science* 97, 3707–3714.
- Broderick GA 2003. Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 86, 1370–1381.
- Broderick GA 2006. Nutritional strategies to reduce crude protein in dairy diets. pp. 1–14. Tempe, AZ.
- Broderick GA and Clayton MK 1997. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. *Journal of Dairy Science* 80, 2964–2971.
- Broderick GA, Wallace RJ and Orskov ER 1991. Control of rate and extent of protein degradation. In *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants* (eds. T. Tsuda, Y. Sasaki and R. Kawasima), pp. 541–592. San Diego.
- Brun-Lafleur L, Delaby L, Husson F and Faverdin P 2010. Predicting energy × protein interaction on milk yield and milk composition in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93, 4128–4143.
- Colmenero JJO and Broderick GA 2006. Effect of dietary crude protein concentration on milk production and nitrogen utilization in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 89, 1704–1712.
- Cowan RT, Reid GW, Greenhalgh JF and Tait CA 1981. Effects of feeding level in late pregnancy and dietary protein concentration during early lactation on food intake, milk yield, liveweight change and nitrogen balance of cows. *The Journal of Dairy Research* 48, 201–212.
- Daniel JB, Friggens NC, Chapoutot P, Van Laar H and Sauvant D 2016. Milk yield and milk composition responses to change in predicted net energy and metabolizable protein: a meta-analysis. *animal*, 1–11.
- Daniel JB, Friggens NC, Van Laar H, Ferris CP and Sauvant D 2017. A method to estimate cow potential and subsequent responses to energy and protein supply according to stage of lactation. *Journal of Dairy Science* 100, 3641–3657.
- Faverdin P, M'hamed D and Vérité R 2003. Effects of metabolizable protein on intake and milk production of dairy cows independent of effects on ruminal digestion. *Animal Science* 76, 137–146.

Imran M, Pasha TN, Shahid MQ, Babar I and Naveed Ul Haque M 2017. Effect of increasing dietary metabolizable protein on nitrogen efficiency in Holstein dairy cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 30, 660–665.

INRA 2007. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux - Valeurs des aliments. Editions Quae, Versailles (FRA).

INRA 2018. INRA feeding system for ruminants. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.

Krohn CC and Andersen PE 1980. Different energy and protein levels for dairy cows in the early weeks of lactation. *Livestock Production Science* 7, 555–568.

Lemosquet S, Guinard-Flament J, Raggio G, Lapierre H and Rulquin H 2008. Comment les apports de protéines augmentent-ils le volume de lait et les matières utiles ? pp. 271–274. Paris.

Macleod GK, Grieve DG, McMillan I and Smith GC 1984. Effect of varying protein and energy densities in complete rations fed to cows in first lactation. *Journal of Dairy Science* 67, 1421–1429.

Metcalf JA, Mansbridge RJ, Blake JS, Oldham JD and Newbold JR 2008. The efficiency of conversion of metabolisable protein into milk true protein over a range of metabolisable protein intakes. *animal* 2, 1193–1202.

Moraes LE, Kebreab E, Firkins JL, White RR, Martineau R and Lapierre H 2018. Predicting milk protein responses and the requirement of metabolizable protein by lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 101, 310–327.

Nousiainen J, Shingfield KJ and Huhtanen P 2004. Evaluation of milk urea nitrogen as a diagnostic of protein feeding. *Journal of Dairy Science* 87, 386–398.

Raggio G, Pacheco D, Berthiaume R, Lobley GE, Pellerin D, Allard G, Dubreuil P and Lapierre H 2004. Effect of level of metabolizable protein on splanchnic flux of amino acids in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 87, 3461–3472.

Rico-Gomez M and Faverdin P 2001. La nutrition protéique modifie l'ingestion des vaches laitières : analyse bibliographique. pp. 285–288. Paris.

Sauvant D, Cantalapiedra-Hijar G, Delaby L, Daniel J-B, Faverdin P and Nozière P 2015. Actualisation des besoins protéiques des ruminants et détermination des réponses des femelles laitières aux apports de protéines digestibles dans l'intestin. *INRA Production Animale* 28, 347–368.

Vérité R and Delaby L 2000. Relation between nutrition, performances and nitrogen excretion in dairy cows. *Annales de zootechnie* 49, 217–230.

Chapitre 9 – Discussion générale

En élevage laitier, la recherche d'une meilleure efficacité azotée est au cœur de nombreux enjeux car elle permet à la fois de produire en utilisant moins de protéines végétales et de limiter les rejets, notamment urinaires, qui sont à l'origine d'émission du nitrate, d'ammoniac et de protoxyde d'azote (puissant gaz à effet de serre). Depuis les années 1975, l'élevage français a bénéficié de l'utilisation de tourteaux protégés de la dégradation ruminale par le tannage des protéines au formaldéhyde. L'utilisation du formaldéhyde va s'arrêter à plus ou moins court terme compte tenu des risques inhérents à son emploi en usine ce qui requiert le développement de nouvelles techniques de protection des protéines. En effet, aujourd'hui l'industrie ne dispose pas de technologies de substitution aussi efficace que le tannage.

Ces enjeux ont amené deux objectifs auxquels ce travail se rapporte : d'une part explorer de nouvelles pistes pour réduire la dégradation des protéines des aliments dans le rumen (donc augmenter la quantité de protéines digestibles d'origine alimentaire arrivant au duodénum) et d'autre part développer une nouvelle méthode d'évaluation de la valeur protéique des aliments étant entendu que la méthode des sachets incubés dans le rumen (ou la dégradabilité enzymatique qui est une méthode dérivée) peuvent ne pas être applicables dans toutes les situations, par exemple lors d'apport d'additifs alimentaires modifiant l'activité fermentaire du rumen. Pour pouvoir répondre à ces deux objectifs, ce travail de thèse a cherché à répondre à deux questions chacune se référant à un des objectifs. La première question de recherche a été de savoir si les caractéristiques physiques (taille et densité spécifique) des particules de concentrés pouvaient être utilisées pour réduire le **Temps Moyen de Séjour** (TMS) dans le rumen diminuant ainsi le temps d'exposition aux fermentations. Pour cela, deux essais ont été réalisés l'un portant sur l'influence de la taille et de la densité de particules de plastique sur leur TMS dans le rumen (Chapitre 3) et le deuxième sur l'effet de la forme de présentation du tourteau de soja sur les performances lactières des animaux (Chapitre 4). La deuxième question de recherche s'est, elle, attachée à déterminer si les réponses biologiques des animaux (**acides aminés** (AA) plasmatiques et synthèse des matières protéiques du lait) pouvaient être utilisées pour estimer la valeur protéique des aliments. Deux essais conduits sur le même schéma expérimental ont été réalisés pour estimer la valeur protéique des aliments à partir de la mesure du flux d'AA duodénaux (Chapitre 6) réalisée sur 4 vaches fistulées et à partir de la mesure des concentrations en AA plasmatique (Chapitre 7) et de la synthèse de matières protéiques du lait (Chapitre 8) réalisée sur 24 vaches laitières.

L'objectif de ce chapitre est de mettre en perspective les résultats obtenus à travers les différentes expériences menées pour chacune de ces deux questions de recherche. Ainsi, dans la première partie de ce chapitre, nous discuterons les conséquences possibles de la dynamique

de transit des particules de concentrés dans la détermination de leur valeur protéique des aliments. Ces résultats amènent d'une part à intégrer les aspects dynamiques d'évolution de la taille et de la densité spécifique des aliments dans les taux de dégradation et de transit et d'autre part à envisager les différentes applications possibles pour les fabricants d'aliments. La deuxième partie de ce chapitre discutera les possibilités d'évaluation les valeurs protéiques des rations, notamment pour prendre en compte de nouveaux modes de protection des protéines dans la digestion ruminale. La nouvelle méthode d'estimation de la valeur protéique des aliments à partir des réponses biologiques des animaux (AA plasmatiques et matières protéiques du lait) est dans un premier temps comparée à la méthode faisant office de référence (méthode *in vivo* à partir de la mesure d'AA duodénaux) pour permettre d'en dégager les forces et les faiblesses. Puis les deux réponses biologiques (AA plasmatiques et matières protéiques du lait) sont comparées entre elles pour déterminer les avantages et les inconvénients de ces deux réponses. Enfin les différentes applications possibles de cette nouvelle méthode sont discutées notamment pour envisager d'évaluer l'efficacité de nouveaux traitements à effets plus systémiques comme de l'ajout d'extraits végétaux pour réduire la dégradabilité des protéines dans le rumen ou l'effet d'une réduction du TMS des particules par variations de leurs caractéristiques physiques telles que développées dans la première partie du chapitre.

9.1. Utilisation des caractéristiques physiques des particules pour moduler le temps de séjour dans le rumen

9.1.1. La taille et la densité des particules de plastique influencent la valeur protéique alimentaire théorique des aliments

L'étude de l'influence de la taille et la densité des particules de plastique a permis de montrer que la densité avait un effet quadratique sur le TMS dans le rumen avec un optimum de sortie des particules de ce compartiment pour une densité comprise entre 1,1 et 1,3. Sur cette gamme de densité, nous avons montré que la taille de la particule de plastique n'avait pas d'influence sur le TMS mais qu'en dehors de cette zone, le TMS augmentait avec la taille (Figure 9.1).

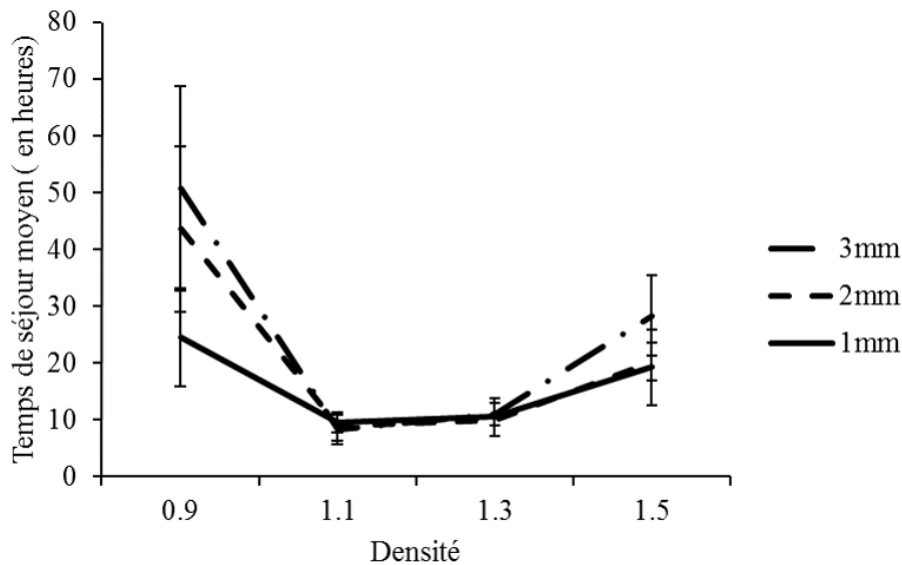


Figure 9.1. Influence de la densité (0.9 – 1.5) et de la taille (1 – 3 mm) des particules de plastique sur le temps moyen de séjour dans le rumen. Données issues du Chapitre 3.

Pour pouvoir estimer l'impact des caractéristiques physiques (taille et densité) des particules de plastique sur la valeur protéique alimentaire (PDIA) théorique des aliments, ces TMS (égaux à l'inverse des taux fractionnaires de transit de la phase solide : k_{pt}) peuvent être utilisés dans les équations de calcul de la DT du système d'alimentation INRA (2018). La méthode proposée intègre déjà ces taux de passage différenciés pour les liquides, les particules de fourrages et celles de concentrés. L'approche de ce calcul est présentée ci-dessous :

$$PDIA = PIA \times dr \times 0,01 \quad (9.1)$$

où PIA sont les protéines d'origine alimentaire entrant dans l'intestin (g/kg MS) obtenues par l'équation 9.2 et dr est la digestibilité réelle de cette fraction (%)

$$PIA = MAT \times (1 - 0,01 \times DT) \quad (9.2)$$

où MAT est la matière azotée totale (g/kg MS) de l'aliment et DT est la dégradabilité théorique (%) obtenue à partir de l'équation 9.3.

$$DT = a \times [100/(100 + k_{lt})] + b \times [k_d/(k_d + k_{pt})] \quad (9.3)$$

où a (%) est la fraction soluble qui est supposée être dégradée à un taux fractionnaire de 100%/h et sortir du rumen avec la phase liquide au taux de transit k_{lt} (équation 9.4), b (%) est la fraction potentielle dégradable qui est supposée être dégradée au taux de dégradation k_d (%/h) et sortir du rumen avec la phase solide au taux k_{pt} (Equation 9.7).

$$k_{lt} = 5,35 + 2,18 \times NI - 3,71 \times PCO^2 \quad (9.4)$$

où NI est le niveau d'ingestion (kg MS ingéré en % du poids vif, égal à 3,01) et PCO est la proportion de concentré (% , égal à 30) ce qui donne un taux de transit de la phase liquide $klt = 11,6\%/h$ pour Exp 1.

Dans ces nouveaux systèmes d'alimentation INRA 2018, le taux kpt de passage des particules est calculé dans le contexte spécifique de la ration en combinant les taux de passage des particules de fourrages et celles de concentrés.

$$kft = 2,02 + 0,88 \times NI - 3,13 \times PCO^2 \quad (9.5)$$

$$kct = 2,53 + 1,22 \times NI - 2,61 \times PCO^2 \quad (9.6)$$

$$kpt = kft \times (1 - PCO) + kct \times PCO \quad (9.7)$$

Cependant, ces valeurs de kpt ne sont pas calculées à partir de valeurs particulières des aliments. Cette individualisation pourrait être essentielle dans la mesure où les tourteaux qui ne représentent que 10-15% de la ration peuvent peser sur la moitié des apports de protéines.

C'est avec cette idée que nous avons essayé d'utiliser les différents kpt ($kpt=1/TMS$) obtenus par taille (indépendamment de la densité) ou par densité (indépendamment de la taille) des particules de plastique issus de l'Exp 1 (Chapitre 3 ; Tableau 9.1) pour calculer les données de dégradation *in situ* de tourteau soja, de pois, de maïs et d'avoine issus des travaux de Michalet-Doreau and Cerneau (1991). Nous avons retenu les données de cette étude car elle fournissait les paramètres des dégradations in sacco (paramètre, a, b, kd) pour réaliser les simulations et correspondaient à des matières premières ayant des teneurs en MAT et des DT très contrastées (tableau 9.2). Les données issues du tamis de taille 0,8 mm étant le seul commun aux quatre aliments dans ces travaux, elles ont été utilisées dans les équations précédemment décrites. La dr des quatre aliments correspond à celle donnée dans les tables d'alimentation INRA (2018) : 95, 91, 90 et 79 respectivement pour le tourteau de soja, le pois, le maïs et l'avoine. Les kd des quatre aliments sont supposés ne pas être affectés par les variations du kpt.

Tableau 9.1. Taux fractionnaires de transit (*kpt*) en fonction de la taille (indépendamment de la densité) et de la densité (indépendamment de la taille) des particules de plastique obtenus dans l'Exp 1 (Chapitre 3).

Caractéristiques physiques	<i>kpt</i> (%/h)	
Densité		
	0,9	5
	1,1	13
	1,3	11
	1,5	5
Taille (mm)		
	1	10
	2	9
	3	7

Tableau 9.2. Paramètres de dégradation *in situ* de l'azote dans le rumen de quatre aliments (MAT : Matières Azotées Totales ; D'après Michalet-Doreau and Cerneau, 1991)

Aliments	MAT (g/kg MS)	a (%)	b (%)	kd (%/h)
Tourteau de soja	510	22,4	77,6	9,5
Pois	239	73,0	26,9	25,9
Maïs	126	25,3	74,8	2,1
Avoine	134	33,1	61,1	38,6

L'augmentation de *kpt* entraîne une diminution de la DT et au final un accroissement de la valeur PDIA pour tous les aliments (Figure 9.2). Cette augmentation est d'autant plus importante pour les aliments qui ont une teneur en MAT importante et une vitesse de digestion des particules *kd* faible (+88 g PDIA/kg MS pour le tourteau de soja entre 5 et 13%/h). Elle est par contre plus faible pour les aliments à faible teneur en MAT (+9 g PDIA/kg MS pour l'avoine entre 5 et 13%/h) ou un *kd* élevé (+10 g PDIA/kg MS pour le pois entre 5 et 13%/h).

Les simulations réalisées montrent que la taille et la densité des particules de plastique peuvent entraîner des différences importantes en terme de DT et donc de valeur PDIA des aliments. Dans le cadre de l'essai mené pour ce travail de thèse, la densité est la caractéristique physique entraînant la variation la plus importante puisque les densités 1,1 et 1,3 ont des *kpt* très rapides et proches de ceux des liquides (13 et 11%/h respectivement), contre 5%/h pour les densités 0,9 et 1,5.

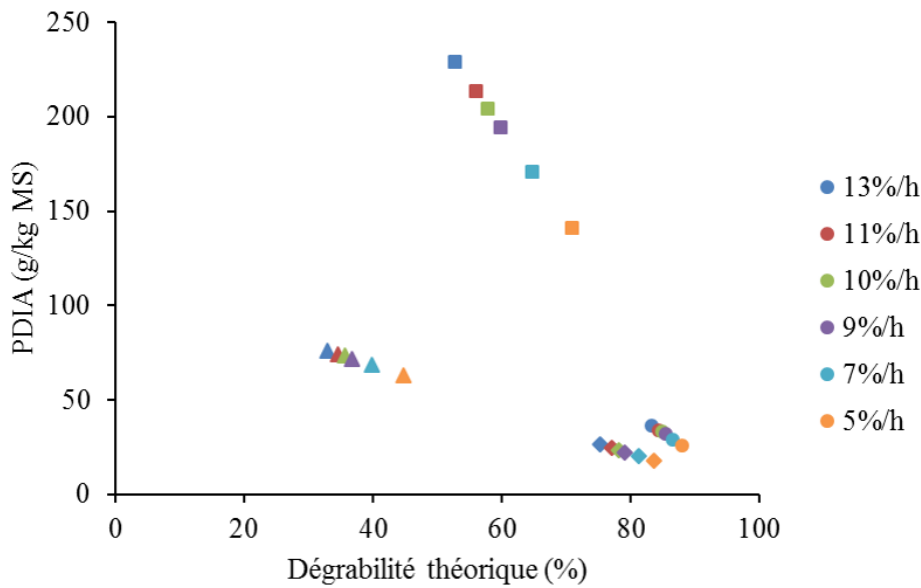


Figure 9.2. Relation entre la valeur protéique alimentaire (PDIA) et la dégradabilité théorique du tourteau de soja (carré), du pois (rond), du maïs (triangle) et de l’avoine (losange) en fonction des variations du taux fractionnaire de transit (de 5 à 13%/h). Données issues du Chapitre 3 et des travaux de Michalet-Doreau and Cerneau (1991)

Ces simulations ouvrent des perspectives nouvelles. Même si ces résultats doivent être interprétés avec précaution car ils sont obtenus à partir de particules de plastique et l’interaction entre taille et densité n’a pas été prise en compte, ils peuvent s’appliquer à des particules d’aliments (ce point a été discuté dans le chapitre 3). Ils montrent que les effets des caractéristiques physiques sont importants surtout pour les tourteaux et que les effets se cumuleraient avec des traitements visant à réduire la vitesse de digestion kd. Ceci ouvre la voie à des modes de protection se substituant au tannage.

Une évolution des systèmes d’alimentation pourrait conduire à utiliser des kct différenciées par type de concentrés en fonction de leurs caractéristiques physiques en plus des effets niveaux d’alimentation déjà pris en compte. Il conviendrait alors sans doute de pondérer ces taux de passage par leur valeur de MAT pour estimer un kpt global capable de prendre en compte beaucoup plus finement ces aspects transits.

Les méthodes actuelles de calcul des valeurs protéiques des aliments ne prennent pas en compte les caractéristiques spécifiques des particules de concentrés qui sont distribuées. Elles reposent sur des méthodes *in situ* (sachets) ou *in vitro* (solubilité ou digestibilité enzymatique) d’aliments qui ont subi un broyage sur une même grille fine. Il est bien connu qu’un même broyage peut

conduire à des granulométries des particules très différentes (Michalet-Doreau and Cerneau, 1991) et peut déjà induire des biais dans la méthode. Mais les traitements technologiques des concentrés ne se limitent pas à un broyage. Les traitements de protection en particulier peuvent conduire à des séquences complexe d'hydratation, addition des sucres, chauffage, extrusion, séchage qui sont de nature à totalement modifier la densité des particules. La question de revoir les méthodes de calcul des aliments riches en protéines en fonction de leur caractéristiques physiques et pas seulement chimiques, mériterait d'être étudiée plus précisément, peut-être même en essayant également de prendre en compte la dynamique des processus.

9.1.2. Intégration de la dynamique d'évolution des propriétés physiques des particules dans le calcul des taux de dégradation et de TMS

La bibliographie de la thèse a bien démontré (voir Chapitre 1, paragraphe 1.3.3) l'existence d'un cycle de vie de la particule dans le rumen au cours duquel la particule rentre en fermentation ce qui l'amène à perdre de la densité spécifique et ce d'autant plus vite que la particule est petite. Si elle est assez grosse est dense, elle pourrait donc sortir avant d'avoir une vitesse de fermentation élevée. En effet le rapport surface/masse de la particule est sans doute un bon prédicteur de sa vitesse de dégradation. Cette perte de densité, si elle est rapide, va piéger la particule dans le rumen ne lui permettant de ressortir que lorsque le rythme des fermentations va se ralentir et permettre une reprise de densité.

Ainsi, les kd et TMS d'une particule sont amenés à évoluer en parallèle de l'évolution de sa taille et de sa densité spécifique dans le rumen (Figure 9.3) : lorsqu'une particule alimentaire arrive dans le rumen, sa taille et sa densité spécifique correspondent à un kd et un TMS. La rumination et les fermentations microbiennes de cette particule vont entraîner des changements en terme de taille et de densité spécifique qui vont conduire à des nouveaux kd et TMS relatifs à ces nouvelles caractéristiques physiques. Ce phénomène va se poursuivre jusqu'à ce que 1) la particule sorte du rumen (TMS = 0 heure) ou 2) que la dégradation de la particule soit complète (kd = 100%) auquel cas seule la sortie de la particule du rumen détermine sa valeur PDIA.

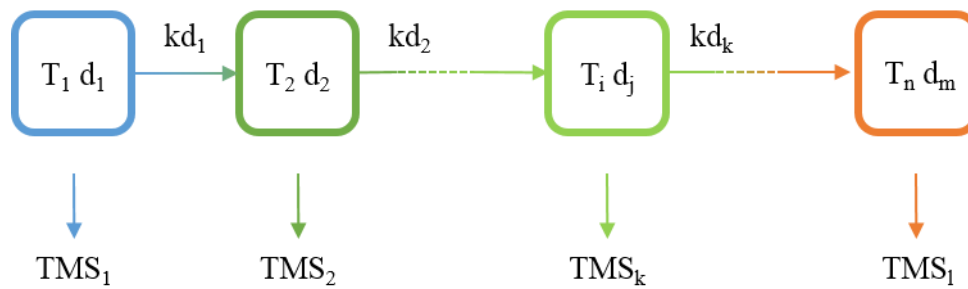


Figure 9.3. Evolution de la taille (T) et de la densité spécifique (d) d'une particule alimentaire dans le rumen en fonction de son taux de dégradation (kd) et de son temps moyen de séjour (TMS)

A terme, ces aspects dynamiques de changement de taille et densité spécifique des particules pourrait être intégrés dans les calculs des kd et kpt utilisés dans l'équation de la DT et des PDIA des aliments. Il serait intéressant de voir avec des approches *in vivo* et *in vitro* sur des particules alimentaires de différentes tailles et densités si l'on peut valider un modèle qui serait construit sur l'hypothèse d'une vitesse de digestion fonction de la surface sur la masse de la particule (en la supposant ronde par exemple) qui modifierait la densité spécifique et la taille de la particule en retour.

9.1.3. Etudier les conséquences de la taille des particules des matières premières et de leur granulation

Ces résultats offrent des perspectives intéressantes dans leur application à la fabrication des aliments pour les vaches laitières. Le Chapitre 4 a déjà soulevé un questionnement autour de la forme de présentation des concentrés protéiques en lien avec une potentiel modulation de leur TMS par ce biais. La taille de broyage des aliments avant granulation semble notamment être un facteur à approfondir en menant une réflexion sur le comportement du granulé une fois arrivé dans le rumen (maintien du granulé ou délitement) et ses conséquences sur le taux de dégradabilité des particules alimentaires et leur TMS. Ainsi, une première étape consisterait à étudier l'effet du broyage avant granulation sur le maintien du granulé dans le rumen et son taux de dégradation. La méthode *in situ* de sachet ruminiaux pourrait être utilisée à cette fin (Michalet-Doreau et al., 1987). Plus largement, pour pouvoir étudier l'effet de la variation de la taille des particules, un tamisage des aliments permettrait d'obtenir différentes tranches de granulométrie des aliments. L'influence des différentes tranches sur le TMS dans le rumen pourrait être étudiée, idéalement en utilisant des isotopes stables comme le carbone comme

marqueur interne (Warner, 2013), ou sinon en ayant recours à différents marqueurs externes tels que les terres rares en gardant à l'esprit les différentes limites de l'utilisation de telles molécules (migration des marqueurs, préférence d'adhérence pour les petites particules ; Faichney, 1993). Une telle étude permettrait de tester l'hypothèse formulée autour de la taille à la fin du Chapitre 3 relative à une taille de 3 – 4 mm comme taille optimale entre un TSM court et un kd réduit.

9.1.4. Du travail de recherche à l'innovation technologique

Nos résultats ont montré que la densité des particules était un facteur essentiel. Les premières mesures de la densité spécifique des matières premières entrant dans la composition des aliments pour les animaux d'élevage, réalisées au sein d'Agrial sur différents tourteaux par la méthode du pycnomètre, montrent une variabilité entre les matières premières (Tableau 9.3) : le tourteau de pression de palmiste est la matière première qui possède la densité spécifique la plus importante et le tourteau feed d'extraction de tournesol à la densité spécifique la plus faible. Cette variabilité se retrouve également dans l'étude menée par Bhatti and Firkins (1995) et elle amène à des profils différents d'évolution de la densité spécifique des aliments (Voir Chapitre 1, Figure 1.4). Par ailleurs, il est possible que l'application de certains processus industriels tels que l'extrusion ou la granulation entraîne un changement dans la densité spécifique des matières premières et des aliments par l'ajout de micropores au sein de la matière première qui entraîne la séquestration de bulles d'air et donc une diminution de la densité spécifique. Cet aspect de diminution de la densité spécifique des matières premières voire des aliments au cours des différents processus industriels qu'elles peuvent être amenées à subir serait intéressant à développer. En effet, les résultats obtenus avec les particules de plastique montrent que le TMS des particules est le plus faible pour une densité comprise entre 1,1 et 1,3. Si ces processus industriels entraînent une diminution de la densité spécifique, une matière première dont la densité spécifique initiale se situerait dans la gamme optimale de densité spécifique (entre 1,1 et 1,3) et donc avec a priori un TMS dans le rumen court pourrait avoir après application d'un de ces processus industriels une densité spécifique hors de cette gamme et donc avec une probabilité de sortie faible.

Tableau 9.3. Densité spécifique de différentes matières premières réalisées à partir de la méthode du pycnomètre

Aliment	Densité spécifique
Tourteau feed d'extraction de colza	1,28
Tourteau feed d'extraction de soja	1,22
Tourteau de pression de lin	1,25
Tourteau de pression de palmiste	1,36
Tourteau feed d'extraction de tournesol décortiqué	1,20
Tourteau feed d'extraction de tournesol	1,11

Au vu de l'importance de la densité sur le TMS des particules dans le rumen, nous avons cherché à savoir qu'elles étaient les possibilités de variation de la densité spécifique des aliments. La densité spécifique des matières premières peut probablement être réalisée par processus industriels (voir ci-dessus). Nous avons cherché à augmenter la densité spécifique du tourteau de soja en y ajoutant trois minéraux de densités différentes et plus élevée que celle du tourteau (1% sur la composition total) : du carbonate de chaux (CaCO_3) de densité 2,61, du talc de densité 2,16 et de la bentonite de densité 2,41. Ces minéraux ont aussi été choisis pour leur éventuel intérêt dans l'alimentation des vaches laitières (apport de calcium pour le carbonate). Il s'avère qu'au doses utilisées, ce mélange n'a pas permis d'accroître la densité spécifique du tourteau de soja (Tableau 9.4). Il paraît donc difficile d'augmenter la densité spécifique des matières premières dans la dose utilisée. Des doses plus élevées auraient pu avoir un effet décelable mais cette augmentation de la part de minéral pourrait également entraîner une dénaturation de la valeur nutritionnelle de tourteau de base.

Tableau 9.4. Effet de l'ajout de minéral sur la densité spécifique du tourteau de soja mesurée avec la méthode du pycnomètre

	Tourteau feed d'extraction de soja			
	Sans minéral	CaCO_3	Talc	Bentonite
Densité spécifique	1,30	1,32	1,30	1,31

La taille et la densité spécifique des particules alimentaires sont des paramètres influençant le TMS dans le rumen qui peuvent amener à des variations en terme de valeur PDIA des aliments. Encore peu pris en compte dans les contraintes des processus industriels, il faudra veiller à ce que des techniques de protection ne voient pas leur efficacité altérée par une perte de densité qui amènerait à un TMS fortement réduit qui conduirait la particule à être finalement très dégradée, même si cela a lieu plus lentement. Cependant, les résultats obtenus dans le cadre de ce travail de thèse concernent uniquement des particules plastique et ils restent à les démontrer sur les particules alimentaires. L'étude de la taille ou du broyage avec granulométrie d'une part et l'impact des processus industriels sur la densité spécifique d'autre part sont notamment des points à investiguer plus en avant. A terme, une synergie entre des caractéristiques physiques des particules et un procédé visant à réduire la dégradabilité des protéines dans le rumen pourrait permettre une augmentation des PDIA des aliments. Une telle combinaison nécessitera d'utilisation d'une méthode pour estimer son efficacité.

9.2. Estimer la valeur protéique des aliments à partir des réponses biologiques des animaux

Le travail sur les caractéristiques des particules montre que la valeur notamment protéique des aliments peut être modifiée par des effets très systémiques de la digestion dans le rumen, ce qui pose de nombreuses questions sur l'estimation de la valeur réelle des aliments soumis à différents traitements technologiques. En outre l'utilisation d'additifs alimentaires tels que des extraits végétaux (huiles essentielles ou tannins végétaux) peuvent aussi modifier la valeur protéique des rations mais nous ne disposons pas de méthode d'évaluation de leurs effets en dehors de l'utilisation d'animaux fistulés. L'objectif de la deuxième partie de ce travail de thèse a donc visé à mettre au point une nouvelle méthodologie d'estimation de la valeur protéique des aliments (PDI) à partir de réponses biologiques des animaux recevant des rations avec des aliments dont les valeurs sont à déterminer comparativement à des rations témoins connues. Deux types de réponses biologiques ont été comparées : les modifications des concentrations en AA plasmatiques (Chapitre 7) et celles de sécrétion des matières protéiques du lait (Chapitre 8). Pour cela, quatre régimes alimentaires ont été distribués aux animaux : deux régimes contrôles de valeur protéique connue (CB : **Contrôle Bas** et CH : **Contrôle Haut**) ont été utilisés pour estimer la valeur protéique de deux régimes intermédiaire (MB : **Médium Bas** et MH : **Medium Haut**). Ces mêmes régimes ont également été utilisés dans le cadre de la

méthode *in vivo* de mesure de flux AA duodénaux servant de référence (Chapitre 6). Ce double essai a permis de mettre en évidence un certain nombre d'avantages et d'inconvénients de ces deux méthodes qui sont présentés ci-dessous ainsi que ceux liés à l'utilisation de la réponse des AA plasmatique ou des matières protéiques du lait. Enfin, au regard de l'analyse de ces différents points, diverses applications de la nouvelle méthodologie pour estimer la valeur protéique des aliments sont proposées.

9.2.1. Comparaison de la méthode *in vivo* et des méthodes basées sur les réponses biologiques des animaux pour estimer la valeur protéique des aliments

L'estimation réalisée par la méthode *in vivo* de mesure des flux totaux d'AA (Figure 9.4) au duodénum et par les méthodes basées sur les réponses biologiques mise en place (Tableau 9.5) donne toutes les deux des valeurs estimées cohérentes avec l'apport croissant en PDI des régimes alimentaires comparée à celle prédite par le système d'alimentation INRA (2007). Exprimées en relatif du traitement CB, les estimations des traitements MB, MH et CH diffèrent en moyenne de 9 g PDIE/kg MS avec la méthode *in vivo* (Figure 9.4).

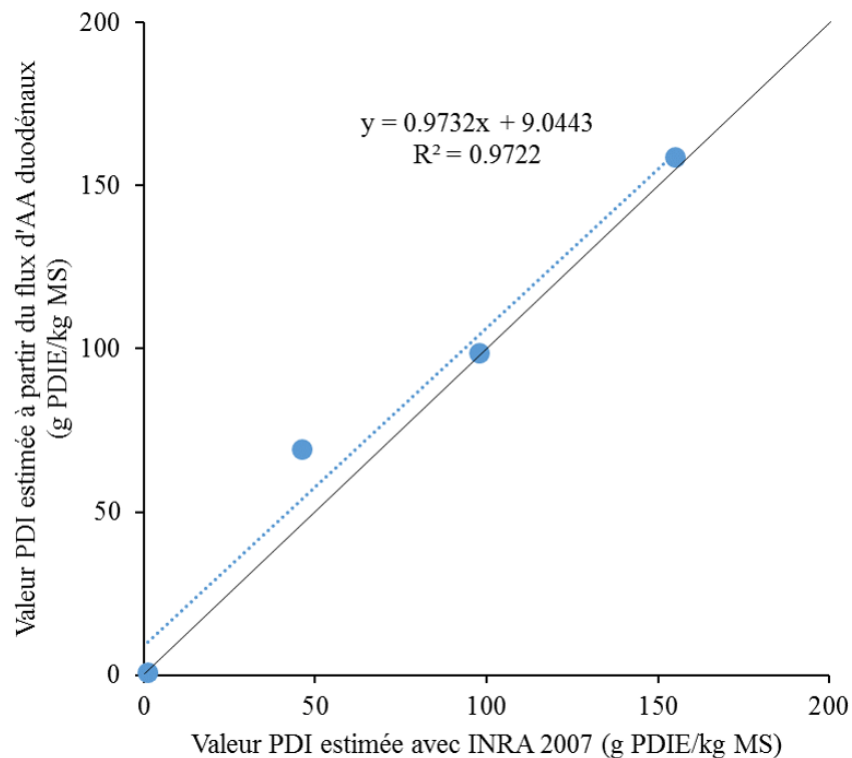


Figure 9.4. Comparaison de la valeur PDI estimée à partir du flux d'AA duodénaux avec celle prédite par le système d'alimentation INRA (2007) et leur équation de tendance. Les valeurs PDI des traitements sont exprimés en relatif du traitement Contrôle Bas. La ligne noire correspond à la droite $y = x$.

Tableau 9.5. Estimation de la valeur protéique pour les traitements intermédiaires¹ à partir de différentes réponses biologiques : AA plasmatique et matières protéiques du lait (AA : Acides Aminés ; MP : Matière Protéique du lait) en comparaison à celles prédite par le système d'alimentation INRA (2007)

Traitements ¹	Valeur prédite ² , g PDIE/kg MS	Valeur estimée, g PDIE/kg MS						
		MP	3AA ³	Gly	Val	His	Groupe 1 ⁴	Groupe 2 ⁵
ML	151	165	155	146	138	181	149	131
MH	204	221	212	217	189	233	207	165

¹ Les traitements alimentaires sont définis par leur niveau de protéines: CB, MB, MH et CH du plus bas au plus élevé (CB : Contrôle Bas ; MB : Médium Bas ; MH : Médium Haut ; CH : Contrôle Haut)

² Valeur protéique prédite par le système d'alimentation (INRA, 2007)

³ 3AA = Combinaison linéaire des trois concentrations AA plasmatiques pondéré de leur amplitude de réponse ($4 \cdot \text{His} + 2 \cdot \text{Val} - \text{Gly}$)

⁴ Somme de His, Met, Phe et Tyr

⁵ Somme d'Ile, Leu, Lys et Val

Les biais de prédiction des traitements intermédiaires (MB et MH) observées à partir des réponses biologiques établies avec les traitements contrôles (CB et CH) sont variables (Tableau 9.5). Les réponses des matières protéiques du lait, de Gly, de Val, du Groupe 1 et de la relation linéaire 3AA permettent une estimation de la valeur PDI de MB et MH à moins 17 g PDIE/kg MS de différence avec INRA (2007). La réponse à partir du Groupe 1 étant celle qui permet l'estimation la plus proche de celle prédite avec le système INRA (-2 et 4 g PDIE/kg MS pour MB et MH respectivement). En revanche, les réponses d'His et du Groupe 2 donnent des estimations qui diffèrent de ± 30 g PDIE/kg MS en moyenne par rapport à INRA (2007).

Les méthodes *in vivo* et celles basées sur les réponses biologiques (AA plasmatiques ou matières protéiques du lait) sont intéressantes parce qu'elles permettent de prendre en compte l'ensemble des phénomènes intervenant dans le rumen et donc d'obtenir une valeur protéique des aliments et des rations testées intégrant l'ensemble des phénomènes digestifs, ce qui n'est pas le cas des méthodes faisant appel à des test *in vitro* ou de la méthode des sachets *in situ*. La méthode basée sur les réponses biologiques va même plus loin puisqu'elle intègre également la digestion, l'absorption intestinale des protéines et leur utilisation dans les différents organes de l'animal pour couvrir ses besoins. La mesure est réellement systémique au niveau de l'animal. Elle permet aussi de s'affranchir des différentes hypothèses nécessaires au calcul de la

digestibilité des protéines pour la méthode *in vivo* telles que la digestibilité des aliments ou l'estimation de la quantité de protéines endogènes duodénales.

Les deux méthodes basées sur les réponses biologiques possèdent l'avantage de pouvoir impliquer un nombre important d'animaux (24 dans notre essai) ce qui confère une puissance statistique dans les résultats qui ne peut pas être obtenue avec la méthode *in vivo* où l'effectif est généralement faible (4 vaches dans notre essai, rarement plus de 8 animaux dans la littérature) et donc soumis à une variabilité plus forte des résultats malgré la prise en compte des effets individuels moyens par des schémas expérimentaux adaptés (carré latin en ce qui nous concerne). Néanmoins, le nombre important d'animaux impliqué avec la méthode basée sur les réponses biologiques implique d'avoir à disposition des installations qui permettent de distribuer et de mesurer les quantités ingérées individuellement par animal et le coût de la mesure s'accroît aussi avec le nombre d'animaux. Par ailleurs, les méthodes basées sur les réponses biologiques ne nécessitent pas de mesures invasives sur les animaux à l'exception d'une prise de sang à la queue par période si la réponse des AA plasmatiques est souhaitée ce qui permet de s'affranchir de l'utilisation d'animaux fistulés. Ceci est en adéquation avec l'attente sociétale d'améliorer le bien-être animal y compris dans la recherche fondamentale remettant en cause l'utilisation d'animaux fistulés dans la compréhension des mécanismes digestifs en nutrition.

En revanche, la méthode *in vivo* permet en plus de l'estimation de la valeur PDI des aliments d'identifier les différentes modifications ayant lieu dans le rumen ou dans les intestins lors de l'ingestion de l'aliment ou de rations dont on cherche à déterminer la valeur PDI. Cela est intéressant notamment lorsque l'évaluation fait appel à l'ajout de substances dont on ne connaît pas précisément le mode de fonctionnement *in vivo* ou ayant des effets systémiques dans le rumen, tel l'ajout d'extraits végétaux. Cette méthode nécessite un nombre de prélèvements et de mesures conséquent ce qui ne va pas sans une expérimentation lourde à mettre en place tant au niveau de la gestion des prélèvements et des échantillons nécessitant un temps de personnel important. De plus, cette méthode est dépendante de l'usage de marqueurs soit pour la mesure du flux duodéal soit pour la mesure du flux microbien (Broderick et Merchen, 1992; Dewhurst et al., 2000; Firkins et al., 2006). Notre essai (Exp 3a) surestime probablement de 10% le flux duodéal, si l'on s'en réfère aux écarts de flux des constituants pariétaux, et notamment de l'ADL, entre le duodénum et les fèces, ce qui rappelle les limites des mesures de flux avec des marqueurs. De plus le flux d'azote microbien n'est pas totalement en cohérence de ce qui était attendu par rapport à la synthèse microbienne au vu des régimes alimentaires distribués. La

mesure du flux microbien est un des points faibles de cette méthode (Broderick et Merchen, 1992; Dewhurst et al., 2000; Firkins et al., 2006) et de nombreux marqueurs existent. L'acide diaminopimelique (DAPA) a été choisi dans le cadre de cet essai puisque sa mesure pouvait être mise en place et améliorée (voir Chapitre 5) par dosage en chromatographie liquide à haute pression couplé à un détecteur de masse. Bien que la méthode mise en place ait été validée en externe, la précision de la mesure n'a pas empêché les variations dans l'estimation du flux microbien. Les résultats obtenus avec la méthode *in vivo* sont donc assez peu précis en valeur absolue, parce que trop dépendants de l'usage de ces différents marqueurs et de leur incertitude de prélèvement et de mesure qui rajoutent des biais potentiels. En revanche, la multitude des prélèvements permet l'obtention de mesures autres que celles relatives aux protéines et permet éventuellement de quantifier des effets potentiels sur les autres paramètres de la digestion (énergie, fermentations ruminales) qui ne peuvent pas être obtenues par la méthode basée sur les réponses biologiques.

La difficulté principale de la méthode basée sur les réponses biologiques réside dans la formulation des régimes. Il faut en effet veiller à deux contraintes fortes, la première est de ne faire varier dans la mesure du possible que les apports protéiques et la seconde à trouver des niveaux d'apports (apports totaux, équilibres énergie – protéines) qui font que les apports pour chaque animal se situe dans une zone où la réponse biologique est maximale. En effet, pour pouvoir quantifier uniquement une réponse liée à l'apport de PDI, il est nécessaire que les régimes soient isoénergétiques et couvrent les besoins en azote dégradable des micro-organismes. L'aspect isoénergétique des régimes est notamment important puisqu'il est connu que les apports énergétiques influence la réponse des matières protéiques du lait (Brun-Lafleur et al., 2010; Daniel et al., 2016). Ainsi si les régimes n'apportent pas la même quantité d'énergie, la réponse observée correspondra à la fois aux variations en protéine apportées par le traitement alimentaire dont la valeur PDI est inconnue mais également aux variations liées à un apport énergétique différent. La valeur PDI ainsi estimée intégrera donc ces deux effets. Cet aspect isoénergétique des régimes peut notamment poser problème pour les régimes à faible teneur en azote. En effet, l'augmentation de quantité de protéines apportée dans la ration a un effet positif sur l'ingestion des animaux (Faverdin et al., 2003). Ainsi, pour les régimes à faible teneur en azote, l'ingestion des animaux se trouve réduite par rapport à des régimes à forte teneur en azote ce qui amène les animaux à ne pas consommer l'intégralité de leur ration, même en situation de légère restriction alimentaire pour contrôler les apports, et donc les régimes n'apportent plus la même quantité d'énergie. Cela a été le cas dans les deux essais menés où un

différentiel de 1,1 et 0,5 UFL/j (Exp 3a et Exp 3b respectivement) entre les deux traitements alimentaires contrôles a été trouvé ce qui laisse supposer que l'estimation faite à partir de la réponse des matières protéiques du lait sur l'Exp 3b peut être biaisée liée à la faible augmentation en énergie entre les traitements contrôles. L'apport suffisant en azote dégradable est également important pour éviter toutes variations liées à la synthèse en protéines microbiennes qui influenceraient les réponses biologiques notamment les celles des AA plasmatiques (Martineau et al., 2017).

Les différents avantages et inconvénients détaillés ci-dessus de la méthode *in vivo* et celle basée sur les réponses biologiques sont synthétisés dans le Tableau 9.6. Ainsi, les nouvelles méthodes basées sur la réponse biologique des animaux permettent une estimation de la valeur protéique des aliments proche de celle prédite par le système d'alimentation INRA (2007) qui permet de prendre en compte l'intégralité des phénomènes liés à la digestion des protéines (digestion et absorption). Par rapport à la méthode *in vivo*, elles nécessitent pas de mesures invasives et ne reposent finalement que sur un simple essai d'alimentation et ne nécessite pas d'animaux opérés, ce qui permet d'accroître facilement la puissance expérimentale en utilisant plus d'animaux. En revanche, ces méthodes demandent une très bonne maîtrise de l'alimentation des animaux qui doit passer par une distribution et une mesure précise des quantités individuelles distribuées et ingérées. Pour y parvenir facilement, il est nécessaire de disposer d'installations équipées d'outils de distribution précis et individualisés (DAC ou automates de constitution de rations individuelles), ainsi qu'une formulation précise des régimes alimentaires pour limiter les variations liées aux apports énergétiques et à la synthèse microbienne.

Tableau 9.6. Avantages et inconvénients de l'estimation de la valeur protéique des aliments à partir de la méthode de référence *in vivo* et des réponses biologiques (PDI : Protéines Digestible dans l'Intestin)

Méthode	Avantages	Inconvénients
<i>In vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Estimation de la valeur protéique cohérente avec l'apport croissant en PDI - Représentative de la digestion ruminale et duodénale - Possibilité de connaître les modes d'action sur différents paramètres digestifs de l'aliment testé 	<ul style="list-style-type: none"> - Hypothèses de calcul autour de la digestibilité des protéines - Expérimentation lourde et coûteuse en main d'œuvre - Nombre d'animaux généralement plus faible ; animaux ayant été opérés avec une fistule au niveau du rumen et du duodénum. - Méthode peu précise lié à l'utilisation de marqueurs
Réponses biologiques	<ul style="list-style-type: none"> - Estimation de la valeur protéique cohérente avec l'apport croissant en PDI - Représentative de la digestion et de l'utilisation des protéines par l'animal - Puissance statistique lié au nombre d'animaux - Pas de mesures invasives 	<ul style="list-style-type: none"> - Estimation de la valeur PDI variable en fonction des réponses considérées - Distribution de nombreuses rations différentes et mesure des quantités ingérées individuelles quotidiennes - Nécessite une formulation précise pour limiter les variations des réponses (énergie et synthèse microbienne)

9.2.2. Avantages et inconvénients de la réponse des AA plasmatiques et des matières protéiques du lait

Pour imaginer une réponse physiologique des AA au niveau plasmatique, il faut faire l'hypothèse qu'il existe une relation entre les flux d'AA au niveau du duodénum et les concentrations plasmatiques de ces AA. Cette relation existe pour certains AA et a d'ailleurs été proposée comme méthode pour évaluer certaines protections des AA (Rulquin et Kowalczyk, 2003). Cependant, les concentrations en AA dans le plasma sont le résultat complexe de leur absorption et de leur utilisation dans le métabolisme. Il n'est donc pas étonnant de voir que tous les AA n'aient pas une concentration plasmatique directement fonction des flux d'AA. Les flux d'AA observés dans l'essai digestion peuvent être comparés aux concentrations d'AA plasmatiques (moyennes journalières) pour voir comment ces relations existent pour les différents AA (Figure 9.5). Certains AA ne voient pas leur concentration augmenter avec les apports comme la Glu par exemple, alors que les AA ramifiés ou l'His ont des concentrations qui tendent à augmenter linéairement ou curviléairement avec le flux duodéal de cet AA. La glycine semble avoir un comportement atypique puisque sa concentration tend à baisser quand le flux augmente.

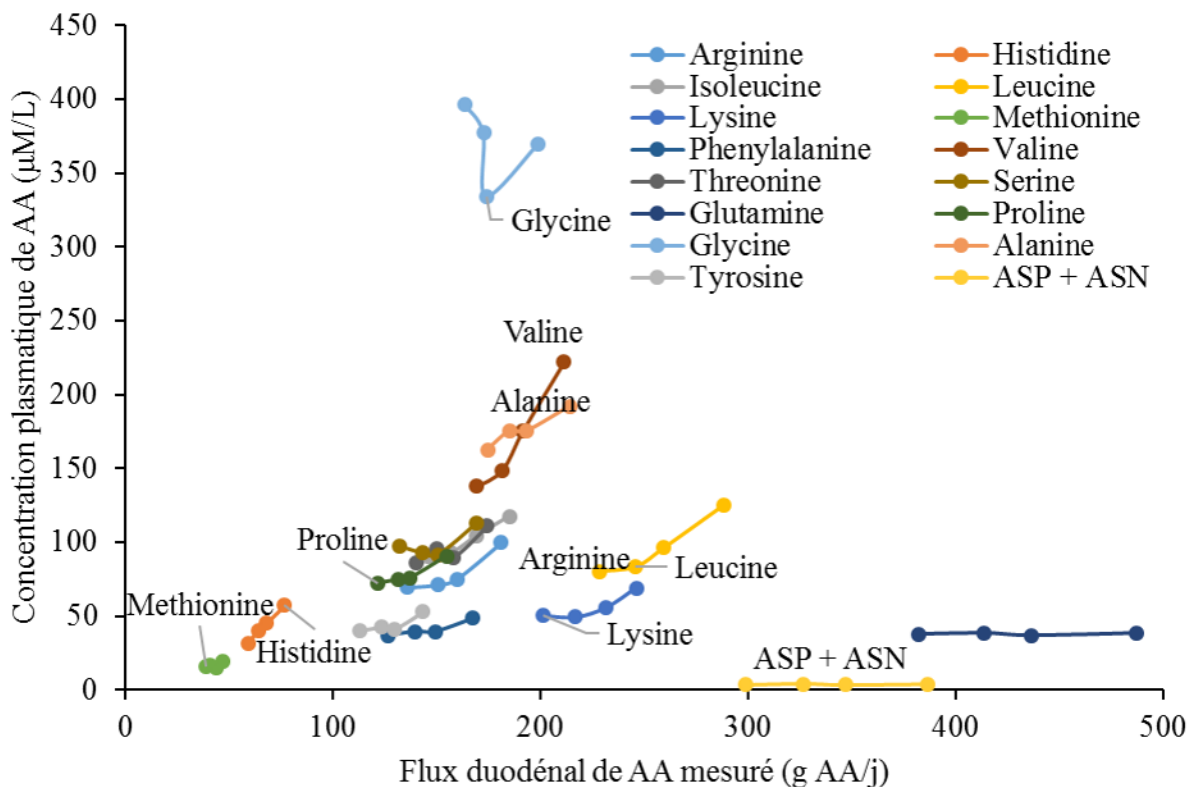


Figure 9.5 : Relation entre les flux duodénaux d'AA et leur concentration plasmatique (Essai 3a)

Il n'est donc clairement pas possible d'utiliser tous les AA pour estimer l'augmentation des apports duodénaux. Il est même possible que ces relations observées dans l'essai 3b puissent varier avec un autre régime ou avec des animaux ayant des besoins différents. Ce résultat montre l'importance du choix des AA et le rôle central des traitements contrôles pour établir cette relation si l'on envisage de prédire les flux PDI à partir des concentrations plasmatiques. Patton et al. (2015) ont également observés des relations différentes entre la concentration en AA plasmatiques et leur flux au duodénum par méta-analyse. Ils ont mis en évidence une relation linéaire entre ces deux paramètres pour His, Leu et Phe. Les autres AA essentiels ont une relation curvilinéaire. Martineau et al. (2019) observent une relation linéaire entre la concentration plasmatiques et le flux d'AADI uniquement pour Arg et Phe, tous les autres AA essentiels ayant une réponse curvilinéaire notamment pour les flux duodénaux élevés. Les plages de variations des apports en AA dans le cadre de ces études est plus large que celui appliqué dans l'Exp 3b ce qui peut expliquer les réponses linéaires dans cet essai

Les deux méthodes biologiques testées (AA plasmatiques et matières protéiques du lait) donnent toutes les deux des estimations de valeur PDI des régimes MB et MH relativement peu biaisées par comparaison au système d'alimentation INRA (2007) et du même ordre de grandeur (moins de 17 g PDIE/kg MS de différence). Les résultats obtenus tendraient à penser que la réponse des AA plasmatiques serait à préférer car donnant une estimation plus proche de la valeur PDI prédite notamment lorsque les AA sont regroupés (Groupe 1 et relation linéaire 3AA). Cependant, ces conclusions nécessitent d'être confirmées par d'autres essais incluant notamment différentes sources protéiques avec des compositions en AA différentes. Cette précision plus grande des AA plasmatiques peut venir du fait que la relation entre les apports en PDI et la concentration plasmatique des différents AA est linéaire à l'inverse de celle des matières protéiques du lait qui est curvilinéaire et nécessite donc de passer par la relation de l'efficacité protéique.

Cependant, comme déjà été mentionné dans le Chapitre 7 ces relations linéaires sont probablement dépendantes de la source protéique utilisée et sont donc uniquement valable intra-aliment et/ou intra-régime. Le niveau d'apport en AA des régimes alimentaires appliqués dans le cadre de la méthode en terme d'amplitude et de niveau d'apport pourrait être un point important à maîtriser pour l'obtention une relation linéaire des AA plasmatiques utilisable. Par ailleurs, utiliser la réponse des AA plasmatiques permet de connaître les effets de l'aliment testé sur les différents AA plasmatiques notamment les AA potentiellement limitant comme la Met

dans l'Exp 3b. A l'inverse, la réponse des matières protéiques du lait donne une information globale des PDI.

L'aspect curvilinéaire de la réponse des matières protéiques du lait est une limite de cette méthode puisque le Chapitre 8 a montré que la précision de l'estimation de la valeur PDI du traitement MB était dépendante de la valeur du traitement pris comme CH autrement dit du rendement en protéines. Cette méthode est aussi sensible aux variations liées aux apports énergétiques notamment pour les régimes à faible teneur en azote. Il faut donc travailler sur une plage de variation des apports PDI limités par le bas par une ingestion réduite et par le haut par un rendement faible des protéines. Cette méthode nécessite donc une formulation des régimes alimentaires extrêmement précise pour se situer juste dans la zone de variation des matières protéiques où ni les apports d'énergie ni le rendement en protéines interviennent.

La méthode basée sur la synthèse des protéines laitières est sans doute plus facilement utilisable car elle ne nécessite pas de mesure invasive (pas de prises de sang), ni d'analyses d'AA qui sont souvent coûteuses et nécessitent une grande précision dans les dosages pour éviter toute confusion entre les AA. La méthode employée dans le cadre de ce travail de thèse est celle développée par Haque et al. (2012) où la répétabilité et la reproductibilité ont été démontrées mais d'autres techniques d'analyses sont moins précises (Sophie Lemosquet, UMR PEGASE, communication personnelle). La méthode basée sur les synthèses protéiques est aussi peut-être plus facilement généralisable car moins dépendante de la composition en AA des sources à tester, comme nous le discutons dans la prochaine partie.

Au final, la méthode basée sur les matières protéiques du lait est sans doute plus facilement généralisable car moins dépendante de la composition en AA des sources à tester et pourrait être préférée même si dans notre essai, elle ne conduit pas au biais d'estimation le plus faible. Le tableau 9.7 résume l'ensemble des avantages et limites des deux méthodes basées sur les réponses animales telles qu'elles viennent d'être discutées.

Tableau 9.7. Avantages et inconvénients de l'estimation de la valeur protéique des aliments à partir de la réponse en AA plasmatique ou en matières protéiques du lait (AA : Acides Aminés)

Réponse	Avantages	Inconvénients
biologique		
AA plasmatiques	- Réponse linéaire - Connaissance des réponses individuelles des AA	- Réponses dépendante de la source protéique utilisée - Nécessite une méthode de dosage précise des AA plasmatiques
Matières protéiques du lait	- Pas de mesures invasives	- Réponse non linéaire ; dépendante du rendement en protéines

9.2.3. Application de la méthode pour estimer l'efficacité des additifs ou processus industriels visant à réduire la dégradabilité des aliments dans le rumen

La méthode d'estimation de la valeur protéique des aliments à partir de la réponse biologique des animaux a été mise en place dans l'objectif de proposer une nouvelle méthode permettant de s'affranchir des animaux fistulés et permettant une évaluation des nouveaux procédés développés par l'industrie visant à réduire la dégradabilité des aliments dans le rumen. Parmi ces procédés, les extraits végétaux (huiles essentielles, tannins) ont montré des effets positifs sur la limitation de la dégradation des protéines dans le rumen par les micro-organismes bien que les résultats *in vivo* n'ont pas toujours été concluants (Benchaar et al., 2008; Hart et al., 2008; Patra, 2011), liés en partie à l'absence de méthode précise pour estimer ces effets (Jouany et Reperant, 2007). Dans le cadre de la réduction de la dégradabilité des protéines, ces additifs d'extraits végétaux ne peuvent pas être évalués par les méthodes classiquement utilisées (dégradabilité *in vitro* ou méthode des sachets) puisque leur action ne se cantonne plus à l'aliment à protéger mais agit dans tout le métabolisme du rumen. Ainsi la méthode développée dans le cadre de ce travail de thèse pourrait permettre de quantifier l'effet sur les PDI de ces différents additifs de façon précise sans avoir recours à la méthode *in vivo* dont les différents inconvénients ont déjà été soulignés. Néanmoins, ces produits peuvent avoir d'autres effets digestifs associés n'affectant pas que les flux PDI et l'interprétation des résultats devra veiller à intégrer ces limites, même si en pratique cela permettrait une quantification aujourd'hui

difficile. De la même façon, les travaux menés autour de la taille et de la densité spécifique des particules alimentaires pour moduler le TMS dans le rumen, éventuellement combiné à un processus industriel réduisant la dégradabilité des protéines, pourraient être évalués par le biais de cette méthode avec encore plus de pertinence car les effets associés sur le reste de la ration sont sans doute limités.

9.3. Références

- Benchaar C, Calsamiglia S, Chaves AV, Fraser GR, Colombatto D, McAllister TA and Beauchemin KA 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology* 145, 209–228.
- Bhatti SA and Firkins JL 1995. Kinetics of hydration and functional specific gravity of fibrous feed by-products. *Journal of animal science* 73, 1449–1458.
- Broderick GA and Merchen NR 1992. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. *Journal of Dairy Science* 75, 2618–2632.
- Brun-Lafleur L, Delaby L, Husson F and Faverdin P 2010. Predicting energy × protein interaction on milk yield and milk composition in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93, 4128–4143.
- Daniel JB, Friggens NC, Chapoutot P, Van Laar H and Sauvant D 2016. Milk yield and milk composition responses to change in predicted net energy and metabolizable protein: a meta-analysis. *animal* 10, 1975–1985.
- Dewhurst RJ, Davies DR and Merry RJ 2000. Microbial protein supply from the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 85, 1–21.
- Faichney GJ 1993. Marker methods for measuring digesta flow. *British Journal of Nutrition* 70, 663–664.
- Faverdin P, M’hamed D and Vérité R 2003. Effects of metabolizable protein on intake and milk production of dairy cows independent of effects on ruminal digestion. *Animal Science* 76, 137–146.
- Firkins JL, Hristov AN, Hall MB, Varga GA and St-Pierre NR 2006. Integration of ruminal metabolism in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 89, E31–E51.
- Haque MN, Rulquin H, Andrade A, Faverdin P, Peyraud JL and Lemosquet S 2012. Milk protein synthesis in response to the provision of an “ideal” amino acid profile at 2 levels of metabolizable protein supply in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95, 5876–5887.
- Hart KJ, Yáñez-Ruiz DR, Duval SM, McEwan NR and Newbold CJ 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology* 147, 8–35.
- INRA 2007. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux - Valeurs des aliments. Editions Quae, Versailles (FRA).
- INRA 2018. INRA feeding system for ruminants. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.

- Jouany J-P et Reperant J-M 2007. Proposition pour une démarche d'évaluation de substances ou de produits 'nouveaux' destinés à l'alimentation animale - Cas particulier des substances et produits à base de plantes. Agence française de sécurité sanitaire des aliments, Maisons-Alfort.
- Martineau R, Ouellet DR, Kebreab E, White RR and Lapierre H 2017. Relationships between postprandial casein infusion and milk production, and concentrations of plasma amino acids and blood urea in dairy cows: A multilevel mixed-effects meta-analysis. *Journal of Dairy Science* 100, 8053–8071.
- Martineau R, Ouellet DR, Patton RA, White RR and Lapierre H 2019. Plasma essential amino acid concentrations in response to casein infusion or ration change in dairy cows: A multilevel, mixed-effects meta-analysis. *Journal of Dairy Science* 102, 1312–1329.
- Michalet-Doreau B and Cerneau P 1991. Influence of foodstuff particle size on in situ degradation of nitrogen in the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 35, 69–81.
- Michalet-Doreau B, Vérité R et Chapoutot P 1987. Méthodologie de la mesure in sacco de l'azote des aliments dans le rumen. *Bulletin techniques INRA*, 5–7.
- Patra AK 2011. Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 6, 416–428.
- Patton RA, Hristov AN, Parys C and Lapierre H 2015. Relationships between circulating plasma concentrations and duodenal flows of essential amino acids in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 98, 4707–4734.
- Rulquin H and Kowalczyk J 2003. Development of a method for measuring lysine and methionine bioavailability in rumen-protected products for cattle. *Journal of Animal and Feed Sciences* 12, 465–474.
- Warner D 2013. Passage of feed in dairy cows - Use of stable isotopes to estimate passage kinetics through the digestive tract of dairy cows. Wageningen University, Wageningen, 165pp.

Conclusion générale

Les objectifs de ce travail de thèse étaient d'une part d'étudier si les caractéristiques physiques des particules telles que la taille et la densité spécifique pouvaient influencer le temps moyen de séjour dans le rumen de façon à augmenter la quantité de protéines digestible d'origine alimentaire au duodénum et d'autre part de déterminer si les réponses biologiques des animaux (**Acides Aminés** (AA) plasmatiques ou matières protéiques du lait) aux protéines métabolisables pouvaient être utilisées comme nouvelle méthode d'estimation de la valeur protéique des aliments.

Pour répondre au premier objectif de cette thèse portant sur l'influence de la taille et de la densité spécifique sur le TMS dans le rumen, un premier essai a été mis en place permettant le suivi en cinétique fécal de particules de plastique de quatre tailles et quatre densités chez quatre vaches laitières. Les résultats montrent un optimal de densité compris en 1,1 et 1,3 qui permet un TMS dans le rumen plus court que les deux autres densités testées (0,9 et 1,5) et cela quel que soit la taille des particules. Cet essai a également permis de mettre en évidence une interaction entre la taille et la densité des particules de plastique pour les tranches de densité en-dehors de la gamme 1,1 et 1,3. Ainsi, les caractéristiques physiques des particules de plastique ont un impact sur le temps moyen de séjour dans le rumen. Un deuxième essai a été réalisé dans le but de tester la réponse des performances laitières des animaux à deux présentations différentes d'un même aliment. Un tourteau de soja distribué sous forme brute ou sous forme de granulés a été distribué à 24 vaches laitières. Les résultats n'ont pas permis de mettre en évidence un effet quelconque de la forme de présentation sur les performances laitières mais ils ont permis une réflexion autour de l'effet du broyage avant granulation sur le délitement des granulés dans le rumen. Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes à la fois sur une éventuelle intégration des aspects dynamiques des particules dans le calcul de la dégradabilité théorique des systèmes d'alimentation ainsi qu'au niveau de leur application dans les processus de fabrication des aliments pour les animaux d'élevage.

La mise en place d'une nouvelle méthodologie pour estimer la valeur protéique des aliments correspondant à la deuxième partie de ce travail a été réalisé à partir de deux essais recevant les mêmes régimes alimentaires : deux régimes contrôles de valeur protéiques connus servant à déterminer la valeur protéique des deux régimes intermédiaires supposée inconnue. Le premier essai a été effectué sur quatre vaches fistulées au rumen et au duodénum ce qui a permis la mesure des flux totaux d'AA duodénaux, correspondant à la méthode *in vivo* de référence. Le deuxième essai incluait 24 vaches laitières et visait à tester les réponses des AA plasmatiques

et des matières protéiques du lait comme base à la nouvelle méthodologie. L'estimation de la valeur protéique des aliments, en relatif des régimes contrôlés, a été précise par rapport à la valeur prédite par le système d'alimentation INRA (2007) pour toutes les méthodes. La méthode basée sur les réponses biologiques permet d'impliquer plus d'animaux dans l'essai et ne nécessite pas de mesures invasives en comparaison à la méthode *in vivo*. Cependant, elle implique d'avoir accès à des installations équipées permettant de distribuer de nombreuses rations en parallèle et de mesurer les quantités ingérées des animaux individuellement. La réponse des matières protéiques du lait semble être préférable par rapport à celle des AA plasmatiques : la réponse des matières protéiques du lait aux apports est mieux connue de même que ses facteurs de variations. Elle est notamment moins dépendante de la source azotée utilisée dans la méthode.

Annexes

Communications écrites

Dufreneix F., Peyraud J.-L. et Faverdin P. 2018. Estimation d'une nouvelle méthodologie pour estimer la valeur protéique des aliments à partir de la réponse en matière protéique du lait chez la vache laitière. 25^{ème} Rencontres Recherches Ruminants, 05-06/12/2018, Paris, France

Communications orales

Dufreneix F., Faverdin P. et Peyraud J.-L. 2018. Size and density influence of concentrates to increase by-pass protein fraction in dairy cows' diet. 69th EAAP annual meeting, 24-28/09/2018, Dubrovnick, Croatia.

Dufreneix F., Peyraud J.-L. et Faverdin P. 2018. A new methodology to estimate protein feed value using the milk protein biological response. 69th EAAP annual meeting, 24-28/09/2018, Dubrovnick, Croatia.

Dufreneix F., Peyraud J.-L. et Faverdin P. 2018. Estimation d'une nouvelle méthodologie pour estimer la valeur protéique des aliments à partir de la réponse en matière protéique du lait chez la vache laitière. 25^{ème} Rencontres Recherches Ruminants, 05-06/12/2018, Paris, France

Poster

Dufreneix F., Faverdin P. et Peyraud J.-L. 2018. Effet de la taille et de la densité de particules de plastique sur leur vitesse de transit dans le rumen. Les rencontres SOS Protein, 09/07/2018, Nantes, France.

Estimation d'une nouvelle méthodologie pour estimer la valeur protéique des aliments à partir de la réponse en matière protéique du lait chez la vache laitière

DUFRENEIX F. (1,2), PEYRAUD J.L. (1), FAVERDIN P. (1)

(1) PEGASE, Agrocampus Ouest, INRA, 35590 Saint Gilles, France

(2) AGRIAL, 4 rue des Roquemonts, 14000 Caen, France

RESUME – L'objectif de cet essai est de tester une nouvelle méthodologie pour estimer la valeur protéique des aliments basée sur la réponse biologique des matières protéiques (MP) du lait aux apports en protéines métabolisables de la ration. Par rapport aux méthodes classiques, cette méthode peut être appliquée quelle que soit les techniques de protection des protéines appliquées aux aliments (huiles essentielles, tannins végétaux). La prédiction de la valeur protéique d'un aliment testé est réalisée à partir de sa réponse en MP en considérant deux traitements contrôles de valeur protéique connue. Cette réponse n'est pas linéaire du fait que l'efficacité d'utilisation des protéines métabolisables décroît lorsque les apports augmentent. Nous avons supposé que, dans la zone de variation des apports testée, la décroissance de l'efficacité est linéaire. Pour développer la méthode, quatre traitements alimentaires isoénergétiques, définis par leurs apports protéiques croissants, ont été appliqués en carré latin pendant quatre périodes de trois semaines à 24 vaches laitières divisées en 6 groupes homogènes de 4 vaches. Les deux traitements contrôles contiennent soit 4,4 kg MS de concentré énergétique (Contrôle Bas (CB), 97 g PDIE/kg MS), soit 3,6 kg MS de tourteaux de soja (Contrôle Haut (CH), 252 g PDIE/kg MS). Les deux traitements intermédiaires, constitués d'un mélange de ces deux aliments (Medium Bas : MB et Medium Haut : MH), ont été utilisés pour estimer leur valeur en protéines métabolisables à partir de leur réponse en MP. L'accroissement des apports de protéines métabolisables a augmenté la production de MP (896 et 964 g/j pour CB et CH respectivement). L'estimation de la valeur protéique de MB et MH à partir de leur réponse en MP est proche des valeurs calculées avec INRA (2007), mais présente une légère surestimation de respectivement +14 et + 17 g PDIE/kg MS. Ce biais peut être expliqué par le positionnement du régime CH dans la zone haute de la réponse des MP aux apports ce qui correspond à une efficacité marginale faible. Un ciblage plus précis de la zone maximale de réponse des MP permet d'ailleurs de réduire ce biais à +7 g PDIE/kg MS pour le traitement MB. Cette limite souligne l'importance à apporter à la formulation des régimes contrôles utilisés de façon à bien cibler la gamme de variation maximale de la réponse en MP. Moyennant cette précaution, l'utilisation de la réponse MP est une approche intéressante pour estimer la valeur protéique des aliments et cela quelles que soient les techniques de protection employées.

Estimation of a new methodology to estimate protein feed values from biological milk protein response in dairy cows

DUFRENEIX F. (1,2), PEYRAUD J.L. (1), FAVERDIN P. (1)

(1) PEGASE, Agrocampus Ouest, INRA, 35590 Saint Gilles, France

SUMMARY – The aim of this trial is to test a new methodology to estimate feeds protein value based on their milk protein yield (MPY) response to metabolisable proteins supplies in diet. Compared to classical methods, this one could be used whatever the protein protection applied to feeds (essential oils, vegetable tannins). The prediction of the protein value of a tested feed is made from its MPY response using two control treatments of known protein value. This response is not linear because the efficiency of metabolisable proteins decreases as intake increases. We assume that, in the zone of supply variation tested, this decrease in efficiency is linear. To develop the method, four isoenergetic dietary treatments, defined by their increase in protein intake, were applied in a Latin square design of four 3-weeks periods to 24 cows divided in 6 homogenous groups of 4 cows. The two extreme treatments contained either 4.4 kg DM of energy concentrate (Control Low (CL), 97 g PDIE / kg DM) or 3.6 kg DM of soybean meal (Control High (CH), 252 g PDIE / kg DM). The two intermediate treatments, consisting of a mixture of these two feeds (Medium Low: ML and Medium High: MH), were used to estimate their metabolisable protein value from their response in MPY. The increase in protein supply increased MPY production (896 and 964 g/d for CL and CH respectively). The estimated protein value of ML and MH from their MPY response was respectively +14 and +17 g PDIE / kg DM higher than the values calculated with the feed unit system INRA (2007). This bias could be explained by CH position, situated in the upper part of MPY response to protein supplies corresponding to a low marginal efficiency. A more precise targeting of the maximum MPY response zone reduced this bias to +7 g PDIE / kg DM for ML. This limitation emphasizes the importance of diets formulation to target well the range of maximal variation of the MPY response. Nevertheless, the use of the MPY response seems to be an interesting approach for estimating the protein value of feeds, regardless of the protective techniques used.

INTRODUCTION

L'augmentation de la proportion de protéines by-pass est un enjeu majeur dans le domaine de la nutrition des vaches laitières hautes productrices pour économiser les ressources en protéines végétales et réduire les rejets azotés vers l'environnement. Pour répondre à cette demande, les experts de la nutrition animale ont développé depuis de nombreuses années des techniques de protection des aliments protéiques

qui reposent soit sur une moindre dégradabilité ruminale par renforcement des liaisons chimiques de l'aliment (réactions de Maillard, tannage), soit sur une action sur l'activité de la flore ruminale.

Pour pouvoir estimer l'efficacité de ces techniques de protection, des méthodes d'estimation de la valeur nutritionnelle des aliments sont utilisées à partir de la mesure de dégradabilité par la méthode des sachets (Orskov and

McDonald, 1979) ou de flux de protéines métabolisables (méthodes *in vivo*). Cependant, les méthodes « sachets rumen » ne sont pas exemptes de biais et elles ne sont pas adaptées pour évaluer l'efficacité des nouvelles techniques agissant sur l'activité de la flore ruminale apparaissant sur le marché (huiles essentielles, tannins végétaux) (Benchaar et al., 2008). La méthode basée sur la mesure des flux de protéines au niveau duodénal, nécessite l'utilisation d'animaux porteurs de fistules ruminales et duodénales. Son coût est élevé et elle nécessite un temps important lié à l'expérimentation, ce qui rend cette méthode peu appropriée pour des analyses en routine (Stern et al., 1997). De plus, les résultats sont assez peu précis en raison de la variabilité de la mesure de flux et du faible nombre d'animaux utilisés.

Par ailleurs, les réponses de la production laitière aux apports protéiques commencent à être bien connues. L'augmentation des apports en protéines alimentaires entraînent une augmentation de la production laitière (Macleod et al., 1984; Metcalf et al., 2008) ainsi que des matières protéiques (MP) du lait. La réponse en MP à des apports croissants de protéines est quadratique, avec une diminution de la réponse liée à la diminution de l'efficacité d'utilisation des protéines métabolisables lorsque les apports augmentent (Brun-Lafleur et al., 2010). Si les apports énergétiques sont maintenus constants, on peut considérer que l'augmentation de la sécrétion de MP est le reflet des variations d'apports de protéines métabolisables. En cela, elles constituent la réponse physiologique aux protéines ingérées réellement utilisées par l'animal et ce quelle que soit la technique de protection appliquée aux aliments ingérés ou de stimulation de l'activité microbienne.

L'objectif de cet essai est de déterminer dans quelle mesure la réponse en MP peut être utilisée pour estimer la valeur protéique des aliments et avec quelle précision. Le principe repose sur la réponse en MP observée pour un régime inconnu par comparaison à celle observée entre deux traitements contrôles (haut et bas) de valeur protéique connue. Le calcul est basé sur la décroissance de l'efficacité d'utilisation des protéines métabolisables (Sauvage et al., 2015) qui est supposée linéaire dans cet essai.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. SCHEMA EXPERIMENTAL ET TRAITEMENTS ALIMENTAIRES

24 vaches laitières en milieu de lactation ont été utilisées. Elles sont réparties en 6 blocs de 4 vaches homogènes (selon leur niveau de production laitière et leur parité). Quatre traitements alimentaires sont appliqués à chacun des 6 blocs selon un schéma en carré latin pendant 4 périodes de 3 semaines. Les vaches reçoivent un mélange de base composé de 78% d'ensilage de maïs, 9,5% de luzerne déshydratée, 7,5% de tourteau de soja et 5% de concentré énergétique contenant du minéral. Les quatre traitements expérimentaux isoénergétiques, différant par leur teneur en protéines métabolisables (évaluée par le système PDI ; INRA, 2007), sont ajoutés à ce mélange de base. Les traitements contrôle bas (CB) et contrôle haut (CH) sont composés exclusivement de concentré énergétique et de tourteau de soja respectivement de valeur protéique connue. Les deux traitements intermédiaires, utilisés pour valider la méthodologie d'estimation, sont constitués d'un mélange de ces deux aliments (Medium Bas, MB ; et Medium Haut, MH) (Tableau 1). L'urée est apportée dans l'alimentation pour assurer un apport non limitant d'azote dégradable dans le rumen pour tous les régimes. Les quantités distribuées ont été limitées à un niveau d'ingestion constant et propre aux besoins de chaque groupe pour contrôler au mieux l'apport d'énergie totale. Les vaches ont été alimentées individuellement et traitées deux fois par jour.

Tableau 1 : Quantités distribuées de chaque aliment pour les quatre traitements alimentaires définis par des apports protéiques croissants (CB : Contrôle Bas ; MB : Medium Bas ; MH : Medium Haut ; CH : Contrôle Haut)

Traitements	Tourteau de soja (kg MS)	Concentré énergétique (kg MS)	Urée (kg MS)	PDIE (g/kg MS) ¹
CB	0	4,4	0,28	97
MB	1,2	3,0	0,18	151
MH	2,4	1,5	0,09	204
CH	3,6	0	0	252

¹ PDIE : Protéines (alimentaires et microbiennes) digestibles dans l'intestin permise par l'énergie de la ration

1.2. MESURES ET ANALYSES

Les refus ont été retirés et pesés chaque matin lorsque les vaches ne consommaient pas toute la ration prévue. Leurs compositions étaient supposées identiques aux régimes distribués pour le calcul des quantités ingérées. La MS (60°C, 48h) de l'ensilage de maïs a été déterminée chaque jour. L'ensemble des aliments a été échantillonné une fois par semaine puis regroupé sur la totalité de l'essai. Ils ont été broyés (grille 0,8mm) et analysés chimiquement. La matière organique a été déterminée par calcination pendant 5h à 550°C dans un four. La concentration en azote a été déterminée par la méthode Dumas sur un appareil Leco (Leco, St Joseph MI). La teneur en fibre (NDF, ADF et ADL) a été mesurée selon Van Soest et al. (1991) sur une unité d'extraction Fibersac (Ankon Technology, Fairport, NY). Les matières grasses ont été mesurées par extraction dans l'éther et l'amidon a été déterminé par polarimétrie (LABOCEA, Ploufragan, France). Les valeurs nutritionnelles des aliments ont été calculées avec INRA (2007).

La production laitière de chaque vache a été mesurée à chaque traite. Les taux ont été mesurés par technique infrarouge deux jours par semaine pendant les deux premières semaines et trois fois la dernière semaine de chaque période, séparément à la traite du matin et du soir (Lillab, Chateaugiron, France).

1.3. ANALYSE STATISTIQUE

Les analyses ont été réalisées sur les deux dernières semaines de chaque période à l'aide de la procédure MIXTE de SAS Entreprise 6.1 :

$$Y_{i,j,k,l} = \mu + P_i + A_{j(i)} + W_k + T_l + e_{ijkl}$$

où $Y_{i,j,k,l}$ est la variable d'étude, μ la moyenne, P_i l'effet de la parité i , $A_{j(i)}$ l'effet aléatoire de l'animal j dans le groupe de parité i , W_k l'effet de la période k , T_l l'effet du traitement alimentaire l et e_{ijkl} l'erreur résiduelle. Les contrastes orthogonaux (linéaire et quadratique) ont été appliqués aux moyennes de chaque variable pour tester la réponse globale. Le seuil de significativité est fixé à $P < 0,05$.

1.4. METHODE DE CALCUL D'ESTIMATION DE LA VALEUR PROTEIQUE

Le principe de la méthode repose sur le lien entre les réponses de production des MP et d'efficacité d'utilisation des PDI lorsque les apports protéiques augmentent. Chez la vache laitière, la réponse curvilinéaire des MP est expliquée par la décroissance de l'efficacité PDI lorsque les apports augmentent (loi des rendements marginaux). Nous avons utilisé deux traitements alimentaires (CB et CH) dont les valeurs en MP et PDI ingérées sont connues pour estimer la valeur protéique de deux traitements intermédiaires (MB et MH), de valeur PDI ingérées supposée inconnue, à partir de leur réponse en MP.

Les deux traitements contrôles (CB et CH), de valeurs MP et PDI ingérées connues, sont utilisés pour calculer leur efficacité PDI selon l'équation suivante :

$$\text{efficacité PDI} = \text{MP} / \text{PDI ingérées} \quad (1)$$

Puis, en supposant que la relation d'efficacité PDI en fonction des apports protéiques est linéaire entre ces deux traitements, l'efficacité PDI est également obtenue par la relation suivante :

$$\text{efficacité PDI} = a * \text{PDI ingérées} + b \quad (2.1)$$

où a et b sont respectivement la pente et l'ordonnée à l'origine de l'équation de l'efficacité en fonction des apports :

$$a = (\text{efficacité PDI}_{\text{CH}} - \text{efficacité PDI}_{\text{CB}}) / (\text{MP}_{\text{CH}} - \text{MP}_{\text{CB}}) \quad (2.2)$$

$$b = \text{efficacité PDI}_{\text{CB ou CH}} - a * (\text{PDI}_{\text{CB ou CH}}) \quad (2.3)$$

Ces deux relations d'efficacité PDI sont combinées en une seule ((1) = (2.1)) ce qui permet d'obtenir un polynôme du second degré :

$$a * (\text{PDI ingérées})^2 + b * \text{PDI ingérées} + \text{MP} = 0 \quad (3)$$

La réponse en MP des traitements MB ou MH est utilisée dans cette équation dont la solution positive permet d'obtenir une estimation des PDI ingérées pour chacun d'eux.

L'estimation des PDI ingérées obtenue à cette étape correspond à la valeur protéique de la totalité de la ration distribuée (mélange de base + traitement alimentaire MB ou MH). La composition du mélange de base étant connu, sa valeur protéique est calculée directement avec INRA (2007) puis soustraite des apports PDI estimés de façon à obtenir la valeur protéique (en g PDIE/kg MS) des traitements MB et MH.

Enfin, dans le cadre de la méthodologie, les compositions de MB et MH étaient connues. Un calcul des valeurs protéiques de ces deux traitements est réalisé avec INRA (2007) ce qui permet une comparaison entre les valeurs estimées selon la méthode ci-dessus et celles calculées avec INRA (2007).

1.5. ANALYSE D'INCERTITUDE

Une analyse d'incertitude a été réalisée pour étudier l'impact de la variabilité de la réponse des MP sur l'estimation de la valeur protéique des aliments et évaluer les effets du nombre de vaches utilisées sur la précision de la mesure. Pour cela 40 000 données de MP (10 000 pour chaque traitement) ont été générées aléatoirement suivant une distribution normale déterminée à partir de la moyenne et l'écart type obtenus par l'analyse statistique. L'analyse d'incertitude a été réalisée séparément sur 24, 16, 12 et 8 vaches en respectant la répartition en groupe. Les valeurs protéiques des traitements MB et MH ont été estimés comme décrit ci-dessus.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. REPONSES GLOBALES AUX APPORTS EN PROTEINES

Un épisode de canicule est survenu au cours de la dernière période de l'essai ce qui a entraîné des fortes variations dans l'ingestion des animaux et dans leurs réponses laitières. Les analyses ont donc été réalisées uniquement sur les trois premières périodes.

Tableau 2 : Moyennes ajustées de la composition des régimes, de la production laitière et de la composition du lait en fonction des apports croissants en protéine apportés par les traitements alimentaires (CB : Contrôle Bas ; MB : Medium Bas ; MH : Medium Haut ; CH : Contrôle Haut ; MSI : matière sèche ingérée ; PL : production laitière ; TP : taux protéique ;

TB : taux butyreux ; MP : matières protéiques ; MG : matières grasses)

Variables	Traitements				RSD	P-Value
	CB	MB	MH	CH		
MSI, kg/j	21,2	21,3	21,3	21,2	0,17	0,87
Refus, kg MS/j	1,2	0,9	0,5	0,5	0,11	<0,001
UFL/j ¹	18,5	18,8	18,8	19,0	0,15	<0,001
PDIE, g/j ²	1796	2002	2146	2320	16,86	<0,001
PL, kg/j	27,8	28,9	29,1	29,5	0,60	<0,001
TP, g/kg	32,4	32,7	32,9	32,9	0,51	0,02
TB, g/kg	40,5	39,6	39,8	39,6	0,91	0,20
MP, g/j	896	940	956	964	13,71	<0,001
MG, g/j	1117	1137	1154	1161	20,22	0,06

¹ UFL : Quantité d'énergie nette disponible pour la production laitière contenue dans 1kg d'orge standard (87% de matière sèche, 2700 kcal d'énergie métabolisable)

² PDIE : Protéines (alimentaires et microbiennes) digestibles dans l'intestin permise par l'énergie de la ration

Les apports en protéines ont augmenté linéairement entre les régimes comme prévu (175 ± 31 g PDIE/j entre chaque traitement). Les quantités consommées sont celles attendues pour les traitements riches en protéines (MH et CH), mais les refus ont été légèrement plus importants pour les traitements à faible teneur en protéines (+0,7 et +0,4 kg MS/j respectivement pour CB et MB comparés à CH et MH ; Tableau 2). En conséquence, les apports en énergie ont augmenté légèrement entre les contrôles CB et CH (+0,5 UFL/j). L'accroissement de l'ingestion et des apports énergétiques avec l'accroissement des apports protéiques est un phénomène déjà décrit (Cowan et al., 1981; Rico-Gomez et Faverdin, 2001; Faverdin et al., 2003). Nous avons limité ce phénomène grâce à la distribution en quantités limitées des rations sans pouvoir l'éliminer complètement.

La teneur en matières grasses du lait n'a pas été affectée par le niveau d'apport protéique. La production laitière et le taux protéique ont augmenté linéairement avec les apports en protéines (Tableau 2).

2.2. REPONSE DES MP ET DE L'EFFICIENCE DES PDI AUX APPORTS PROTEIQUES

La figure 1 représente la réponse de l'efficacité d'utilisation des PDI et de la production des MP aux apports protéiques. Les MP ont répondu curvilinéairement aux apports protéiques (P<0,001) avec une amplitude de réponse de 68 g/j entre les deux contrôles CB et CH (Tableau 2). Cette réponse curvilinéaire est liée à la baisse de l'efficacité d'utilisation des PDI (0,50 et 0,42 respectivement pour CB et CH) quand les apports augmentent. L'ordre de grandeur de l'efficacité est cohérent avec les valeurs observées dans la littérature (Vérité and Delaby, 2000; Metcalf et al., 2008).

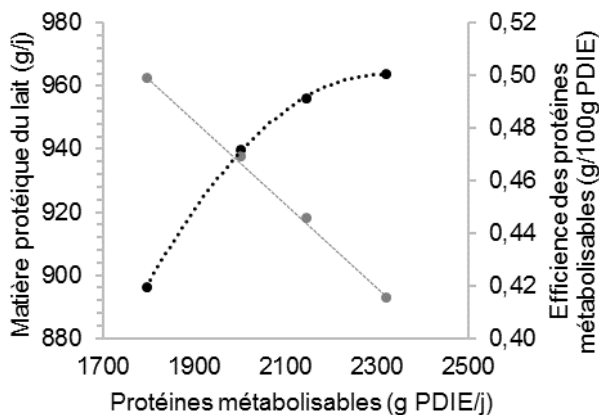


Figure 1 : Réponse des matières protéiques du lait (ligne noire pointillée) et de l'efficacité d'utilisation des protéines métabolisables (points gris) aux apports croissants en protéines. La ligne grise en pointillée représente la relation linéaire entre les contrôles bas et haut (CB et CH).

2.3. ESTIMATION DE LA VALEUR PROTEIQUE A PARTIR DE LA REPONSE DES MP

Compte tenu de ces réponses, l'estimation de la valeur protéique des traitements MB et MH (respectivement 165 et 221 g PDIE/kg MS) montre que la hiérarchie entre les valeurs PDI des deux concentrés a été bien estimée. Néanmoins, une légère surestimation de +14 et +17 g PDIE/kg MS par rapport à la valeur calculée avec INRA (2007) pour les traitements MB et MH (151 et 204 g PDIE/kg MS respectivement) est mise en évidence.

Cette surestimation peut s'expliquer par le fait que le traitement CH se situe dans une zone d'apport PDI élevée et donc dans la zone où les efficacités marginales sont faibles voire nulles. Vérité et Delaby (2000) montrent qu'au-delà d'un rapport PDIE/UFL de 110, la réponse marginale des MP est nulle et ce rapport est de 117 pour CH. Une seconde estimation du traitement MB a donc été réalisée en utilisant CB et MH comme contrôles négatif et positif respectivement. La substitution de CH par MH permet de cibler plus précisément la zone où la réponse des MP est maximale. La nouvelle valeur estimée du traitement MB est alors de 158 g PDIE/kg MS soit un biais de seulement +7 g PDIE/kg MS. Ainsi, la zone de réponse des MP aux apports doit bien être ciblée dans la formulation des régimes pour une estimation la moins biaisée possible de la valeur protéique de l'aliment testé. Si une partie (voir la totalité) des traitements testés est située dans la zone où les MP ne répondent plus que faiblement aux apports (efficacité marginale faible), le risque de biais par rapport à la valeur théorique se trouve augmenté.

2.4. ANALYSE D'INCERTITUDE

L'analyse d'incertitude des MP est présentée sur la Figure 2. Les moyennes et écart-types des estimations de la valeur PDI de MB sont respectivement (en g PDIE/kg MS) : 161±34, 160±37, 165±39 et 152±50 pour 24, 16, 12 et 8 vaches utilisées ce qui représente des biais de respectivement +10, +9, +13 et +1 plus élevée à la valeur théorique. La diminution de l'effectif entraîne un accroissement de l'incertitude dans l'estimation de la valeur protéique de MB. Un effectif inférieur à 12 vaches risque d'entraîner une trop grande variabilité dans la réponse des MP même si le biais est réduit. Cela peut conduire à des situations où l'estimation de la valeur des traitements alimentaires ne pourra pas être réalisées avec une précision suffisante.

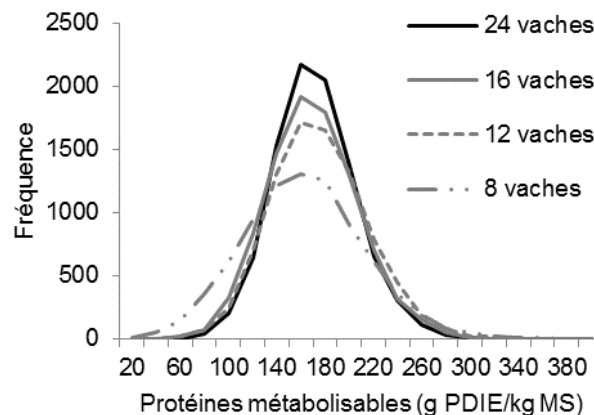


Figure 2 : Distribution de la fréquence des valeurs de protéines métabolisables du traitement MB estimées à partir de l'incertitude des MP sur 24, 16, 12 et 8 vaches (MB : médium bas).

CONCLUSION

L'utilisation de la réponse des MP du lait semble être une approche pertinente pour estimer la valeur protéique des aliments quelle que soit la technique de protection envisagée. Néanmoins, la formulation des régimes et le contrôle des quantités ingérées doivent être réalisés avec soin pour se situer dans la gamme d'apport permettant une bonne sensibilité de la réponse des MP. Par ailleurs, une formulation précise des régimes permet d'éviter les interactions concomitantes des apports énergétiques et de ne pas affecter les synthèses microbiennes par un manque d'azote dégradable.

Cet essai rentre dans le cadre du projet FEADER SOS PROTEIN porté par les régions Bretagne et Pays de la Loire et coordonné par le pôle de compétitivité Valorial

Benchaar C, Calsamiglia S, Chaves AV, Fraser GR, Colombatto D, McAllister TA and Beauchemin KA 2008.

Animal Feed Science and Technology 145, 209–228.

Brun-Lafleur L, Delaby L, Husson F and Faverdin P 2010. Journal of Dairy Science 93, 4128–4143.

Cowan RT, Reid GW, Greenhalgh JF and Tait CA 1981.

The Journal of Dairy Research 48, 201–212.

Faverdin P, M'hamed D and Vérité R 2003. Animal Science 76, 137–146.

INRA 2007. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Editions Quae, France.

Macleod GK, Grieve DG, McMillan I and Smith GC 1984.

Journal of Dairy Science 67, 1421–1429.

Metcalf JA, Mansbridge RJ, Blake JS, Oldham JD and Newbold JR 2008. Animal 2, 1193–1202.

Orskov ER and McDonald I 1979. Journal of agricultural science 92, 499–503.

Rico-Gomez M and Faverdin P 2001. Renc. Rech. Rum. pp. 285–288. Paris.

Sauvant D, Cantalapiedra-Hijar G, Delaby L, Daniel J-B, Faverdin P and Nozière P 2015. INRA Production Animale 28.

Stern MD, Bach A and Calsamiglia S 1997. Journal of Animal Science 75, 2256–2276.

Van Soest PJ, Robertson JB and Lewis BA 1991. Journal of Dairy Science 74, 3583–3597.

Vérité R and Delaby L 2000. In Annales de zootechnie, pp. 217–230. EDP Sciences.

Effet de la taille et de la densité de particules de plastique sur leur vitesse de transit dans le rumen

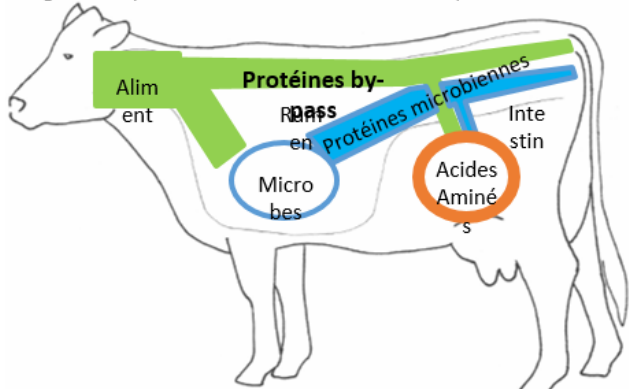
Florence Dufreneix^{1,2}, Philippe Faverdin¹ et Jean-Louis Peyraud¹

¹PEGASE, Agrocampus Ouest, INRA, 35590 Saint-Gilles, France

²Agrial, 4 rue des Roquemonts, 14000 Caen, France

Introduction

Objectif : Augmenter les protéines by-pass (= non dégradées par les fermentations ruminales)



- Pourquoi ? Pour couvrir les besoins protéiques des vaches laitières car les protéines microbiennes ne suffisent pas
- Comment ? En **réduisant le temps de séjour** dans le rumen

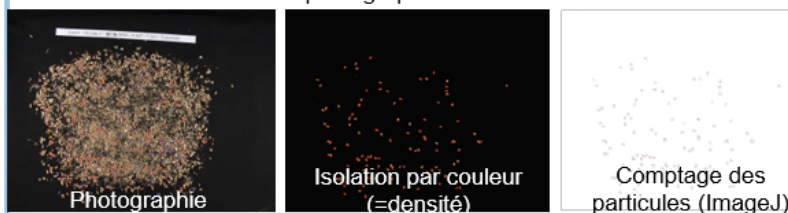
Hypothèse : Influence de la **densité** et de la **taille** des particules sur leur temps de séjour dans le rumen

Matériels et méthodes

- Utilisation de **particules de plastique** : affranchissement des effets liés au fermentations
- **4 densités x 4 tailles**
- Carré latin (4 vaches x 4 périodes)



- Collecte totale des fèces (17 prélèvements sur 106 heures)
- Traitement des fèces et photographies

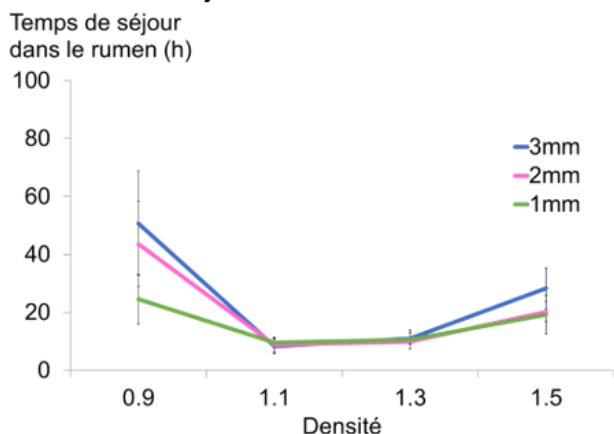


- Modélisation des cinétiques d'excrétion des particules
- **Obtention des temps de séjour à partir des paramètres du modèle**

Résultats

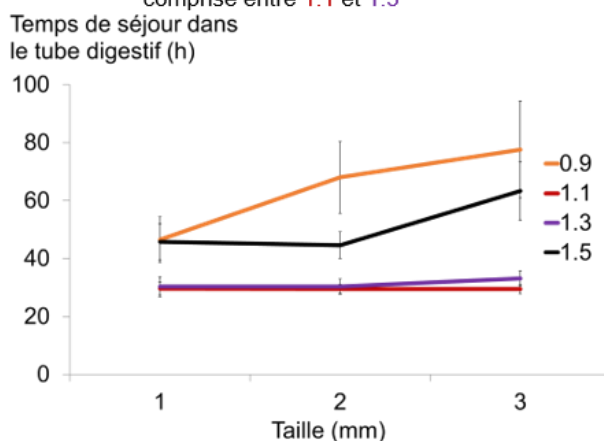
① L'identification des particules dans les fèces n'a pas pu être réalisée pour la taille 0.5 mm : les résultats n'ont pas été obtenus

② Les particules de **densité 1.1 et 1.3** ont les **plus courts temps de séjour** dans le rumen



③ L'**augmentation de la taille** des particules **augmente le temps de séjour** pour les densité 0.9 et 1.5

La taille **n'a pas d'influence** quand la densité des particules est comprise entre 1.1 et 1.3



Conclusion

- L'optimum de temps de séjour est obtenu pour les particules de densité **1.1 et 1.3**
- La taille n'a pas d'influence dans cette gamme de variation de densité, contrairement aux particules de densités extrêmes

→ Une particule de plastique de densité comprise entre 1.1 et 1.3 sortira plus vite du rumen quelle que soit sa taille

Application

Dans le cas de particules alimentaires, les fermentations ruminales jouent un rôle très important dans les variations de densité et de taille. Le rapport surface / masse de la particule est notamment déterminant dans le début des fermentations : plus la surface est grande par rapport à la masse, plus le début des fermentations est retardé.

→ Une particule alimentaire de densité comprise entre 1.1 et 1.3 et de taille 3 – 4 mm aurait un temps de séjour plus court qu'une particule de même gamme de densité mais de taille plus petite

Titre : Variations et estimation de la valeur protéique des sources azotées dans l'alimentation de la vache laitière

Mots clés : valeur protéique ; temps moyen de séjour ; taille ; densité spécifique ; méthode *in vivo* ; acide aminé plasmatique ; matière protéique du lait

Résumé : Economiser les protéines végétales dans l'alimentation des vaches laitières est un enjeu majeur du secteur laitier. Cet objectif peut être atteint d'une part en limitant la dégradation des protéines dans le rumen pour augmenter la proportion de protéines alimentaires non dégradées et disponible dans l'intestin et d'autre part en formulant les rations au plus proche des besoins protéiques des animaux ce qui nécessite une méthode d'estimation précise de la valeur protéique des aliments. La première partie de ce travail de thèse s'attache à étudier l'influence de la taille et de la densité spécifique des particules sur leur temps de séjour dans le rumen. Les résultats obtenus avec des particules de plastique montrent que la taille et la densité peuvent être utilisées pour réduire le temps de séjour moyen dans le rumen.

Le deuxième partie de cette thèse vise à mettre en place une nouvelle méthodologie d'estimation de la valeur protéique des aliment basée sur la réponse biologique des animaux en comparaison à la méthode *in vivo* de référence. Les deux réponses testées (acides aminés plasmatiques ou matières protéiques du lait) donnent toutes les deux une estimation précise de la valeur protéique mais la réponse des matières protéiques du lait semble être à privilégier puisqu'elle est mieux connue et ne dépend pas de la source protéique utilisée.

Title: Variations and estimation of protein value of nitrogen sources in the nutrition of dairy cows

Keywords: protein value; mean retention time; size; specific density; *in vivo* method; plasmatic amino acids; milk protein yield

Abstract: Saving vegetable protein in the nutrition of dairy cows is a major challenge for the dairy sector. This objective can be achieved on the one hand by limiting the degradation of proteins in the rumen to increase the proportion of non-degraded feed proteins available in the intestine and on the other hand by formulating the rations as close as possible to the protein requirements of the animals, which requires a method of accurate estimation of the protein feed value. The first part of this thesis focuses on the influence of particle size and specific density on their rumen retention time. The results obtained with plastic particles show that size and density can be used to reduce the mean retention time in the rumen.

The second part of this thesis aims at setting up a new methodology for estimating feed protein value based on the biological responses of animals compared to the *in vivo* reference method. The two responses tested (plasmatic amino acids or milk protein yield) both give an accurate estimate of the feed protein value, but the response of milk protein yield seems to be preferable since it is better known and does not depend on the protein source used.