

**Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéens
(CIHEAM)**
Institut Agronomique Méditerranéen de Zaragoza (IAMZ)

Mémoire de Master

Présentée par

Manel Riahi

Spécialité: Nutrition Animale

Effet de l'ajout des graines riches en acides gras insaturés ayant des teneurs en fibres et des niveaux de lignification différents sur la réduction des émissions de méthane chez les ruminants in vitro

Soutenue le 06/07/2015

Dr. Javier González Cano

Encadreur

Dra. Dolores Carro Travieso

Encadreur

Remerciements

Je remercie Monsieur Javier González Cano pour son encadrement et sa patience tout au long du Master.

Je remercie également Madame Dolores Carro Travieso de m'avoir procuré de toutes les données dont j'en avais besoin pour l'accomplissement de la Mémoire et surtout de m'avoir encouragé.

Mes remerciements à l'ensemble du personnel de la section de Production Animale du Département de Production Agricole, Ecole Supérieure des Ingénierues Agronomes, Université Polytechnique de Madrid, de m'avoir accueilli.

Mes remerciements aussi aux membres de jury d'avoir accepté d'évaluer ma mémoire et à tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Résumé

Le but de cette étude a été d'examiner la possibilité de réduire la production de méthane par les ruminants en incorporant des graines oléagineuses riches en acides gras insaturés dans la ration. Trois graines ont été concernées par l'étude : le soja, le tournesol, et le cardon (*Cynaracardunculus* L). Ces graines présentent des teneurs en fibres et des niveaux de lignification différents : le soja (un niveau minimal), le tournesol (un niveau élevé) et le cardon (un niveau maximal). En raison de cette différence, on a également étudié l'effet de la teneur en fibres et le niveau de lignification de ces graines sur leurs potentiels à diminuer la méthanogénèse, puisqu'ils peuvent affecter négativement la colonisation des particules alimentaires par les micro-organismes, alors l'effet toxique des acides gras contenus dans les graines sur les micro-organismes notamment les bactéries fibrolytiques va être réduit. De même, on a prospecté la différence entre l'utilisation des oléagineuses sous forme de graines entières ou comme tourteaux + huiles dont la quantité est équivalente à celle des lipides contenus dans ces graines.

Les essais ont été réalisés *in vitro* en utilisant deux types de substrats qui peuvent être correspondants à deux types de rations : une ration riche en concentrés (ratio concentrés : paille de blé est 85:15), comme cas représentatif de l'engraissement intensif (substrat "Engrissement"), et une autre ration dont le ratio fourrage (mélange des foins de triticale et de la luzerne) : concentré est 40 : 60, et qui peut être représentative des rations pour des animaux laitiers (substrat "Lait"). Les oléagineuses ont été incorporées dans ces deux substrats selon deux niveaux (NI) afin d'apporter soit 2,75(N1) soit 5,5% (N2) MS de lipides. Pour chaque type de substrat, type de graine et taux d'incorporation de lipides, 3 traitements ont été menées. Ces substrats ont renfermé: 1) le tourteau de la graine en étude (traitement témoin), 2) ce graine et 3) le tourteau + l'huile de ce graine. L'huile et le tourteau utilisés ont été obtenus moyennant l'extraction complète avec de l'éther de chaque graine. En plus des aliments déjà indiqués, les substrats ont compris des graines de céréales (un mélange 1:1 de blé et maïs) et ont été formés qu'ils soient isoazotés. Les essais *in vitro* ont été réalisés à deux temps d'incubation: 6 et 17 heures, afin de contrôler les possibles effets initiaux et globaux, respectivement. Les variables étudiées étaient les suivantes: la pression et le volume de gaz produit, la production de méthane et d'acides gras volatils (AGV) et les rapports méthane/gaz et méthane/AGV totaux. Le rapport acétate/propionate, la matière organique fermentée (MOF) et les concentrations de l'azote ammoniacal dans le milieu

Résumé

d'incubation ont été également contrôlés.

Les substrats ont été incubés avec des inocula prélevés à partir 4 brebis qui ont subi un protocole croisé (cross-over). Nous avons utilisés des flacons de 120 ml, dans lesquels nous avons introduits 350 mg de matière sèche les traitements avec les graines. Pour les deux traitements restants la formulation des substrats fut identique sauf que la graine a été remplacée par la quantité équivalente du tourteau (cas de traitement témoin) ou de celle-ci + huile, qui a été ajouté juste avant l'incubation. Dans chaque flacon, ainsi que dans les flacons témoins blanc (2 par inoculum), on a ajouté 35 ml d'un mélange de liquide ruminal filtré et milieu de culture en proportion 1/4 (V/V). Afin d'éviter les interactions multiples qui pourraient être complexes à interpréter, les résultats relatifs aux substrats «Lait» et «Engrissement» ont été étudiés indépendamment, en effectuant deux types d'analyses : dans la première, on a comparé les résultats de l'utilisation des trois types de graines, tandis que dans la seconde on a comparé les trois traitements antérieurement indiqués. On a utilisé un dispositif split-plot dans les deux cas, en considérant le niveau d'incorporation de lipides comme main-plot et le type de graine ou le traitement (selon le cas) et l'interaction correspondante en tant que sub-plots.

Les 3 graines étudiées montrent des différences importantes au niveau de la composition chimique. Ces différences touchent notamment les teneurs en matières grasses, fibres et lignine. Ainsi, les teneurs en matières grasses de tournesol et de cardon rapportées à celles de soja sont 2,23 et 1,26 respectivement. Ceci implique une moindre proportion incorporée de ces graines dans les substrats pour atteindre le niveau de lipides souhaité. En tenant compte également des inégalités des contenus en fibres et lignine, les teneurs en NDF, ADF, et ADL rapportés à celles de soja sont 0,86; 0,96 et 5,45 pour le tournesol, et 1,8; 2,80 et 16,3 pour le cardon.

En comparant les trois graines, aucune interaction «type de graine x NI» significative a été observé avec aucun substrat. En outre, les effets pour NI ont été limités à des réductions de la production totale des AGV à 6 heures et de la production de gaz en augmentant «NI» avec le substrat «Engrissement», que peuvent être attribuées à une diminution de l'activité microbienne en raison de l'apport accru de lipides. La comparaison entre les différents types graines a révélé peu de différences avec le substrat «Lait», alors que elles ont été nombreuses et plus importantes avec le substrat «Engrissement».

Avec les deux substrats, les concentrations de NH₃-N et AGV ramifiés ont montré que le cardon a une dégradabilité ruminale des matières azotées plus élevée que

les autres graines. Pour cette graine on a également constaté une moindre fermentation ruminale qui se manifeste par une diminution de gaz, des AGV totaux et de la MOF, qui est due à ses teneurs plus élevées en fibres et en lignine. Comme conséquence de cette diminution de la fermentation, une réduction de la production de méthane a été observée avec le substrat «Engraissement», mais elle a été significative seulement avec le niveau NI1. Pour ce même substrat, une fermentation plus importante (une augmentation de la production des AGV à 6 heures) a été également constatée avec le cardon par comparaison au soja.

Pour le soja, il n'y a pas eu d'interactions «traitement x NI» significatives pour aucun substrat, de même, le «NI» n'a pas présenté des effets significatifs. La comparaison des traitements avec lipides (huile et graine entière) aux traitements témoins (sans lipides) n'a pas montré des différences considérables au niveau des paramètres de fermentation, on a uniquement observé une baisse de la production de gaz et un accroissement de la concentration de N-NH₃ et de la production de butyrate à 17 heures avec le substrat «Lait». Par contre, de nombreuses différences entre l'incorporation de soja sous forme d'huile et sous forme graine entière ont été observées. Avec le substrat «Lait», l'incorporation de soja sous forme d'huile a augmenté la production totale ainsi que les proportions des AGV et la quantité de MOF à 17 heures. Avec le substrat «Engraissement» des effets similaires ont été observées à 6 heures, mais à 17 heures on a seulement observé des augmentations de la production de gaz, la concentration de N-NH₃ et le rapport acétate / propionate. Ces résultats incitent à déduire que l'apport de soja sous forme d'huile n'a pas affecté négativement la fermentation ruminale, il a même augmenté la quantité de MOF en comparaison à la graine entière. Ces effets étaient plus prononcés à 17 heures avec le substrat «Lait» et à 6 heures avec le substrat «Engraissement».

La réponse aux traitements expérimentaux a montré des différences entre les deux substrats pour le tournesol. Alors que avec le substrat «Lait», pas d'effet de l'interaction «traitement x NI» a été observée, avec le substrat «Engraissement» des interactions significatives ont été constatées pour la plupart des paramètres analysés. Pour le substrat «Lait» il n'y pas eu d'effet de «NI» de l'incorporation de lipides (huile et graine entière), cependant似然性に似たる結果が観察された。すなはち、ソヤ豆の油による影響が、乳由来の影響よりも強かった。一方で、油による影響が弱い場合は、油による影響が強くなる傾向がある。これは、油による影響が、主にAGVの割合を増加させることによって現れるためである。

Résumé

réduit la production d'acétate et de propionate à 6 heures, mais cette réduction a disparu à la fin de l'incubation. L'inclusion de lipides (huile et graine entière) dans ce substrat a abaissé la production de certains AGV (butyrate, valérate et isobutyrate) à 6 heures, mais cette baisse a aussi disparu à 17 heures. Ces résultats pourraient indiquer que l'effet de l'incorporation de lipides est plus prononcé dans les premières heures d'incubation. Des interactions "traitement x NI" significatives pour la production de gaz et de CH₄ ont été observées, en effet, l'ajout de lipides a entraîné une augmentation de ces deux paramètres à NI1 et une diminution à NI2. Concernant huile vs graine entière, l'administration de l'huile a augmenté la production de gaz, la production totale ainsi que certaines proportions des AGV et la MOF à la fin de l'incubation.

Pour le cardon, pas d'interactions «traitement x NI» significatives ont été constatées quel que soit le substrat. Pas d'effet de «NI» a été observée, à l'exception d'une réduction notable du ratio acétate/ propionate avec le substrat «Engrissement». L'incorporation de lipides (huiles et graines entières) à peine a affecté les paramètres de fermentation comparativement au traitement témoin : Seulement une diminution de production de CH₄ et une augmentation de la production de propionate à 17 heures ont été enregistrées avec le substrat «Engrissement». La comparaison huile vs graine entière a révélé que l'huile a montré une tendance à réduire la production de CH₄ avec le substrat «Lait» et a diminué significativement la méthanogénèse avec le substrat «Engrissement» en même temps cette diminution a été plus importante avec NI1 qu'avec NI2.

Resumen

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar las posibilidades de reducir la generación de metano por los rumiantes mediante la inclusión en la dieta de semillas ricas en grasas insaturadas. A este nivel también se han estudiado los efectos derivados del nivel de fibra y significación de estas semillas en la medida que puede afectar a la colonización de las partículas de alimento y, por tanto, a los efectos tóxicos sobre los microrganismos ruminantes y, en particular, a las bacterias fibrolíticas. De forma paralela, también se han estudiado las diferencias entre el uso de semillas enteras o sus harinas de extracción más el aceite de esa semilla en forma libre y en cantidad equivalente.

Se han estudiado tres semillas de oleaginosas: soja, girasol y cardo (*Cynara cardunculus* L), que proporcionan respectivamente los niveles de fibra y significación mínimo, medio y máximo utilizados. Los ensayos se han realizado *in vitro* utilizando un sistema de cultivo de microorganismos ruminantes cerrado y dos sustratos asociables a dos tipos de dieta: una altamente concentrada (concentrado y paja de trigo en relación 85:15), representativa de los casos de cebo intensivo (sustrato “cebo”), y otra con relación forraje (mezcla de henos de triticale y alfalfa): concentrado de 40:60, representativa de las raciones de animales lecheros (sustrato “leche”). Las semillas se incluyeron en estos sustratos a dos niveles de incorporación (NI) para proporcionar 2.75% (NI1) y 5.5 % (NI2) de grasa incorporada adicional. Para cada sustrato, semilla testada y nivel de incorporación de grasa se realizaron 3 tratamientos en cuyos sustratos se incluía: 1) la harina de extracción de esa semilla (tratamiento control), 2) la semilla y 3) la harina de extracción + aceite de esa semilla. El aceite y las harinas de extracción utilizadas se obtuvieron mediante la extracción exhaustiva con éter de cada semilla. Además de los alimentos ya indicados, los sustratos incluían granos de cereales (mezcla 1:1 de trigo y maíz) y se calcularon para ser isonitrogenados. Los ensayos *in vitro* se han realizado a dos tiempos de incubación: 6 y 17 horas, a fin de controlar los posibles efectos iniciales y globales, respectivamente. Las variables estudiadas fueron: la presión y el volumen de gas producido, la producción de metano y ácidos grasos volátiles (AGV), así como los ratios entre el metano y el gas o los AGV totales producidos; también se controló la relación acetato/propionato, la materia orgánica fermentada (MOF) y las concentraciones de amoniaco en el medio de incubación. Las muestras de ambos sustratos se incubaron simultáneamente, habiéndose realizado dos incubaciones

en un diseño cruzado (cross-over), utilizando 4 ovejas para proporcionar 4 inóculos diferentes en cada incubación. Para estas, se utilizaron botellas de 120 ml con 350 mg de materia seca de sustrato en los viales que incluían las semillas. En los dos restantes tratamientos la formulación del sustrato fue idéntica salvo que la semilla se sustituyó por la cantidad equivalente de harina de extracción (caso del tratamiento control) o de esta más su aceite, el cual se añadió justo antes de la incubación. En cada vial, así como en los blancos de control, se añadieron 35 ml de una mezcla de líquido ruminal filtrado y medio de cultivo en proporción 1/4 (V/V).

A efectos de evitar posibles interacciones múltiples que podían ser complejas de interpretar, los resultados de los sustratos “leche” y “cebo” se estudiaron de forma independiente, realizándose dos tipos de análisis. En el primero se compararon los resultados correspondientes al uso de las 3 semillas, mientras que en el segundo se compararon los 3 tratamientos indicados. En ambos casos se utilizó un diseño split-plot, considerando el nivel de incorporación de grasa como main-plot y las semillas o el tratamiento (según casos), así como la correspondiente interacción como sub-plots. El nivel de significación estadística se estableció en $P<0,05$. El nivel de significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

Las 3 semillas ensayadas muestran importantes diferencias de composición química, destacándose por su importancia de cara al diseño sus contenidos en grasa, fibra y lignificación. Así, el contenido en grasa del girasol y el cardo fue 2,23 y 1,26 veces superior al de la soja, respectivamente. Ello conlleva una menor inclusión de estas semillas para alcanzar el mismo nivel de grasa añadida. Considerando también las diferencias en fibra y lignina los aportes de FND, FAD y LAD expresados en relación a la soja fueron 0,86; 0,92 y 5,45 para el girasol y 1,80; 2,80 y 16,3 para el cardo.

En la comparación de las 3 semillas no se apreciaron interacciones “tipo de semilla x NI” de importancia con ambos sustratos. Así mismo, los efectos derivados del nivel de incorporación de lípidos fueron escasos, limitándose a una reducción en los sustratos “cebo” de los AGV producidos al tiempo de 6 horas y a una reducción de la producción de gas al aumentar NI, hechos concordantes con una menor actividad microbiana como consecuencia del mayor aporte de lípidos. Los efectos asociados a la comparación entre semillas fueron escasos con el sustrato “leche” y más frecuentes e intensos con el sustrato “cebo”. En ambos casos, las concentraciones de $\text{NH}_3\text{-N}$ y de AGV ramificados tienden a mostrar una mayor degradabilidad ruminal de la proteína del cardo. Para esta semilla también se apreció un menor nivel de fermentación en base a su menor

producción de gas y AGV y a un menor valor de materia orgánica fermentada, todo lo cual es concordante con sus superiores contenidos en fibra y lignificación. Consecuentemente con esta menor fermentación se redujo también la producción de metano con el sustrato “cebo” aunque solo significativamente al nivel de grasa menor. Otro efecto observado con este sustrato fue una más rápida fermentación (mayor producción de AGV a 6 horas) de esta semilla frente a la soja.

En la comparación de los 3 tratamientos que incluían la semilla de soja no se detectaron interacciones “tratamiento x NI” significativas con ningún sustrato ni el NI presentó efectos de importancia. La incorporación de aceite, en forma de semilla entera o como aceite libre, apenas afectó a los parámetros fermentativos en comparación con los sustratos que incluían harina de extracción (tratamiento control), observándose únicamente una menor producción de gas y mayores producciones de butirato y concentraciones de NH₃-N a las 17 horas para el sustrato “leche”. Por el contrario, se observaron múltiples diferencias entre las dos formas de suministrar el aceite. Con el sustrato “leche”, la incorporación de aceite en forma libre aumentó la producción de AGV (totales e individuales) y la cantidad de MOF a las 17 horas. Para el sustrato “cebo” se observaron efectos similares a las 6 horas, pero a las 17 horas solo se observó un aumento de la producción de gas, la concentración de NH₃-N y la relación acetato/propionato. Estos resultados indicarían que la incorporación de aceite en forma libre no produjo efectos negativos sobre la fermentación ruminal, sino que incluso aumentó la cantidad de MOF en comparación con la adición de la misma cantidad de aceite en la semilla entera. Estos efectos fueron más acusados a las 17 horas con el sustrato “leche” y a las 6 horas con el sustrato “cebo”.

En el caso de la semilla de girasol se apreciaron diferencias entre los dos sustratos en la respuesta a los tratamientos experimentales. Mientras que con el sustrato “leche” no se detectaron interacciones “tratamiento x NI” significativas, con el sustrato “cebo” se observaron interacciones en gran parte de los parámetros analizados. Con el sustrato “leche” no existieron efectos del NI ni de la adición de aceite (como semilla entera o en forma libre), pero de forma similar a lo observado para la soja, la incorporación de aceite en forma libre aumentó la producción a las 17 horas de algunos AGV (propionato, butirato, valerato e isobutirato) en comparación con la incorporación de semilla entera. Con el sustrato “cebo”, el NI2 redujo la producción de acetato y propionato a las 6 horas, pero estas diferencias desaparecieron al final de la incubación. La incorporación de aceite (como semilla entera o en forma libre) a este sustrato redujo

la producción de algunos AGV (butirato, valerato e isobutirato) a las 6 horas, pero de nuevo las diferencias desaparecieron a las 17 horas. Estos resultados podrían indicar que el efecto de este aceite es más acusado en las primeras horas de incubación. En cuanto a la producción de gas y CH₄ se observaron interacciones “tratamiento x NI” significativas, ya que la adición de aceite provocó un aumento de ambos parámetros al NI1 y una disminución al NI2. En comparación con la semilla entera, la administración de aceite en forma libre aumentó la producción de gas, AGV (totales y algunos individuales) y la MOF al final de la incubación.

En el caso de la semilla de cardo no se detectaron interacciones “tratamiento x NI” significativas con ningún sustrato, ni el NI presentó efectos de importancia con la excepción de una reducción de la relación acetato/propionato con el sustrato “cebo”. La incorporación de aceite, en forma de semilla entera o como aceite libre, apenas afectó a los parámetros fermentativos en comparación con el tratamiento control (harina de extracción), observándose únicamente una menor producción de CH₄ y una mayor producción de propionato a las 17 horas para el sustrato “cebo”. La incorporación de aceite en forma libre tendió a reducir la producción de CH₄ con el sustrato “leche” y la redujo significativamente con el sustrato “cebo”, siendo esta reducción más acusada al NI2 que al NI1.

Summary

The aim of this study was to assess the possibility of reducing methane emissions by ruminants by including oilseeds rich in unsaturated fats in the diet. The possible influence of the different levels of fiber and lignification in the tested oilseeds on the colonization of feed particles and fibrolytic bacteria was also investigated. In addition, differences between the fermentation of whole oilseeds and their meals plus free extraction oils administered in equal amounts were assessed.

Three oilseeds were selected: soybean, sunflower and cardoon (*Cynara cardunculus L*), which provided minimum, medium and maximum levels of fiber and lignification used this study. The study was carried in vitro using batch cultures of ruminal microorganisms and two substrates representative of the diets fed to fattening (fattening substrate; 85:15 concentrate: wheat straw) and dairy ruminants (dairy substrate; 60:40 concentrate:forage). The forage in the dairy susbtrate was a mixture of triticale and alfalfa hays. Both substrates contained cereal grains (mixture of wheat and corn) and were nitrogenous. In both substrates the oilseeds were included at two different levels (NI) to provide 2.75 (NI1) or 5.50% (NI2) of supplementary fat. There were 3 experimental treatments for each substrate, oilseed and NI: 1) extracted meal (control treatment), 2) whole oilseed, and 3) extracted meal plus free oil extracted from the oilseed. Both the meals and free oils were obtained in the laboratory from the tested oilseeds by extraction with petroleum ether.

Four rumen-fistulated sheep received two diets differing in their forage:concentrate ratio in a cross-over design and samples of both substrates were incubated in vitro using the ruminal fluid from each individual sheep as inoculum. In each period, 4 different inocula were used. Samples (350 mg of dry matter) of each substrate were weighed in 120 ml vials which were filled with 35 ml of a 1:4 mixture of filtered rumen fluid and cultivation media (Goering and Van Soest, 1970). Free oils were added to the corresponding treatments immediately before the in vitro incubation. Blanks for each inoculum were used to correct for gas production from endogenous substrates. After 6 hours of incubation, a sample of vials' content was taken and analyzed for its concentration of volatile fatty acids (VFA) and ammonia to investigate the possible effects of fat addition at early incubation times. After 17 hours of incubation, gas and methane production was measured and samples for VFA and ammonia analyses were taken. The amount of organic matter fermented (OMF) was

estimated from VFA production using stoichiometry equations.

Results for “dairy” and “fattening” substrates were independently analyzed in order to avoid significant interactions difficult to understand. Two different statistical analyses were conducted. In the first analysis, the results from the inclusion of the 3 whole seeds in the substrates were compared. In the second analysis, the 3 experimental treatments (whole seed, extracted meal and extracted meal plus free oil added) were assessed independently for each oil seed. In both analyses a split-plot ANOVA was used, being the NI the main plot and the type of oilseed or the treatment and the corresponding interactions the subplots. Sheep was considered as a random effect and significance was declared at $p<0.05$.

The 3 tested oilseeds had differences in chemical composition, especially in their fat, fiber and lignin contents. Fat content in sunflower and cardoon was 2.23 and 1.26 times greater than that in the soybean, respectively, and therefore a lower amount of these seeds was included in the substrates to achieve the same fat NI. Due to differences in fiber and lignin content, the supply of neutral detergent fiber, acid detergent fiber and acid detergent lignin relative to that in the soybean were 0.86, 0.92 and 5.45 for sunflower, and 1.80, 2.80 and 16.3 for cardoon, respectively.

When comparing the in vitro fermentation of the diets including the whole oilseeds, there were no “oilseed x NI” interactions for any of the two substrates. The effects of fat addition were limited, as only a reduction of VFA at 6 hours of incubation for “fattening” substrate and a decrease of gas production by increasing NI of fat were detected. These results agree with a reduction of microbial activity by adding fat. Differences in fermentation of the diets including the 3 oilseeds were more marked for the “fattening” substrate than for “dairy” substrate. For both substrates, the ammonia concentrations and the production of branched-chain VFA indicated greater protein ruminal degradability for cardoon compared with soybean and sunflower seeds. Production of both VFA and gas and the amount of OMF were also lower for substrates including cardoon, which is consistent with its higher fiber content and lignification. Consistently with these results, a lower CH₄ production was observed for the fattening substrate including cardoon, although differences only reached the significance level at the lower fat NI (NI1). Additionally, a greater VFA production at 6 hours of incubation was observed for cardoon compared with soybean seeds, thus indicating a more rapid fermentation of cardoon seeds.

There were no “treatment x NI” interactions in the comparison of the 3

treatments including soybean seed (extracted meal, whole seed, and extracted meal plus free oil) for any substrate, and no important effects NI were detected. The addition of fat (whole seed or free oil) produced only subtle effects on in vitro fermentation compared with that of substrates including extracted meal (control treatment), as only a lower production of gas and greater butyrate production and ammonia concentrations were observed by adding fat to the “dairy” substrate. In contrast, there were marked differences in fermentation due to the method of oil incorporation (whole seed or free oil). For the “dairy” substrate, adding free oil increased VFA production (total and individual VFA) and the amount of OMF at 17 hours of incubation. Similar effects were observed for the “fattening” substrate at 6 hours, but after 17 hours of incubation only increases of gas production, ammonia concentrations and acetate/propionate ratios were detected. These results would indicate that the incorporation of free oil did not negatively affect ruminal fermentation, but increased the amount of OMF compared with the incorporation of the same amount of oil in the whole seed. The effects were more pronounced at 17 hours of incubation for the “dairy” substrate and at 6 hours of incubation for the “fattening” substrate.

The effects of the 3 tested treatments varied with the type of substrate type (dairy or fattening) for sunflower seed. Whereas no “treatment x NI” interactions were detected for the “dairy” substrate, significant interactions for most of the measured parameters were observed with the “fattening” substrate. With “dairy” substrate, no effects of either NI or fat addition (whole seed or free oil) were observed, but similarly to that observed for the soybean seed, adding free oil increased the production of some VFA (propionate, butyrate, valerate and isobutyrate) at 17 hours of incubation compared with the whole seed treatment. With the “fattening” substrate, the NI2 reduced the production of acetate and propionate at 6 hours of incubation compared with the NI1 treatment, but these differences disappeared by the end of the incubation period. The addition of fat (whole seed or free oil) to “fattening” substrate also decreased the production of some VFA (butyrate, valerate and isobutyrate) at 6 hours of incubation, but again no differences were noted by the end of the incubation. These results would indicate that the effects of sunflower oil are more pronounced at early incubation times. Significant “treatment x NI” interactions were detected for gas and methane production, because fat addition at NI1 increased both of them and decreased both productions at NI2. Compared with the whole seed inclusion, adding free oil increased the production of gas and VFA (total and some individuals), as well as the

amount of OMF after 17 hours of incubation.

No “treatment x NI” interactions were detected for cardoon seed with any substrate. In addition, the NI had no important effects, with the exception that acetate/propionate ratio was lower for NI2 compared with NI1 for the “fattening” substrate. Adding fat, either as whole seed or as free oil, had negligible effects on in vitro fermentation parameters of control substrates, as it was only observed a reduction of methane production and an increase of propionate production at 17 hours of incubation with the “fattening” substrate. Compared with the inclusion of the whole seed, the incorporation of free oil reduced the production of methane with the “fattening” substrate and a similar trend was observed for the “dairy” substrate. The observed reduction in methane production was more pronounced for NI2 than for NI1. In summary, the results indicated few differences in the in vitro fermentations of substrates containing the three oilseeds at the same fat level. In general, there were more effects with the “fattening” substrate than with the “dairy” substrate, which may be due to differences in the susceptibility of the microorganisms present in the inocula to added fat. In addition, with “fattening” substrate there were more effects at 6 than at 17 hours of incubation, being the opposite found for the “dairy” substrate. The oil from cardoon seed was the only one that reduced the production of methane, although this effect was only observed with the “fattening” substrate.

Abréviations

AGV: Acides gras volatils

ADF: fibre acide détergente

ADL: lignine acide détergente.

CO₂: Dioxyde de carbone

CH₄: Méthane

ETM: Ecart type de la moyenne

MAT: Matières azotés totales

MG: Matières grasses

MO: Matière organique

MOF: Matière organique fermentée

NI: Niveau d'incorporation des lipides

N-NH₃: Azote ammoniacal

NDF: Fibre neutre détergente

Tableau des matières

I. Introduction et objectives	1
II. Révision bibliographique	5
2.1. Origine du méthane entérique	5
2.2. Méthanogénèse ruminale : une perte d'énergie	5
2.3. Facteurs influençant les productions de CH ₄ chez les ruminants	6
2.4. Addition de lipides	6
2.5. Action inhibitrice des lipides	7
2.6. Potentiel de sources lipidiques à réduire la méthanogénèse ruminale	8
2.7. Réponse de la production de méthane à l'apport lipidique	8
2.8. Limites d'utilisation de lipides	10
III. Matériels et Méthodes	13
3.1. Substrats	13
3.2. Animaux, rations et collecte du jus du rumen	15
3.3 Incubations <i>in vitro</i>	16
3.4. Analyses des échantillons	18
3.5. Analyses statistiques	19
IV. Résultats et discussion	21
4.1. Composition chimique des graines oléagineuses	21
4.2. Comparaison entre les graines oléagineuses	22
4.3. Forme d'incorporation de lipides d'oléagineuses «Huiles vs Graines»	30
V. Conclusions	49
VI. Références bibliographiques	51

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition chimique des matières premières utilisées pour les substrats.....	14
Tableau 2. Profils en acides gras des graines et des huiles de soja, de tournesol et de cardon.....	14
Tableau 3. Composition des substrats contenant des graines entières d'oléagineuses en fonction du niveau d'incorporation des lipides.....	15
Tableau 4. Composition des solutions utilisées pour préparer le milieu de culture.....	17
Tableau 5. Effet de l'incorporation de graines entières d'oléagineuses selon deux niveaux d'incorporation de lipides dans le substrat « Lait » sur les fermentations ruminales et la production de gaz.....	24
Tableau 6. Effet de l'incorporation de graines entières d'oléagineuses selon deux niveaux d'incorporation de lipides dans le substrat «Engraissement» sur les fermentations ruminales et la production de gaz.....	26
Tableau 7. Effet de l'incorporation de soja sous forme d'huile ou de graines selon deux niveaux d'incorporation de lipides dans le substrat «Lait» sur les fermentations ruminales et la production de gaz.....	32
Tableau 8. Effets de l'incorporation de lipides de soja sous forme d'huile ou de graines selon deux niveaux d'incorporation de lipides dans le substrat «Engraissement» sur les fermentations ruminales et la production de gaz.....	34
Tableau 9. Effet de l'incorporation de lipides de tournesol sous formes d'huile ou de graines selon deux niveaux d'incorporation de lipides dans le substrat «Lait» sur les fermentations ruminales et la production de gaz.....	36
Tableau 10. Effet de l'incorporation de lipides de tournesol sous forme d' huile ou de graines selon deux niveaux d'incorporation de lipides dans le substrat «Engraissement» sur les fermentations ruminales et la production de gaz.....	38
Tableau 11. Effets de l'incorporation de lipides de cardon sous forme d'huile ou de graines selon deux niveaux d'incorporation de lipides dans le substrat «Lait» sur les fermentations ruminales et la production de gaz.....	42
Tableau 12. Effets de l'incorporation de lipides de cardon sous forme d'huile ou de graines selon deux niveaux d'incorporation de lipides dans le substrat «Engraissement» sur les fermentations ruminales et la production de gaz.....	44

I. INTRODUCTION ET OBJECTIVES

Le réchauffement de la planète est devenu un problème très préoccupant, les températures mondiales ayant augmenté de 0.8°C entre 1880 et 2013 (NASA, 2014). Ce phénomène est causé par les gaz à effet de serre qui piègent la chaleur du soleil réfléchie par la surface de la terre avant qu'elle ne soit libérée dans l'espace (FAO, 1997). Les gaz à effet de serre comprennent le dioxyde de carbone (CO_2), le méthane (CH_4), l'oxyde d'azote (N_2O), l'ozone (O_3) et d'autres gaz (FAO, 1997). Leurs effets potentiels sur le phénomène de réchauffement varient sensiblement d'un gaz à l'autre (FAO, 1997). Le CH_4 est le deuxième gaz à effet de serre en importance après le CO_2 . Il reste moins longtemps dans l'atmosphère que le gaz carbonique (FAO, 2002) et sa concentration est très inférieure à celle du CO_2 (Martin et al, 2006). Cependant, son pouvoir d'échauffement est environ 21 fois plus élevé par unité de poids que celui du CO_2 , et il représente donc un important facteur à court terme du réchauffement de la planète (FAO, 2002). En effet, le méthane contribue à raison de 20% à l'effet de serre (Martin et al, 2006). Selon le rapport de la FAO (2006a), la concentration actuelle de méthane dans le monde est de l'ordre de 1,728 ppm et elle a augmenté d'environ 150 % depuis 1750, bien que le taux d'accroissement ait diminué récemment. L'augmentation des émissions de CH_4 affecte la santé des êtres humains et de l'environnement et, comme ce gaz possède une grande capacité d'absorption des rayons infrarouges, c'est un gaz à effet de serre particulièrement dangereux (FAO, 1997). A l'échelle mondiale, l'Asie est la première région émettrice de méthane, alors que la Chine, l'Inde, les États Unies, l'Union Européen et le Brésil sont les 5 premiers pays émetteurs de méthane (Bracmort et al, 2011).

Il existe à la fois des sources naturelles et anthropiques des émissions de méthane. Les principales sources naturelles incluent les zones marécageuses, les termites et les océans. Quant aux sources anthropiques, elles comprennent l'élevage et le traitement de ses effluents, la culture du riz, la production et la distribution de pétrole et de gaz (pipelines), l'extraction du charbon et l'enfouissement des déchets (FAO, 1997). L'Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) a estimé qu'un peu plus de la moitié des émissions de méthane sont anthropiques (FAO, 2006). Les émissions anthropiques de méthane mondiales sont estimées à 320 millions de tonnes de CH_4/an (FAO, 2006). La FAO (2006a) a rapporté que l'élevage, est la première source mondiale des émissions de méthane anthropiques.

Non seulement, l'élevage est responsable des 37% des émissions anthropiques de CH₄, mais aussi il génère 9% des émissions anthropiques de CO₂ et 65% des émissions d'oxyde nitreux (N₂O). De ce fait, l'élevage contribue à 18% (7,1 milliards de tonnes d'équivalent CO₂) des émissions de gaz à effet de serre au niveau mondial, soit plus que les transports (FAO, 2006 b).

Les émissions de CH₄ dues à l'élevage proviennent principalement de la fermentation entérique et la décomposition des déjections, qui représentent ensemble, environ 80% des émissions agricoles de méthane et à peu près 35-40% de l'ensemble des émissions anthropiques de CH₄. Cependant, la part relative de la fermentation entérique dans les émissions mondiales de CH₄ est plus importante que celle de la décomposition des excréments. En effet, les émissions de CH₄ provenant de la fermentation entérique sont estimées à 86 millions de tonnes par an, alors que celles issues des lisiers et des fumiers sont évaluées à 18 millions de tonnes par an (FAO, 2006a). La production de CH₄ par la fermentation entérique est le résultat de la dégradation en anaérobiose de la biomasse végétale ingérée par les micro-organismes présents dans certaines cavités du tube digestif : le gros intestin et le coecum, d'une part, et le réticulo-rumen, d'autre part (Sauvant, 1992). Donc, tous les animaux d'élevage produisent de CH₄. Néanmoins, au sein des émissions de CH₄ imputables à la fermentation entérique, les ruminants émettent les quantités plus grandes (84.52 millions de tonnes) comparativement aux monogastriques qui sont responsables de 1.11 million de tonnes en 2004 (FAO, 2006a).

Malgré ses impacts environnementaux de grande envergure, l'élevage n'est pas une force principale dans l'économie mondiale, engendrant à peine 1,5 pour cent du PIB total. Toutefois, le secteur de l'élevage est socialement et politiquement très important: Il fait vivre un milliard de pauvres dans le monde, notamment dans les zones arides, où les animaux d'élevage représentent souvent la seule source de moyens d'existence (FAO, 2006b). Non seulement, l'élevage assure environ 40% de la production agricole mondiale, mais aussi il croît plus vite que tout autre sous-secteur agricole (FAO, 2006c). Effectivement, la demande de viande et de lait augmente rapidement en raison de la croissance de la population et des revenus dans le monde entier, de l'évolution des préférences alimentaires et de la mondialisation qui alimente le commerce d'intrants et d'extrants (FAO, 2006b).

Il est prévu que la production mondiale de viande doublera, en passant de 229 millions de tonnes en 1999/2001 à 465 millions de tonnes en 2050, alors que celle de

lait augmentera de 580 à 1 043 millions de tonnes (FAO, 2006c).

Mais, la croissance rapide du secteur de l'élevage fait payer à l'environnement un prix élevé. Selon le rapport de la FAO (2006a), les coûts environnementaux par unité de production animale doivent être réduits de moitié pour éviter d'aggraver le niveau des dégâts. Ainsi, la recherche d'un équilibre entre l'élevage et l'environnement est indispensable. En effet, depuis plusieurs années, de nombreux leviers d'action ont été testés dans le monde entier pour diminuer les émissions de CH₄ par les animaux d'élevage en particulier les ruminants. Parmi les stratégies de réduction de la méthanolégénèse chez les ruminants, on peut citer la supplémentation des rations en lipides. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse de Master est l'étude de l'effet de l'incorporation des graines oléagineuses riches en acides gras insaturés (soja, tournesol, cardon) sur la réduction de la méthanolégénèse ruminale. Cet objectif est basé sur l'hypothèse suivante:

L'ajout des lipides ceux surtout riches en acides gras insaturés à la ration diminue la production de méthane en captant de l'hydrogène pour saturer les acides gras et en exerçant également un effet toxique sur les protozoaires, les archées et les bactéries Gram (+). Aussi, l'adsorption des lipides sur les particules des aliments réduit la densité des méthanologènes et d'autres micro-organismes, en particulier les bactéries fibrolytiques, ce qui peut entraîner une diminution de la digestibilité, de l'ingestion ainsi que de la productivité animale. Encore, l'augmentation de niveau de lignification de graines oléagineuses utilisées rend les acides gras moins accessibles aux micro-organismes, ainsi leurs effets toxiques sur les bactéries fibrolytiques diminuent. Aussi, on a examiné l'effet de forme de présentation de l'oléagineuse (graines entières vs tourteau + quantité équivalente de lipides sous forme d'huile) sur son potentiel à réduire le méthanolégénèse.

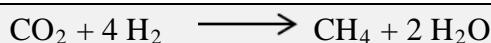
II. REVISION BIBLIOGRAPHIQUE

2.1. Origine du méthane entérique

Le méthane d'origine digestive chez les ruminants est un sous-produit de la dégradation anaérobiose de la biomasse végétale ingérée par les microorganismes présents dans le rumen. Mais, c'est uniquement grâce à ces populations de micro-organismes que les ruminants sont capables de tirer un profit nutritionnel de l'énorme biomasse constituée par les parois végétales (Sauvant, 1992).

En anaérobiose, les réactions d'oxydation par les déshydrogénases bactériennes génèrent de l'ATP nécessaire à la croissance des microorganismes et conduisent à la production d'hydrogène métabolique (Jouany, 2010). Ce dernier se trouve dans la cellule sous différentes formes de cofacteurs réduits comme le NADH, NADPH, FADH. La forme oxydée de ces cofacteurs (NAD+, NADP+, FAD+) doit être ensuite régénérée pour que les fermentations puissent se poursuivre. Cette dernière étape mène à la formation d'hydrogène libre (H_2). Or, l'hydrogène formé doit être éliminé au fur et à mesure de sa production puisqu'une élévation de sa pression partielle inhiberait l'action des déshydrogénases impliquées dans le processus de réoxydation des cofacteurs réduits (Jouany et Thivend, 2008).

L'élimination nécessaire de l'hydrogène est assurée principalement par les archaea méthanogènes qui produisent du méthane selon la réaction suivante (Jouany, 2010):



Le méthane ainsi produit est rejeté dans l'atmosphère par voie orale (95%), au cours d'éruptions régulières et par les poumons après passage dans le sang, mais très peu par flatulences (5%) (Martin et al., 2006).

2.2. Méthanogénèse ruminale : une perte d'énergie

Non seulement le méthane entérique constitue un problème environnemental important, mais aussi il représente une perte de carbone et d'énergie pour l'animal. Suivant plusieurs auteurs, la fermentation d'1 kg de matière organique (OM), dans le rumen conduit à la production de :

- 6.5 Moles d'acétate (C2) représentant 1538 kcal
- + 3 Moles de propionate (C3) représentant 1101 kcal

- + 1 Mole de butyrate (C4) représentant 524 kcal
- + 2.9 Moles de CH₄ représentant 615 kcal
- + 6.7 Moles de CO₂ équivalentes à 150 L ou 295 g.

Ce bilan montre qu'au plan énergétique le ruminant peut tirer 3,15 Mcal des acides gras volatils et perdre 615 kcal sous forme de CH₄ à partir d'1 kg de MO fermentée qui correspond à 6.2 moles d'anhydro-glucose (CHO) représentant 4259 kcal. Ainsi, 14% de l'énergie totale fermentée dans le rumen, est perdue pour l'animal sous forme de méthane (INRA, 2008). Dans ce contexte, une réduction de la méthanogénèse pourrait représenter un gain d'efficacité alimentaire appréciable (Moletta, 2011).

Cependant, la production de CH₄ par les ruminants dépend de nombreux facteurs liés à l'animal (espèce, âge, stade physiologique, niveau d'ingestion ou niveau de production, etc.) ainsi qu'à l'alimentation (niveau d'alimentation, proportion de concentré, nature du fourrage et du concentré, etc.) (Jouany, 2010).

2.3. Facteurs influençant les productions de CH₄ chez les ruminants

D'une part, la production de méthane dépend de niveau alimentaire. En effet, la méthanogénèse diminue lorsque le niveau alimentaire augmente (INRA, 2008). D'autre part, plus la ration est digestible plus les pertes d'énergie sous formes de CH₄ sont importantes (Sauvant, 1992). Or, le niveau alimentaire (NA) augmente avec la digestibilité des rations. Ainsi, la production de méthane est soumise à ces deux paramètres dont les effets sont antagonistes. Aussi, Il est bien démontré que la fibrosité des rations favorise la méthanogénèse et, qu'à l'inverse, la teneur en concentré de type amylacé la diminue. Egalement, l'intensification de l'élevage réduit les émissions de méthane entérique du fait qu'une amélioration des performances des animaux diminue la production de méthane (Jouany, 2010). Finalement, Chez les bovins et les ovins, il est observé de fortes variations individuelles, y compris à l'intérieur d'un lot d'animaux recevant la même ration alimentaire, ce qui suppose l'influence de facteurs liés à l'hôte et probablement d'ordre génétique (Moletta, 2011).

2.4. Addition de lipides

A la différence des régimes riches en céréales, la supplémentation de la ration avec des lipides a l'avantage d'augmenter sa valeur énergétique sans provoquer des baisses importantes du pH ruminal (Popaya et al., 2011) s'ils sont distribués à un faible

niveau ou sous forme de sels d'acides (Jouany et Thivend, 2008). En outre, les lipides présentent le pouvoir d'augmenter la production de lait et de modifier son profil en acides gras (Boadi et al., 2004) et lorsqu'ils sont riches en acides gras polyinsaturés, d'améliorer la valeur santé des produits animaux consommés par l'homme (INRA, 2008). Aussi, ils peuvent entraîner une amélioration des performances des animaux dans certains cas (Beauchemin et al., 2008). Finalement, les lipides présentent un potentiel de réduire la méthanoléfaction ruminale, auquel cette étude s'intéresse.

Il y a un intérêt croissant pour l'utilisation des lipides comme stratégie pour réduire les émissions de CH₄ (Beauchemin et al., 2008). À ce propos, Popayaet et al. (2011) considèrent que l'apport de lipides est une piste intéressante et facilement applicable en pratique. Également, selon Jouany et Thivend (2008), les acides gras ou certains lipides semblent les additifs alimentaires utilisés pour diminuer la méthanoléfaction les plus prometteurs à la fois par leur efficacité et par leur caractère naturel.

Malgré les divergences sur les chiffres, l'efficacité des acides gras dans la réduction de la méthanoléfaction ruminale est incontestable (Jouany et Thivent, 2008). Eugène et al (2008) et Giger-Reverdin et al (2003), ont observé respectivement des diminutions moyennes de 1,7 et 2,2% de la production de méthane par kg de MS ingérée lorsque la teneur en lipides augmente d'un point, c'est à dire de 1% dans la MS de la ration pour les vaches laitières. Il faut mentionner que dans l'étude d'Eugène et al (2008), cette diminution est non significative lorsque le méthane est exprimé par rapport kg de MS ingérée, mais elle l'est lorsque le méthane est exprimé par rapport à l'énergie brute ingérée. Dans une revue, synthétisant 67 régimes enrichis en lipides tirés de 28 études, Martin et al (2010) ont noté une diminution moyenne de 3,8% de méthane par kg de MS ingérée, par point de lipides supplémentaires. Dans une autre revue basée sur 17 publications, Beauchemin et al (2008) ont enregistré une réduction de production de méthane par kg de MS ingérée de 5,6% par point de lipides supplémentaires dans la ration pour différentes espèces de ruminants.

2.5. Action inhibitrice des lipides

Les lipides diminuent la production de méthane en inhibant l'adhésion des bactéries cellulolytiques à la cellulose ce qui réduit leur efficacité (Moletta, 2011). Également, l'adsorption des acides gras sur les membranes cellulaires des microbes entraîne une inhibition partielle du passage des nutriments essentiels et semble

responsable de l'effet toxique (Demeyer et Fievez, 2000). Aussi les acides gras insaturés sont susceptibles de jouer le rôle de puits à hydrogène et d'entrer en compétition avec la méthanolécine (Moletta, 2011). Cependant, Martin et al (2006) ont rapporté que la quantité d'hydrogène utilisée pour réduire les acides gras insaturés n'intervient que de manière très limitée dans la diminution de la production de méthane.

2.6. Potentiel de sources lipidiques à réduire la méthanolécine ruminale

Les études *in vivo* qui ont révélé des réductions considérables de la méthanolécine à l'ajout de lipides sont nombreuses et diverses. Ces études ont touché les bovins (Jordan et al., 2006abc; Beauchemin et al., 2009; Grainger et al., 2010) ainsi que les ovins (Machmüller et al., 2000; Mao et al., 2010). Certaines études qui ont concerné les bovins (Machmüller et al., 2000; Jordan et al., 2006a; Beauchemin et al., 2009; Grainger et al., 2010) ont révélé des diminutions des émissions de méthane entre 16 et 26% avec des huiles ou graines (coton, colza, coprah) sans effets indésirables observés sur les conditions ruminales, la digestibilité ou le niveau de production. Par contre, dans d'autres études ces diminutions ont été associées des réductions de la digestibilité ou du niveau de production chez les bovins (Jordan et al., 2006bc; Beauchemin et al., 2009) et chez les ovins (Machmüller et al., 2000; Mao et al., 2010).

Les études *in vitro* qui ont montré l'efficacité de l'addition des graines ou huiles riches en acides gras insaturés à abaisser la production de méthane sont aussi nombreuses. Parmi les essais qui n'ont pas rapporté des effets indésirables sur les conditions ruminales, il est possible de citer ceux de Cieslak et al (2006a) avec d'huile de colza, Cieslak et al (2006b) avec d'huile de coprah et Cieslak et al. (2013) avec d'huile de pépins de raisin et d'huile de pépins de cassis. Pour d'autres essais qui ont utilisé des niveaux similaires des graines ou des huiles des effets négatifs sur les conditions ruminales ou la digestibilité ont été observés (Dong et al., 1997; Dohme et al., 2000, 2001). Finalement, des études *in vitro* ont montré une efficacité des acides gras pures (oléique, linoléique et α -linoléique) à abaisser la méthanolécine sans effets négatifs sur les conditions ruminales (Jalc et al., 2007) ou avec des réductions de la fermentation (Soliva et al., 2003).

2.7. Réponse de la production de méthane à l'apport lipidique

La réponse de la production de méthane à l'apport lipidique est variable de fait

qu'il dépend de nombreux facteurs notamment la nature et la quantité de lipides ajoutés.

Dans une revue de synthèse basée sur 17 études, Beauchemin et al (2008) ont mis en évidence que la quantité de lipides ajoutés explique 67% de la réduction des émissions de CH₄. Ils ont également observé une variation considérable de la réduction de la production de méthane entre les sources de lipides, avec la réduction la plus importante est pour l'huile de coprah (63,8% avec 7% d'huile ajouté) puis pour l'acide mystique (58,3% avec 5% de lipides ajoutés).

De même, l'effet anti-méthanogène dépend de la nature de lipides ajoutés. En effet, une revue de synthèse réalisée par Doreau et al., (2011), récapitulant 82 régimes enrichis en lipides tirés de 33 études, montre que la réduction de la méthanogénèse est la plus importante pour les acides gras à chaîne moyenne (apportés par le coprah, 8,5% par point de lipides supplémentaires c'est-à-dire de 1% dans la matière sèche de la ration), puis pour l'acide linolénique (apporté par le lin, 5,6% par point de lipides supplémentaires), puis pour l'acide linoléique (apporté par le tournesol et le soja, 4 % par point de lipides, supplémentaires). Les acides gras mono-insaturés comme l'acide oléique (apporté par le colza), les acides gras saturés, palmitique et stéarique (savons de calcium d'huile de palme, graisses cristallisées) ont un effet plus restreint. La revue montre également que dans un nombre limité d'essais l'apport de lipides entraîne une légère augmentation de la méthanogénèse par kg de MS, probablement en raison d'interactions avec le reste de la ration.

La forme de distribution de lipides possède aussi un impact important sur la quantité de méthane émise par les animaux. Effectivement, Martin et al (2008) ont rapporté que la méthanogenèse étant d'autant plus diminuée que la disponibilité de l'acide linoléique apporté par le lin dans le rumen est importante (huile > graine de lin extrudée > graine de lin crue).

Bien que les huiles pures puissent être plus efficaces contre le méthane plus que la même quantité de lipide administrée via graines broyées et entières d'oléagineux sont préférés en raison de ses moindres effets indésirables sur l'ingestion et la digestibilité des fibres (Beauchemin et al, 2008).

Les données sur l'effet de la composition de la ration sur la réponse de la production de méthane à l'apport lipidique sont fragmentaires et contradictoires. Martin et al (2009) ont observé que la diminution de méthane avec des apports croissants de graine de lin est plus importante avec une ration à base de foin qu'avec une ration à base d'ensilage de maïs. Cependant, Chung et al (2011) ont rapporté que la réduction de la

production de méthane est plus prononcée avec de l'ensilage d'orge qu'avec du foin. Confirmant ce résultat, Lovett et al (2003) ont mis en évidence qu'à avec des acides gras à chaîne moyenne la baisse de la méthanogénèse est plus importante avec une ration riche en concentré qu'avec une ration riche en fourrage.

Le type de ruminant choisi peut aussi expliquer en partie la variation de la réponse de la production de méthane à l'apport lipidique, puisque le profil de fermentation et la population microbienne dans le rumen diffèrent entre bovins et ovins (Rasmussen et Harrison, 2011).

Ce point a été souligné par les essais testant l'effet de la supplémentation en huile de coprah, puisque la population de protozoaires a été réduite et les proportions d'acétate et de butyrate ont diminué chez les agneaux (Machmüller et al., 2000), tandis qu'il n'y a eu aucun effet sur la population microbienne et la concentration en acides gras chez des génisses de boucherie (Jordan et al., 2006b).

Des résultats similaires ont été observés chez des agneaux recevant une ration supplémentée avec l'huile de soja, où le résultat est une baisse de nombre de protozoaires et de méthanogènes, une réduction de la digestibilité et une augmentation de la concentration totale en AGV (Mao et al., 2010), alors que il n'y aucun effet sur la production des AGV ou la population microbienne chez des taurillons recevant une ration enrichie en huile de soja (Jordan et al., 2006c).

La durée de l'essai, le nombre des animaux et l'utilisation de différentes méthodes de quantification des émissions de méthane, pourraient également affecter les résultats des essais.

Ainsi, en raison de la forte variabilité entre les protocoles expérimentaux, il est difficile de tirer des conclusions définitives concernant l'impact de l'addition des lipides sur la production de méthane par un simple coup d'œil sur la littérature disponible (Rasmussen et Harrison, 2011).

2.8. Limites d'utilisation de lipides

Bien que les lipides aient un effet persistant sur la méthanogenèse, ils peuvent aussi avoir un effet négatif sur la digestion ruminale en particulier de la fraction cellulosique ceux-ci sont ajoutés à la ration à des niveaux importants ($> 6\%$ MS ingérée), ce qui peut représenter un facteur limitant à leur utilisation (Martin et al., 2006). De même, quoique les acides gras saturés à chaîne moyenne se révèlent efficaces pour réduire la production de méthane, ils ont une action négative sur la valeur santé des

produits animaux destinés à la consommation humaine (INRA, 2008). Effectivement, Doreau et al. (2011) ont rapporté qu'un apport excessif de lin peut se traduire par une réduction du niveau d'ingestion des animaux, une augmentation de certains AG mono-insaturés trans dans les produits, et par une tendance à la peroxydation des lipides.

Également, les huiles raffinées contenant les acides gras à chaîne moyenne sont peu susceptibles d'être utilisées commercialement par les éleveurs comme une stratégie pour réduire la méthanolécine en raison du coût. Aussi, bien que les oléagineux et les graisses animales soient souvent moins chers que les huiles raffinées, les oléagineux ne sont pas considérablement endommagés durant la mastication, et exigent un traitement mécanique avant la distribution aux animaux, pour assurer que les lipides interagissent avec les populations bactériennes. Encore, lorsque les animaux sont conduits en pâturage, la supplémentation lipidique des rations devient difficile.

Finalement, lorsque les lipides sont incorporés dans la ration des vaches laitières à des niveaux importants, ils peuvent réduire le taux de matière grasse du lait et modifier leurs profils en acides gras. Par conséquent, des précautions doivent être prises afin de choisir la source de lipides, et le niveau de supplémentation appropriés (Beauchemin et al, 2008).

III. MATERIELS ET METHODES

L'expérimentation a été conduite dans le Département de Production Animale de l'Université Polytechnique de Madrid.

3.1. Substrats

L'étude a concerné 3 types de graines oléagineuses présentant des teneurs en fibres et des niveaux de lignification différents: le soja (un niveau minimal), le tournesol (un niveau élevé) et le cardon (*Cynara cardunculus L*, un niveau maximal). Également, l'étude a été réalisée en utilisant 2 types de substrats : Un substrat «Engrassement» composé de 85% MS de concentré et de 15% MS de paille de blé, et un substrat «Lait» composé de 60% MS de concentré et de 40% MS de fourrage formé du mélange foin de luzerne et foin de triticale en relation 1:4 en % de MS. Dans le cas le plus complexe, les concentrés ont été composés de : i) graines oléagineuses de telle sorte qu'elles apportent aux concentrés soit 2.75 (NI1) soit 5.5% (NI2) MS de lipides, ii) mélange de blé et maïs en relation 1:1 en % de MS, iii) tourteau d'extraction de la graine en étude et iv) tourteau de soja. Chaque graine a été ajoutée au concentré sous 3 formes différentes: i) graines entières, ii) tourteau de la graine (traitement témoin sans lipides) iii) tourteau + huile de la graine. Les quantités des différents constituants sont fixées de façon que les substrats soient isoazotés. Pour les traitements témoins les graines d'oléagineuses ont été remplacées par les tourteaux correspondants, diminués des quantités équivalentes à celles d'huile incorporées en cas des traitements «huile + tourteau» (relatif au substrat «Engrassement», 8,2 et 16,4 mg pour NI1 et NI2, respectivement; relatif au substrat «Lait», 5,8 et 11,6 mg pour NI1 et NI2, respectivement). Cette huile a été dissoute dans 100 µl d'éthanol dans les traitements tourteaux + huile.

Toutes les composantes des substrats ont avant tout été broyées à 1 mm. L'extraction des huiles de graines oléagineuses ainsi que l'obtention des tourteaux ont été réalisées par l'éther pendant 2 heures à l'aide d'ANKOM^{XT10} Extraction system. Pour ce faire, une quantité suffisante d'échantillon a été introduite dans des cartouches de cellulose. La composition chimique des matières premières est indiquée dans le Tableau 1 alors que les profils en acides gras des huiles et des graines oléagineuses figurent dans le Tableau 2.

Matériels et méthodes

Tableau 1. Composition chimique (g/kg MS) des matières premières utilisées pour les substrats

	MO	MAT	MG	NDF	ADF	ADL
Graines de soja	942	419	209	152	77,4	4,4
Graines de tournesol	969	179	467	292	159	53,6
Graines de cardon	956	162	264	345	274	75,8
Tourteau de soja	934	531	0,0	192	97,8	5,6
Tourteau de tournesol	942	346	0,0	560	306	100
Tourteau de cardon	951	218	0,0	468	372	103
Céréale ¹	985	88,2	26,9	189	31,2	6,5
Foin ²	908	114	2,4	556	316	44,0
Paille de blé	807	27,0	1,8	713	404	64,2

MO: matière organique; MAT: matières azotés totales; MG: matières grasses; NDF: fibre neutre détergente; ADF: fibre acide détergente; ADL: lignine acide détergente.

¹Mélange 1/1 de blé et maïs (MO: 985/986; MAT: 100/76,0; MG: 16,6/37,2; NDF: 278/100; ADF: 38,8/23,6; ADL: 9,5/3,6).

²Mélange 80/20 des foins de triticale et luzerne (MO: 914/886; MAT: 95,8/189; MG: 23,8/25,6; NDF: 587/433; ADF: 315/317; ADL: 37,4/70,3).

Tableau 2. Profils en acides gras (AG; g/100 g de MG analysés) des graines (G) et des huiles (H) de soja, de tournesol et de cardon

Graine:	Soja		Tournesol		Cardon	
Echantillon:	H	G	H	G	H	G
C14:0	0,09	0,10	0,08	0,07	0,10	0,12
C16:0	11,5	13,1	6,40	6,40	10,3	11,6
C16:1	0,11	0,16	0,08	0,09	0,13	0,20
C17:0	0,09	0,12	0,05	0,05	0,07	0,10
C17:1	0,07	0,04	0,03	0,04	0,03	0,05
C18:0	3,52	3,59	3,54	3,51	3,61	3,68
C18:1n-9	27,5	25,4	21,0	20,7	26,0	24,5
C18:1n-7	1,03	1,02	0,43	0,40	1,61	0,71
C18:2n-6	49,9	50,1	67,8	68,2	57,5	58,3
C18:3n-3	5,56	5,70	0,11	0,10	0,09	0,10
C20:0	0,41	0,42	0,23	0,27	0,40	0,42
C20:1n-9	0,32	0,29	0,18	0,17	0,18	0,15
SAT	15,6	17,3	10,3	10,3	14,5	16,0
MUFA	29,0	26,9	21,8	21,4	28,9	25,7
PUFA	55,4	55,8	67,9	68,3	56,6	58,4
UI	145	144	158	158	142	142

SAT: acides gras saturés ; MUFA: acides gras monoinsaturés; PUFA : acides gras polyinsaturés; UI: indice d'insaturation.

La composition des différents types de substrats contenant les graines entières d'oléagineuses, est indiquée dans le Tableau 3. Les quantités de composantes ont été fixées de manière qu'elles forment au total 350 mg de substrat pour chaque type de traitement expérimentale.

Tableau 3. Composition (mg) des substrats contenant des graines entières d'oléagineuses en fonction du niveau d'incorporation des lipides (NI)

Oléagineuse :	Soja		Tournesol		Cardon	
	NI1	NI2	NI1	NI2	NI1	NI2
Composante						
<i>«Engrassement»</i>						
Gr. soja	39,2	78,3	-	-	-	-
Gr. tournesol	-	-	17,5	35,0	-	-
Gr. cardon	-	-	-	-	31	62
T. soja	29,3	0	52,6	52,5	46,7	48,0
T. tournesol	-	-	9,3	0	-	-
T. cardon	-	-	-	-	22,8	0
Céréales	229	219	218	210	197	188
Paille de blé	52,5	52,5	52,5	52,5	52,5	52,5
<i>«Lait»</i>						
Gr. soja	27,65	55,29	-	-	-	-
Gr. tournesol	-	-	12,4	24,7	-	-
Gr. cardon	-	-	-	-	21,9	43,8
T. soja	34,4	13,7	53,0	53,3	49,0	50,0
T. tournesol	-	-	6,6	0	-	-
T. cardon	-	-	-	-	16,1	0
Céréales	148	141	138,0	132,0	123	116,2
Foins	140	140	140	140	140	140

Pour les traitements témoins les graines d'oléagineuses ont été remplacées par les tourteaux correspondants, diminués des quantités équivalentes à celles d'huiles incorporées en cas des traitements «huile + tourteau» (8,2 et 16,4 mg et 5,8 et 11,6 mg pour les substrats «Engrassement» et «Lait» et les niveaux NI1 et NI2, respectivement).

3.2. Animaux, rations et collecte du jus du rumen

Quatre brebis (A, B, C, D) porteuses d'une fistule permanente au niveau du rumen (Âge: 3 ans et poids $62,4 \pm 11,54$ kg au début de l'expérimentation) ont été utilisées et alimentées (2 repas par jour à 9 et 17 heures) avec une des deux rations:

- Une ration (1) similaire au substrat «Engrassement», formé d'aliment composé granulé et de paille de blé en relation 85 :15 par rapport à la matière brute.
- Une ration (2) similaire au substrat « Lait », formé du mélange 60% du même aliment composé, 32% de foin de triticale et 8% de foin de luzerne en % de la matière brute.

Les animaux ont été adaptés aux rations 10 jours avant les prélèvements de liquide de rumen. La quantité distribuée est fixée selon le poids vif de l'animal. Aussi, les brebis ont eu un accès permanent à l'eau potable. Les animaux ont été manipulés selon les protocoles approuvés par le comité de soin et d'utilisation des animaux de l'Université Polytechnique de Madrid.

L'expérimentation a été menée dans un protocole croisé (cross over). Pour ce faire, les prélèvements ont été réalisés à la fin de deux périodes successives, d'une semaine chacune. Au cours de la première, les brebis A et B ont été adaptées à la ration (1) alors que les brebis C et D ont reçu la ration (2). Pendant la deuxième période, le traitement des brebis a changé, les brebis A et B ont été alimentés avec la ration (2) alors que les brebis C et D ont reçu la ration (1).

Les prélèvements de jus de rumen ont été effectués avant l'administration du 2^{ème} repas du jour. Une fois le liquide ruminal a été prélevé, il a été filtré avec un morceau de gaze replié 2 fois sur lui-même, introduite dans des thermos et immédiatement transféré au laboratoire afin de maintenir la température et éviter le contact avec l'air.

3.3 Incubations *in vitro*

Pour chaque traitement expérimental, les 4 différents inocula correspondants aux 4 brebis ont été utilisés. Et pour chaque inoculum, 2 flacons de verre de 120 ml ont été utilisées (une pour mesurer la concentration du méthane et l'autre pour les analyses de la concentration en acides gras volatils (AGV) et de l'azote ammoniacal (NH₃-N)).

Comme dans les flacons correspondants aux traitements «huile + tourteau» les quantités d'huiles incorporées ont été dissoutes dans 100 µl d'éthanol, et afin que les conditions de fermentations de microorganismes soient identiques, 100 µl d'éthanol ont été ajoutés au reste des flacons.

Par ailleurs, le pH de liquide ruminal prélevé de chaque brebis a été mesuré. Puis, le liquide ruminale a été mélangé avec le milieu de culture en proportion 1:4 (V/V). Ce milieu de culture, est celui qui a été décrit par Goering et Van Soest (1970) sans trypticase. Pour la préparation d'un litre de ce milieu, il faut ajouter successivement 475.0 ml d'eau distillée, 237.5 ml d'une solution minérale, 1.25 ml d'une solution d'oligo-éléments, 237.5 ml d'une solution tampon, 1.25 ml d'une solution de

résazurine et 47,5 ml d'une solution réductrice. La composition de chacune des solutions utilisées figure dans le Tableau 4.

Tableau 4. Composition des solutions utilisées pour préparer le milieu de culture (Goering and Van Soest, 1970)

Solutions	g/l
<i>Solution minérale</i>	
Na ₂ HPO ₄	5,7
KH ₂ PO ₄	6,2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,6
<i>Solution d' oligo-éléments</i>	
CaCl ₂ .2H ₂ O	13,2
MnCl ₂ .4H ₂ O	10,0
CoCl ₂ .6H ₂ O	1,0
FeCl ₃ . 6H ₂ O	8,0
<i>Solution tampon</i>	
NaHCO ₃	37,0
(NH ₄)HCO ₃	2,0
<i>Solution de résazurine</i>	
Résazurine	1,0
<i>Solution réductrice</i>	
Cystéine-HCL	6,25
NaOH (1N)	40,0 ml
Na ₂ S	6,25

Il faut souligner que la préparation de milieu de culture ainsi que son mélange avec le liquide ruminal ont été réalisés en anaérobiose (élimination d'O₂ par barbotage de CO₂) et à une température de 39° C, afin de maintenir la croissance des micro-organismes.

Par la suite, 35 ml de l'inoculum obtenu a été introduite, à l'aide d'une pompe péristaltique (Watson Marlow 520 U) dans chaque flacon, en maintenant les mêmes conditions d'anaérobiose et de température. Après ce dosage, les flacons ont été fermés hermétiquement avec un bouchon en caoutchouc et scellés avec des capsules en aluminium. Également, les flacons ont été bien agités afin d'assurer le bon mélange de l'inoculum avec le substrat et placés dans un incubateur à 39° C. Pour chaque brebis, 2 flacons qui contenaient uniquement l'inoculum, ont aussi été incubés (flacons témoins blanc).

À 6 heures d'incubation, la pression et le volume de gaz produit des flacons réservés au contrôle des acides gras et de l'ammoniaque (sans les ouvrir) ont été

mesurés. Aussi, un échantillon (1,5 ml) a été pris et placé dans un eppendorf de 2 ml contenant 30 µl d'acide sulfurique. Ces eppendorfs ont immédiatement été congelés à - 20° C pour une analyse ultérieure des produits de fermentation (AGV et NH₃-N).

À 17 heures d'incubation, la pression et le volume de gaz produit de tous les flacons ont été mesurés. Également, des échantillons de gaz ont été prélevés des flacons destinés au contrôle du méthane, et mis dans des tubes à vide. Aussi, les flacons antérieurement utilisés à 6 heures d'incubation ont été ouverts pour mesurer le pH, et des échantillons de leurs contenus ont de nouveau été prélevés.

La pression et le volume de gaz ont été mesurés à l'aide d'un manomètre Delta Ohm HD2304.0 et d'une seringue en plastique graduée, respectivement.

Pendant l'expérimentation, les flacons utilisés sont au total 304, dont 288 avec substrat et 16 sans substrat. De même, 608 échantillons ont été prélevés, dont 304 pour l'analyse de la concentration en AGV et 304 pour l'analyse de NH₃-N. Également, 152 échantillons de gaz ont été pris afin de déterminer leurs concentrations en méthane.

3.4. Analyses des échantillons

La composition chimique des matières premières en MS, en matières azotées totales (Dumas ; N×6.25) et en matières grasses ont été réalisés suivant les méthodes d'AOAC (2000). Quant aux teneurs en FND, FAD et LAD, elles ont été analysées selon la technique séquentielle de Van-Soest et al (1991), en adoptant les modifications proposées par ANKOM Technology.

La composition en acides gras des matières grasses est déterminée par chromatographie en phase gazeuse. Ce technique nécessite au préalable la conversion des acides gras en esters méthyliques plus volatils, afin d'améliorer la séparation des composés et la résolution des pics. Les esters méthyliques d'acide gras ont été obtenus à partir des lipides isolés en chauffant les échantillons des graines et des huiles à 80°C pendant 1 heure dans 3 ml de méthanol/ toluène/ H₂SO₄ (88 :10 : 2 en volume) (García et Mancha, 1993). Après le refroidissement, 1 ml d'hexane a été ajouté et les échantillons ont été mélangés. Les esters ont été récupérés à partir de la phase supérieure, séparés et quantifiés en utilisant un chromatographe en phase gazeuse (HP 6890 Series GC System) muni d'un détecteur à ionisation de flamme. La séparation a été réalisée avec une colonne de J&W GC, HP-Innowax Polyethylene Glycol (30m x 0.316

mm x 0.25 mm) en utilisant l'azote comme gaz vecteur. Les pics d'esters ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention avec ceux des standards (Sigma – Aldrich, Alcobendas, Espagne).

La concentration du méthane a été déterminée en injectant les échantillons de gaz (0.6 ml) dans une chromatographe en phase gazeuse (Shimadzu GC 14B) équipé avec détecteur à ionisation à flamme et une colonne garnie en Carboxen 1000 (maille 45-60; Supelco, Madrid, España), selon la méthodologie décrite par Martínez et al. (2010). La concentration du méthane a été déterminée en la comparant avec une concentration standard de CH₄ connue (10%).

Pour les analyses de la concentration en AGV et de NH₃-N, les eppendorfs ont été décongelés et centrifugés à une vitesse 15500 x g pendant 15 minutes à 4° C.

Pour la détermination de la concentration des AGV, 0.8 ml du liquide surnageant obtenu ont été prélevés et transférés dans un eppendorf (1.5 ml) contenant 0.5 ml d'une solution acidifiante et déprotéinisante (acide métaphosphorique (10%) et acide crotonique (0.06%) en acide chlorhydrique 0.5 N). Puis, ils ont été laissés à reposer pendant 12 heures au froid (4°C), et centrifugés dans les conditions antérieurement mentionnés avant de procéder à son transfert aux flacons de chromatographie.

La concentration des AGV (acides acétique, propionique, butyrique, isobutyrique isovalérique et valérique) a été déterminée par un chromatographe en phase gazeuse (Pelkin Elmer Autosystem XL), équipé d'un injecteur automatique, d'un détecteur à ionisation de flamme, et d'une colonne semi capillaire TR-FFAP de 30 m x 0.53 mm x 1 µm (Supelco, Barcelona, España).

La détermination de la concentration de NH₃-N a été réalisée par colorimétrie selon la technique décrite par Weatherburn (1967), qui est basé sur la réaction de l'ammoniac avec l'hypochlorite de sodium, aboutissant à la formation de l'indophénol, un composé de couleur bleue, dont l'absorbance a été lue sur un spectrophotomètre (Ultrospec 500 pro, Amersham-Biosciences®, Barcelona, España) à une longueur d'onde de 625 nm.

3.5. Etude statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le Mixed procedure de SAS (2012). Afin d'éviter des interactions multiples qui pourraient être complexes à

Matériels et méthodes

interpréter, les résultats des substrats «Lait» et «Engrassement» ont été étudiés indépendamment. Deux types d'analyses de variance ont été effectués pour chaque substrat: dans le premier on a comparé des résultats de l'utilisation des trois graines, tandis que dans le second on a comparé les trois traitements indiqués. Dans les deux cas on a utilisé un dispositif split-plot, en considérant le niveau d'incorporation de lipides comme main-plot (qui a été testé contre son interaction avec les brebis) et les graines ou le traitement (selon les cas) et son interaction avec NI en tant que sub-plots. Dans le premier type d'analyse les différences entre les graines ayant même niveau d'incorporation ont été examinées avec le test de Tukey, pendant que les différences entre traitements dans le second type d'analyse ont été testées avec des contrastes orthogonaux en comparant 1) le traitement témoin aux traitements avec lipides (T vs T+H et G) et 2) ces derniers entre eux. Le seuil de signification a été fixé à $p<0,05$ cependant les tendances pour $p<0,1$ ont été pris. Tous les études ont été faits avec le procédure MIXED du programme.

IV. RESULTATS ET DISCUSSION

Les essais de ce travail ont été conçus pour analyser l'influence possible du type de régime alimentaire supplémentée en lipides sous forme des graines entières ou des huiles sur la fermentation ruminale. Les deux substrats formulés ont été représentatifs des régimes d'animaux laitiers et à l'engraissement, étant également les animaux donneurs de jus de rumen alimentés avec deux rations similaires à ces substrats. Chaque substrat a été incubé avec du fluide du rumen des animaux ayant reçu le même régime alimentaire, dans le but que les micro-organismes d'inoculum ont été adaptées à la fermentation du substrat correspondant. Cette disposition a été prise parce que certaines études ont clairement démontré l'effet de l'alimentation d'animal donneur sur les paramètres de fermentation *in vitro*, ce qui souligne l'importance que les animaux reçoivent une ration similaire au substrat incubé (Martínez et al., 2010; Mateos et al., 2013).

4.1. Composition chimique des graines oléagineuses

L'existence des différences considérables entre les compositions chimiques des graines oléagineuses (Tableau 1), peut affecter les résultats obtenus. Ainsi, les teneurs en matières grasses de tournesol et de cardon rapportés à celle de soja sont 2,23 et 1,26 respectivement. Ceci implique une moindre proportion incorporée de ces graines dans les substrats pour atteindre le niveau de lipides souhaité. A cela s'ajoute les différences existantes entre les teneurs en fibres et en lignine des graines. Les teneurs en NDF, ADF, et ADL rapportés à celles de soja sont 0,86 ; 0,96 et 5,45 pour le tournesol, et 1,8 ; 2,80 et 16,3 pour le cardon. La teneur plus élevée en lignine (non fermentescible) par comparaison au soja, peut être compensée pour le tournesol par son contenu plus faible en fibres que le soja, alors qu'elle va être aggravée pour le cardon vu ses contenus plus forts en NDF et ADF que le soja. Par conséquent, il est attendu que les substrats qui renferment le cardon ainsi que son tourteau présentent une quantité de matière organique fermentée moins importante que les autres graines. Un autre aspect à prendre en considération est le fait que les graines ont été obtenues des usines des aliments composés, où elles pouvaient être subir des traitements. Egalement, pendant que le tournesol et le cardon ont été utilisés crus, le soja a été grillé pour inactiver les facteurs anti-nutritionnels thermolabiles, qui peuvent freiner sa vitesse de dégradation

par les microorganismes. Mais ceci n'affecte pas réellement l'analyse statistique car le soja dans la pratique est livré toujours après un traitement thermique.

L'analyse de la composition en acides gras des oléagineuses (Tableau 2) montre que les profils en acides gras des huiles extraites sont semblables à ceux des graines correspondantes. Par conséquent, les différences qui peuvent exister entre les traitements «G» et «T+H» ne pourront pas être attribuées à une variabilité de cette composition.

Bien qu'aucune analyse statistique n'a été réalisée, vu qu'il avait un seul échantillon de chaque graine oléagineuse, il est possible d'indiquer que le profil en acides gras de soja et de cardon sont similaires, à l'exception des acides C18:2 n-6, pour lequel le cardon présente une teneur plus élevée, et C18:3 n-3, qui est presque absent dans le cardon (en moyenne 5,61 vs 0,1g/100g MG analysées). Les différences sont plus considérables pour le tournesol en raison de ses faibles contenus en C16:0, C18:1 n-9, C18:3 n-3 (ceci est identique au cardon) et C20:0 ainsi que son contenu très élevé en C18:2 n-6. De ce fait, les lipides du tournesol présentent un moindre contenu en acides gras saturés et monoinsaturés et un contenu plus élevé en acides polyinsaturés que les autres oléagineuses. Comme l'effet toxique des acides gras libres sur les micro-organismes est plus fort pour les acides gras insaturés que pour ces saturés et étant donné que les gras polyinsaturés sont plus efficaces que les acides gras saturés et monoinsaturés à inhiber la méthanolécine (Martin et al., 2006), il est attendu alors que le tournesol qui présente un contenu en acides polyinsaturés et un indice d'insaturation plus élevés que les autres graines, aura l'effet anti-méthanogène le plus notable en raison d'une capacité plus importante à capter l'hydrogène.

4.2. Comparaison entre les graines oléagineuses

L'effet de l'ajout de graines d'oléagineuses aux substrats «Lait» et «Engrassement» sur le patron de fermentation et la production de gaz *in vitro* figurent dans le Tableau 5 et 6, respectivement.

Aucune interaction «Graine × NI» significative a été observée avec les 2 substrats et pour les 2 temps d'incubation, à l'exception de la relation CH₄/AGV avec le substrat «Engrassement» à 17 heures, qui a montré une tendance (*p*=0,075) comme conséquence de la variabilité de la réponse entre le tournesol et les autres graines. Nos

résultats sont concordants partiellement avec ceux obtenus par Patra et Yu (2013), qui n'ont pas rapporté des interactions significatives «Dose × Huile» sur la production de gaz, de méthane et d'AGV totaux, et la concentration de NH₃-N (N.B. Doses : 0; 3,1; 6,2 ml/l ; Huiles : coprah et poisson). Cependant, ils ont observé un effet significatif de cette interaction sur le propionate, le butyrate, l'isobutyrate et le rapport acétate/propionate et, encore, des tendances ($p<0,1$) sur l'acétate, et l'isovalérate. Par ailleurs, Machmüller et al. (1998) ont indiqué que l'interaction entre la nature de lipides et son taux d'incorporation a seulement été significative pour la production de méthane dans un système de Rusitec (N.B. Nature de lipides : huile de coprah, graines entières de colza, de tournesol et de lin ; Taux d'incorporation : 7 et 9% de la MS de la ration).

Aucun effet significatif du facteur «NI» a été noté relativement au substrat «Lait» sauf une tendance ($p=0,078$) qui consiste à une diminution de la production de valérate à 6 heures avec NI2 par comparaison au NI1. Par rapport au substrat «Engrassement», ce facteur montre un effet significatif sur les AGV totaux à 6 heures. Effectivement, la production des AGV totaux diminue avec l'augmentation de niveau d'incorporation de lipides (919 vs 841). Ce niveau a aussi le même effet significatif sur les principaux AGV (acétate et propionate). Pour les autres AGV cette différence a été maintenue de forme numérique seulement. De forme parallèle, la MOF a diminué (8,5% en moyenne) ce qui explique la réduction d'AGV indiquée. Ces effets n'ont pas été détectés à 17 heures, alors qu'une diminution de la production de gaz avec NI2 a été observée ($p=0,017$). Ces diminutions s'expliquent par une réduction de l'activité microbienne due à l'action inhibitrice sur les microorganismes des acides gras résultants de la dégradation des lipides contenus dans les graines oléagineuses. Nos résultats montrent que cette réduction de l'activité microbienne est plus importante avec des rations riches en concentrés et elle est aussi plus intense avec des durées courtes d'incubation. Ainsi, la proportion de concentrés dans la ration ainsi que la période d'incubation peuvent avoir un grand impact sur l'adhésion microbienne aux particules des aliments.

Tableau 5. Effet de l'incorporation de graines entières d'oléagineuses selon deux niveaux d'incorporation de lipides (NI ; NI1: 2,75% et NI2: 5,5%) dans le substrat «Lait» sur les fermentations ruminales et la production de gaz¹

Temps d'incubation et item ²	NI1			NI2			ETM	NI	ETM	Graine
	Soja	Tournesol	Cardon	Soja	Tournesol	Cardon				
<i>6 heures</i>										
AGV Totaux ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)	861	897	935	855	864	882	10,0	0,117	22,1	0,313
Différents AGV ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)										
Acétate	576	601	634	575	575	594	6,8	0,106	13,7	0,172
Propionate	134	145	146	134	141	138	1,9	0,228	3,3	0,150
Butyrate	120	121	121	117	118	117	1,6	0,256	3,8	0,965
Valérate	12,6	12,4	12,2	11,9	11,9	11,6	0,16	0,078	0,54	0,892
Isobutyrate	8,43	6,88	10,6	7,61	6,46	10,3	0,23	0,224	1,40	0,194
Isovalérate	9,97	10,7	11,3	9,47	10,7	10,9	0,15	0,205	0,51	0,182
Acétate/Propionate	4,26 ^{ab}	4,08 ^a	4,33 ^b	4,28 ^b	4,01 ^a	4,27 ^b	0,029	0,440	0,051	0,009
MOF (mg/flacon)	76,9	80,1	82,8	76,4	77,2	78,3	0,90	0,132	1,93	0,392
NH ₃ -N (mg/l)	146 ^a	155 ^{ab}	160 ^b	148 ^a	152 ^{ab}	162 ^b	2,0	0,968	3,1	0,021

Tableau 5. Suite

Temps d'incubation et item	NI1			NI2			ETM	NI	ETM	Graine
	Soja	Tournesol	Cardon	Soja	Tournesol	Cardon				
<i>17 heures</i>										
Gaz ($\mu\text{mol/flacon}$)	3493	3450	3341	3478	3348	3305	26,3	0,262	48,2	0,099
CH ₄ ($\mu\text{mol/flacon}$)	755	751	808	744	764	779	15,1	0,704	29,6	0,551
% CH ₄	21,8	22,0	24,2	21,6	22,8	23,7	0,31	0,944	0,78	0,156
AGV Totaux ($\mu\text{mol/flacon}$)	2077	2160	2142	2098	2084	2168	16,1	0,711	44,3	0,570
CH ₄ /AGV Totaux	0,367	0,349	0,378	0,358	0,365	0,360	0,005	0,674	0,014	0,846
Différents AGV ($\mu\text{mol/flacon}$)										
Acétate	1389	1443	1439	1395	1391	1446	13,5	0,549	34,2	0,591
Propionate	309	326	307	314	316	322	1,2	0,150	4,5	0,349
Butyrate	305	310	312	313	299	315	2,2	0,947	8,0	0,736
Valérate	28,9	31,0	31,1	29,5	30,2	31,6	0,34	0,808	0,65	0,095
Isobutyrate	19,5 ^a	21,7 ^{ab}	22,7 ^b	19,6 ^a	20,7 ^{ab}	23,0 ^b	0,29	0,630	0,58	0,006
Isovalérate	25,5 ^a	28,8 ^b	30,3 ^b	26,4 ^a	27,5 ^{ab}	31,0 ^b	0,27	0,798	0,76	0,003
Acétate/Propionate	4,54	4,48	4,71	4,47	4,44	4,55	0,046	0,265	0,111	0,561
MOF (mg/flacon)	187	193	192	189	187	194	1,4	0,737	4,1	0,687
NH ₃ -N (mg/l)	226	238	239	223 ^a	230 ^{ab}	243 ^b	1,9	0,426	3,1	0,009

¹ETM: écart type de la moyenne ; AGV: Acides gras volatils; MOF: Matière organique fermentescible.

Aucune interaction «NI x forme de présentation d'oléagineuse» a été significative ($p>0,10$)

^{a,b}valeurs avec des lettres différentes parmi chaque niveau d'ingestion sont différentes à $p<0,05$

Tableau 6. Effet de l'incorporation de graines entières d'oléagineuses selon deux niveaux d'incorporation de lipides (NI1: 2,75% et NI2: 5,5%) dans le substrat «Engrassement» sur les fermentations ruminale et la production de gaz¹

Temps d'incubation et item	NI1			NI2			Effets			
	Soja	Tournesol	Cardon	Soja	Tournesol	Cardon	ETM	NI	ETM	Graine
<i>6 heures</i>										
AGV Totaux ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$) ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)	879 ^a	992 ^b	885 ^a	807 ^a	880 ^b	837 ^{ab}	14,5	0,032	11,9	<0,001
Différents AGV ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)										
Acétate	570 ^a	640 ^b	573 ^a	520 ^a	567 ^b	539 ^{ab}	8,5	0,023	7,7	<0,001
Propionate	151 ^a	177 ^b	152 ^a	140 ^a	156 ^b	150 ^b	1,8	0,020	2,3	<0,001
Butyrate	124 ^a	142 ^b	129 ^{ab}	118	126	118	3,7	0,125	3,3	0,037
Valérate	9,74	9,88	8,47	8,83	9,05	8,19	0,156	0,391	0,576	0,093
Isobutyrate	9,65	10,7	10,3	9,06	9,79	9,71	0,22	0,103	0,34	0,202
Isovalérate	11,8	12,8	12,6	11,0	12,0	11,8	0,36	0,215	0,35	0,167
Acétate/Propionate	3,80	3,62	3,78	3,75	3,65	3,62	0,038	0,368	0,048	0,173
MOF (mg/flacon)	78,6 ^a	89,1 ^b	79,6 ^a	72,4 ^a	79,0 ^b	75,0 ^{ab}	1,42	0,040	1,16	<0,001
NH ₃ -N (mg/l)	150	151	157	164	158	155	2,9	0,224	2,5	0,753

Tableau 6. Suite

Temps d'incubation et item	NI1			NI2			Effets			
	Soja	Tournesol	Cardon	Soja	Tournesol	Cardon	ETM	NI	ETM	Graine
<i>17 heures</i>										
Gaz ($\mu\text{mol/flacon}$)	3531 ^b	3573 ^b	3316 ^a	3493 ^b	3516 ^b	3252 ^a	7,8	0,017	18,7	<0,001
CH ₄ ($\mu\text{mol/flacon}$)	774 ^b	803 ^b	686 ^a	780	748	732	13,3	0,948	18,3	0,035
% CH ₄ in gaz	21,9	22,4	20,8	22,3	21,0	22,4	0,44	0,732	0,49	0,785
CH ₄ /AGV Totaux	0,353	0,362	0,331	0,361	0,339	0,364	0,008	0,640	0,008	0,658
AGV Totaux ($\mu\text{mol/flacon}$)	2181 ^{ab}	2207 ^b	2075 ^a	2162 ^b	2184 ^b	2021 ^a	27,7	0,475	29,4	0,009
Différents AGV ($\mu\text{mol/flacon}$)										
Acétate	1390	1402	1327	1378 ^b	1397 ^b	1295 ^a	19,7	0,591	18,2	0,011
Propionate	396 ^b	398 ^b	369 ^a	390 ^b	391 ^b	356 ^a	4,8	0,307	5,0	0,001
Butyrate	329	337	309	328	326	302	4,6	0,425	6,4	0,029
Valérate	21,1 ^{ab}	22,6 ^b	20,4 ^a	21,8	22,0	20,2	0,21	0,921	0,42	0,019
Isobutyrate	18,8	19,9	20,0	18,7	19,9	19,3	0,27	0,541	0,63	0,405
Isovalérate	24,9 ^a	28,0 ^b	28,0 ^b	25,3 ^a	27,1 ^b	27,5 ^b	0,34	0,541	0,41	<0,001
Acétate/Propionate	3,56	3,57	3,65	3,56	3,59	3,68	0,041	0,811	0,028	0,065
MOF (mg/flacon)	198 ^{ab}	200 ^b	187 ^a	196 ^b	198 ^b	183 ^a	2,5	0,461	2,8	0,008
NH ₃ -N (mg/l)	208	214	216	205 ^a	217 ^{ab}	226 ^b	4,0	0,603	3,6	0,042

¹ETM: écart type de la moyenne ; AGV: Acides gras volatils; MOF: Matière organique fermentescible.

L'interaction «NI x forme de présentation d'oléagineuse» à 17 heures pour CH₄/AGV Totaux a montré une tendance p=0,075.

^{a,b}valeurs avec des lettres différentes parmi chaque niveau d'ingestion sont différentes à p<0,05

Similairement à nos résultats, Machmüller et al. (1998) ont signalé une diminution significative de butyrate avec l'augmentation de taux d'incorporation de lipides. Toutefois, ils ont souligné que l'accroissement de taux d'addition de lipides entraîne une augmentation significative de pourcentage molaire de propionate, de valérate et d'isobutyrate. Aussi, Machmüller et al. (1998) ont indiqué une réduction de la quantité produite de méthane et une augmentation de NH₃-N significatives, ce qui n'est pas le cas dans notre étude. Patra et Yu (2013) ont indiqué une augmentation de la quantité de gaz produite avec de l'accroissement de la dose de l'huile de coprah incorporé alors que la proportion de butyrate a été réduite. Également, cet effet montre une tendance ($p<0,1$) pour la quantité de CH₄ produite et le pourcentage d'acétate. L'effet indiqué par ces auteurs sur la production de gaz est contraire à l'effet observé dans notre étude.

Les effets associés au «type de graine» ont été restreintes avec le substrat «Lait». À 6 ainsi qu'à 17 heures, le soja a présenté une concentration de l'azote ammoniacal significativement inférieure à celle de cardon pendant que le tournesol a présenté des valeurs intermédiaires. La forte dégradabilité ruminale de ces deux graines est bien connue. Quant au cardon, Cajarville et al. (2000) ont rapporté une dégradabilité de 82,9%. Comme ces AGV proviennent de la dégradation des acides aminés à chaîne ramifiée (valine et leucine, respectivement; Van Soest, 1982), la dégradabilité protéique la plus élevée avec les graines de tournesol et de cardon peut expliquer également les variations des AGV à chaînes ramifiées. En ce qui concerne les différences pour le NH₃-N et les AGV ramifiées on devrait aussi indiquer l'effet discuté à la section 4.1. d'un ralentissement de la dégradation microbienne en raison du grillage de la soja. Enfin, à 6 heures on a observé un moindre rapport acétate/propionate pour le tournesol que pour les autres graines, ce qui est attribué à une production de propionate plus importante.

Quant au substrat «Engrassement», les effets pour le «type de graine» sont plus marqués que dans le cas antérieur. Ainsi, un effet significatif sur les AGV totaux a été indiqué à 6 comme à 17 heures d'incubation, mais pour des raisons différentes. A 6 heures, le tournesol a présenté la quantité d'AGV totaux la plus élevée statistiquement alors qu'à 17 heures les AGV totaux relatifs au cardon ont été significativement inférieurs à ceux de reste de graines. En ce qui concerne le soja, bien que les AGV totaux ont augmenté à 17 heures par comparaison à 6 heures, mais ils sont restés

inférieurs à ceux de tournesol. Les variations observées pour les principaux AGV (acétate, propionate, butyrate) ont été pratiquement semblables à celles enregistrés avec les AGV totaux pour les 2 temps d'incubation, et même pour le valérate, l'effet «type de graine» a montré une tendance ($p=0,093$) à 6 heures et il a été significative à 17 heures dues aux effets déjà décrites. Pour les deux temps d'incubation, les différences mentionnées pour les AGV totaux concordent avec les valeurs de MOF obtenues. En plus à 17 heures il y a eu une moindre production de gaz avec le cardon. L'ensemble des résultats montre une fermentation rapide et efficiente du tournesol malgré sa teneur élevée en fibres. Par contre la teneur en fibres et le niveau de lignification maximales du cardon (antérieurement mentionnés à la section 4.1) réduisent son niveau de fermentation. Comme conséquence de cette moindre fermentation, la production de méthane dans ces substrats a été réduite, significativement pour NI1 et seulement numériquement pour NI2. Les effets commentés pour le substrat «Lait» au niveau de NH₃-N et les AGV à chaîne ramifiée ont aussi été observés pour le substrat «Engrassement» à 17 heures: le «type de graine» a affecté significativement la concentration NH₃-N et l'isovalérate et uniquement d'une manière numérique l'isobutyrate. Les résultats obtenus avec ce substrat sont également concordantes avec le ralentissement de la dégradation du soja précédemment mentionné. L'effet de l'ajout de graines de colza, de tournesol et de lin sur le patron de fermentation a été étudié par Machmüller et al (1998), qui ont indiqué un effet significatif de «type de grain » sur la matière organique fermentescible, le pourcentage molaire de butyrate et la production de méthane.

Dans l'ensemble, les résultats révèlent que les teneurs en fibres et les niveaux de lignification plus élevés que le tournesol et le cardon présentent par comparaison au soja, ont été contrebancés par une dégradation plus importante. Cette contrebalance est au moins totale pour le tournesol pendant qu'elle est élevé, mais partielle pour le cardon. D'autre part, les effets des ces graines sur la réduction de la méthanogénèse ont été parallèle à l'intensité de la fermentation. Les différences entre les graines au niveau du patron de fermentation et de la production de gaz sont plus nettes avec le substrat «Engrassement» ce qui semble être associé à une sensibilité accrue à l'effet de lipides des populations de microorganismes développés dans de telles rations.

4.3. Forme d'incorporation de lipides d'oléagineuses «Huiles vs Graines»

Avec le soja et relativement au substrat «Lait» (Tableau 7), aucune interaction significative «NI × Forme de Présentation» n'a été observée. Par ailleurs, «NI» révèle une tendance à 17 heures de fait que la production de gaz augmente et le pourcentage du méthane dans le gaz diminue avec l'augmentation de «NI». L'incorporation de lipides réduit significativement la production de gaz à ce temps, en observant une tendance à amplifier cet effet avec l'utilisation de graines entières. Bien que l'addition des lipides aux substrats montre un effet significatif ainsi que des tendances pour une augmentation de la production de certains AGV à ce même temps, ces faits sont principalement associés à des valeurs correspondantes au traitement «T+H», puisque les valeurs de traitement «G» étaient semblables (et même inférieures) à celles de traitement témoin. En outre, l'appréciation de ces effets a été favorisée par les faibles valeurs d'ETM enregistrées. La diminution de gaz due à l'incorporation de lipides sous formes de graines entières (par comparaison à son incorporation sous forme d'huile) s'accorde avec les réductions observées aux niveaux de la quantité totale d'AGV, des quantités de ces différents acides et de la MOF (Tableau 7).

Similairement au substrat «Lait», une diminution de la fermentation suite à l'ajout de lipides sous forme de graines a aussi été observé (Tableau 8) avec le substrat «Engrassement» qui se traduit par une réduction significative (par comparaison à l'addition de lipides sous forme d'huile) des AGV totaux, des AGV principaux (acétate, propionate, butyrate), de la MOF à 6 heures d'incubation et de la production de gaz à 17 heures. Ce fait est montré aussi par la présence à 6 heures d'incubation des interactions «NI x Forme de Présentation» comme tendances pour les AGV totaux, acétate et MOF ; ainsi, avec l'augmentation de NI les valeurs pour le substrat «G» diminuent alors que ils augmentent pour les autres substrats. La tendance à une réduction de NH₃-N ($p=0,091$), ainsi que la diminution significative de l'isovalérate avec le substrat «G», indiquent que la diminution de la fermentation affecte également la dégradation protéique. Une possible hypothèse qui peut expliquer ces résultats est que la dégradation des graines est ralentie à cause de leurs contenus en lipides.

Dans le tournesol et par rapport au substrat «Lait» (Tableau 9), les différences ont été entre les traitements «T+H» et «G» et sont, en plus, en concordance avec celles indiquées antérieurement pour la graine de soja. Ainsi, moindres valeurs ont été

observées suite à l'incorporation de graines au substrat pour la production d'isobutyrate (comme une tendance, $p=0,081$) et la concentration de NH₃-N à 6 heures, ainsi que pour la production de gaz (comme une tendance, $p=0,052$) et de propionate, de butyrate (comme une tendance, $p=0,052$), de valérate, d'isobutyrate, et de isoalérate (ce dernier comme une tendance, $p=0,062$) à 17 heures. Dans ce même temps, les interactions «NI × Forme de Présentation d'oléagineuse» présentent des tendances pour les variables AGV totaux, acétate et MOF ($p=0,054$; $p=0,056$ et $p=0,051$, respectivement). Dans tous les cas, ces interactions sont dues à l'augmentation des valeurs correspondantes au traitement «T+H» avec l'accroissement de taux d'incorporation de lipides, alors que celles correspondantes aux 2 autres traitements ont diminué.

Les interactions détectées étaient au contraire nombreuses avec le substrat «Engrassement» (Tableau 10). À 6 heures, les interactions sont attribuées aux réductions considérables qui se produisent avec le traitement «G» avec l'augmentation de taux d'inclusion de lipides, tandis que pour le traitement «T» des diminutions modérées (AGV totaux, acétate et MOF) et des augmentations même faibles ou modérées ont été enregistrées, finalement, des accroissements modérés ont été en revanche détectés d'une façon général avec le traitement «T+H». À 17 heures, les interactions notées sont dues à la variabilité de réponse des différents traitements à l'apport lipidique croissant. Ainsi, alors que des accroissements ont été constatés pour le traitement sans lipides «T», des diminutions ont été enregistrés pour les traitements avec lipides, à l'exception d'une hausse minime de la production de gaz (1,1%) avec le traitement «T+H». Toutefois, il convient de souligner certains détails liés à la magnitude de ces variations. En effet, les accroissements enregistrées avec le traitement «T» ont été modérées (de 6 à 8%) pour la production de gaz, les AGV totaux et la MOF, mais elles ont été considérables pour la production de CH₄ (16,3%) et ses paramètres associés. Pour les traitements «T+H» et «G», les réductions observées au niveau de la production d'AGV et la MOF ont été faibles, cependant celle correspondante à la production de CH₄ a été élevé (19,6%) avec le traitement «T+H», et modéré (6,85%) avec le traitement «G».

Tableau 7. Effet de l'incorporation de lipides de soja sous forme d'huiles ou de graines selon deux niveaux d'incorporation de lipides (NI1: 2,75% et NI2: 5,5%) dans le substrat «Lait» sur les fermentations ruminale et la production de gaz¹

Temps d'incubation et item ²	Traitement						Effets				
	NI1			NI2			SEM	NI	SEM	F. Pr.	
	T	T+H	G	T	T+H	G				C1	C2
<i>6 heures</i>											
AGV Totaux ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)	860	823	861	880	854	855	3,6	0,395	14,6	0,255	0,355
Différents AGV ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)											
Acétate	573	557	576	590	575	575	3,2	0,323	9,8	0,377	0,503
Propionate	138	128	134	139	135	134	1,3	0,573	3,3	0,187	0,630
Butyrate	118	112	120	121	117	117	1,3	0,438	1,7	0,146	0,104
Valérate	12,3	11,2	12,6	12,2	12,0	11,9	0,29	0,947	0,33	0,427	0,166
Isobutyrate	8,07	5,82	8,43	8,25	6,16	7,61	0,252	0,895	0,640	0,167	0,044
Isovalérate	9,98	9,12	9,97	10,1	9,50	9,47	0,277	0,973	0,339	0,249	0,415
Acétate/Propionate (mol/mol)	4,10	4,31	4,26	4,21	4,24	4,28	0,045	0,754	0,014	0,059	0,908
MOF (mg/flacon)	76,8	73,6	76,9	78,6	76,4	76,4	0,31	0,349	1,23	0,236	0,353
NH ₃ -N (mg/l)	147	144	146	144	143	148	1,3	0,790	2,04	0,798	0,238

Tableau 7. Suite

Temps d'incubation et item ²	Traitement						Effets				
	NI1			NI2			ETM	NI	F. Pr.		
	T	T+H	G	T	T+H	G			C1	C2	
<i>17 heures</i>											
Gaz (µmol/flacon)	3535	3498	3493	3617	3590	3478	14,4	0,069	23,0	0,048	0,098
CH ₄ (µmol/flacon)	775	791	755	729	744	744	16,1	0,141	18,7	0,784	0,507
% CH ₄ in gaz	22,1	22,7	21,8	20,5	21,0	21,6	0,48	0,068	0,50	0,468	0,964
AGV Totaux (µmol/flacon)	2116	2191	2077	2132	2206	2098	22,9	0,501	21,7	0,489	0,004
CH ₄ /AGV Totaux (mol/mol)	0,368	0,362	0,367	0,348	0,340	0,358	0,0083	0,132	0,009	0,905	0,384
Différents AGV (µmol/flacon)											
Acétate	1432	1457	1389	1426	1481	1395	18,2	0,744	20,5	0,957	0,022
Propionate	309	327	309	315	323	314	3,0	0,506	3,5	0,184	0,017
Butyrate	303	328	305	314	323	313	2,2	0,173	3,1	0,034	0,003
Valérate	28,7	31,3	28,9	29,8	30,7	29,5	0,25	0,314	0,33	0,059	0,002
Isobutyrate	18,9	21,0	19,5	20,0	20,6	19,6	0,25	0,491	0,29	0,061	0,010
Isovalérate	25,2	27,8	25,5	26,8	27,6	26,4	0,22	0,046	0,31	0,061	0,002
Acétate/Propionate (mol/mol)	4,69	4,50	4,54	4,54	4,62	4,48	0,037	0,747	0,087	0,459	0,686
MOF (mg/flacon)	190	198	187	192	198	189	2,0	0,453	1,9	0,390	0,003
NH ₃ -N (mg/l)	217	225	226	223	226	223	1,1	0,544	1,9	0,050	0,738

¹T: Traitement témoin sans lipides correspondant à l'incorporation de Tourteau; T+H: Traitement «Tourteau+ Huile»; G: Traitement «Graines entières»; F.Pr: Forme de Présentation d'oléagineuse; ETM: écart type de la moyenne; C1: Contraste (T vs T+H & G); C2: contraste (T+H vs G).

²AGV: Acides gras volatils; MOF: Matière organique fermentescible

Aucune interaction «NI x forme de présentation d'oléagineuse» a été significative (p>0,10)

Tableau 8. Effets de l'incorporation de lipides de soja sous forme d'huile ou de graines selon deux niveaux d'incorporation de lipides (NI1: 2,75% et NI2: 5,5%) dans le substrat «Engrassement» sur les fermentations ruminale et la production de gaz¹

Temps d'incubation et item ² 6 heures	Traitement						Effets				
	N1			N2			ETM	NI	ETM	F. Pr.	
	T	T+H	G	T	T+H	G				C1	C2
AGV Totaux (μmol/flacon)	861	911	879	904	953	807	17,1	0,859	19,2	0,830	0,006
Différents AGV (μmol/flacon)											
Acétate	562	592	570	589	622	520	10,7	0,869	12,3	0,974	0,004
Propionate	151	158	151	155	161	140	3,2	0,629	2,9	0,806	0,006
Butyrate	120	130	124	129	139	118	2,8	0,382	3,5	0,411	0,018
Valérate	8,62	9,27	9,74	9,47	9,50	8,83	0,286	0,914	0,431	0,574	0,871
Isobutyrate	9,08	10,5	9,65	9,55	9,77	9,06	0,120	0,592	0,424	0,428	0,228
Isovalérate	10,9	11,8	11,8	11,7	12,1	11,0	0,24	0,799	0,40	0,461	0,341
Acétate/Propionate (mol/mol)	3,75	3,79	3,80	3,85	3,86	3,75	0,020	0,488	0,045	0,991	0,463
MOF (mg/flacon)	77,1	81,8	78,6	81,2	85,9	72,4	1,57	0,742	1,70	0,791	0,005
NH ₃ -N (mg/l)	159	154	150	159	150	164	1,4	0,545	4,3	0,455	0,442

Tableau 8. Suite

Temps d'incubation et item ²	Traitements						Effets				
	NI1			NI2			ETM	NI	ETM	F. Pr.	
	T	T+H	G	T	T+H	G				C1	C2
<i>17 heures</i>											
Gaz ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)	3530	3752	3531	3719	3742	3493	17,5	0,296	37,3	0,909	<0,001
CH ₄ ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)	772	834	774	814	797	780	6,8	0,845	15,5	0,867	0,105
% CH ₄ in gaz	21,6	22,2	21,9	21,7	21,3	22,3	0,01	0,674	0,30	0,522	0,478
AGV Totaux ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)	2271	2256	2181	2183	2212	2162	45,5	0,422	52,5	0,709	0,419
CH ₄ /AGV Totaux (mol/mol)	0,343	0,371	0,354	0,371	0,361	0,361	0,0088	0,572	0,012	0,792	0,649
Différents AGV ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)											
Acétate	1431	1446	1390	1395	1416	1378	27,0	0,494	31,7	0,890	0,318
Propionate	429	391	396	382	384	390	11,1	0,219	13,6	0,379	0,775
Butyrate	341	350	329	337	343	328	6,6	0,679	7,5	0,844	0,117
Valérate	23,0	22,3	21,1	22,0	22,1	21,8	0,57	0,829	0,70	0,468	0,478
Isobutyrate	19,5	19,6	18,8	19,1	18,6	18,7	0,46	0,377	0,49	0,533	0,580
Isovalérate	26,7	27,1	24,9	27,5	27,0	25,3	0,46	0,544	0,50	0,121	0,016
Acétate/Propionate (mol/mol)	3,47	3,72	3,56	3,70	3,74	3,56	0,0084	0,170	0,0479	0,303	0,027
MOF (mg/flacon)	206	205	198	198	201	196	4,1	0,439	4,7	0,739	0,368
NH ₃ -N (mg/l)	210	217	208	210	213	205	3,5	0,647	3,3	0,840	0,091

¹T: Traitement témoin sans lipides correspondant à l'incorporation de Tourteau; T+H: Traitement «Tourteau+ Huile»; G: Traitement «Graines entières»; F.Pr: Forme de Présentation d'oléagineuse; ETM: écart type de la moyenne ; C1: Contraste (T vs T+H & G); C2: contraste (T+H vs G).

²AGV: Acides gras volatils; MOF: Matière organique fermentescible

Les interactions «NI x forme de présentation d'oléagineuse» à 6 heures ont montré des tendances pour AGV totaux ($p=0,089$), Acétate ($p=0,065$) et MOF ($p=0,086$)

Tableau 9. Effet de l'incorporation de lipides de tournesol sous forme d'huile ou de graines selon deux niveaux d'incorporation de lipides (NI1: 2,75% et NI2: 5,5%) dans le substrat «Lait» sur les fermentations ruminale et la production de gaz¹

Temps d'incubation et item ²	Traitements						Effet				
	NI1			NI2			SEM	NI	SEM	F. Pr.	
	T	T+H	G	T	T+H	G				C1	C2
<i>6 heures</i>											
AGV Totaux ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)	893	882	897	928	940	864	10,5	0,188	12,3	0,344	0,107
Différents AGV ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)											
Acétate	598	585	601	622	628	575	7,7	0,235	26,2	0,290	0,178
Propionate	146	145	145	151	151	141	1,1	0,351	2,1	0,229	0,121
Butyrate	118	118	121	124	126	118	1,6	0,099	1,7	0,972	0,417
Valératate	12,4	12,1	12,4	12,6	12,7	11,9	0,11	0,548	0,21	0,366	0,403
Isobutyrate	6,86	10,3	6,88	7,19	10,6	6,46	0,080	0,963	1,407	0,389	0,081
Isovalératate	11,0	10,9	10,7	11,5	11,3	10,7	0,118	0,188	0,168	0,127	0,158
Acétate/Propionate (mol/mol)	4,07	3,97	4,08	4,07	4,15	4,01	0,0358	0,606	0,0587	0,831	0,871
MOF (mg/flacon)	79,4	78,3	80,1	82,6	83,5	77,2	0,96	0,165	1,08	0,356	0,165
NH ₃ -N (mg/l)	156	158	155	158	161	152	1,7	0,789	1,6	0,731	0,020

Tableau 9. Suite

Temps d'incubation et item ²	Traitements						Effet				
	NI1			NI2			SEM	NI	SEM	F. Pr.	
	T	T+H	G	T	T+H	G				C1	C2
<i>17 heures</i>											
Gaz ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)	3490	3601	3450	3553	3603	3348	20,9	0,876	66,4	0,799	0,052
CH ₄ ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)	752	796	751	758	725	764	11,0	0,690	36,7	0,932	0,953
% CH ₄ in gaz	21,8	22,2	22,0	21,5	20,3	22,8	0,21	0,549	0,67	0,792	0,264
AGV Totaux ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)	2213	2261	2160	2170	2274	2084	16,9	0,638	63,3	0,969	0,130
CH ₄ /AGV Totaux (mol/mol)	0,341	0,354	0,349	0,349	0,319	0,365	0,0041	0,740	0,0091	0,904	0,130
Différents AGV ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)											
Acétate	1494	1516	1443	1441	1524	1392	14,6	0,595	50,5	0,987	0,177
Propionate	328	330	326	333	333	316	0,7	0,841	3,5	0,309	0,048
Butyrate	310	331	310	313	332	299	1,7	0,808	8,9	0,577	0,052
Valérate	30,9	32,1	31,0	31,3	32,0	30,2	0,19	0,767	0,42	0,679	0,029
Isobutyrate	21,5	22,3	21,7	22,1	23,2	20,7	0,24	0,824	0,49	0,741	0,047
Isovalérate	28,5	29,7	28,8	29,8	30,5	27,5	0,16	0,765	0,68	0,991	0,062
Acétate/Propionate (mol/mol)	4,57	4,61	4,48	4,36	4,60	4,44	0,041	0,509	0,116	0,639	0,389
MOF (mg/flacon)	198	203	193	194	204	187	1,4	0,651	5,7	0,920	0,119
NH ₃ -N (mg/l)	235	236	238	234	244	230	3,3	0,930	5,4	0,706	0,477

¹T: Traitement témoin sans lipides correspondant à l'incorporation de Tourteau; T+H: Traitement «Tourteau+ Huile»; G: Traitement «Graines entières»; F.Pr: Forme de Présentation d'oléagineuse; ETM: écart type de la moyenne ; C1: Contraste (T vs T+H & G); C2: contraste (T+H vs G).

²AGV: Acides gras volatils; MOF: Matière organique fermentescible

Les interactions «NI x forme de présentation d'oléagineuse» à 6 heures ont montré des tendances pour AGV totaux ($p=0,054$), Acétate ($p=0,056$) et MOF ($p=0,051$)

Tableau 10. Effet de l'incorporation de lipides de tournesol sous forme de huile ou de graines selon deux niveaux d'incorporation de lipides (NI1: 2,75% et NI2: 5,5%) dans le substrat «Engrassement» sur les fermentations ruminale et la production de gaz¹

Temps d'incubation 6 heures	Traitement						Effet					
	NI1			NI2			ETM	NI	ETM	F. Pr.		NIxF.Pr.
	T	T+H	G	T	T+H	G				C1	C2	
AGV Totaux (μmol/flacon)	934	952	992	928	969	880	7,8	0,055	14,21	0,328	0,240	0,017
Différents AGV (μmol/flacon)												
Acétate	612	615	640	597	628	567	5,6	0,051	10,5	0,550	0,245	0,040
Propionate	165	166	177	167	168	156	1,0	0,027	2,32	0,763	0,817	0,005
Butyrate	126	138	142	132	139	126	2,1	0,401	2,5	0,029	0,227	0,025
Valérate	8,67	9,54	9,88	9,29	9,58	9,05	0,101	0,707	0,131	0,006	0,642	0,007
Isobutyrate	9,90	10,7	10,7	10,3	10,8	9,79	0,047	0,112	0,142	0,031	0,025	0,016
Isovalérate	12,1	13,0	12,8	12,8	13,2	12,0	0,151	0,949	0,148	0,093	0,005	0,010
Acétate/Propionate (mol/mol)	3,74	3,76	3,62	3,60	3,76	3,65	0,033	0,495	0,047	0,635	0,088	0,422
MOF (mg/flacon)	83,4	85,6	89,1	83,2	87,1	79,0	0,75	0,068	1,29	0,241	0,240	0,017
NH ₃ -N (mg/l)	158	162	151	156	158	158	1,8	0,945	2,4	0,987	0,141	0,283

Tableau 10. Suite

Temps d'incubation et item ²	Traitement						Effet					
	NI1			NI2			SEM	NI	SEM	F. Pr.		
	T	T+H	G	T	T+H	G				C1	C2	
<i>17 heures</i>												
Gaz ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)	3570	3741	3573	3788	3783	3516	38,9	0,307	25,4	0,426	<0,001	0,008
CH ₄ ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)	681	831	803	792	668	748	27,5	0,423	31,5	0,516	0,568	0,030
% CH ₄ in gaz	18,7	22,2	22,4	21,0	17,7	21,0	0,58	0,229	0,91	0,379	0,196	0,065
AGV Totaux ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)	2175	2328	2207	2319	2259	2184	23,7	0,642	28,6	0,947	0,033	0,051
CH ₄ /AGV Totaux (mol/mol)	0,308	0,357	0,362	0,341	0,296	0,339	0,0100	0,312	0,0149	0,0450	0,273	0,117
Différents AGV ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)												
Acétate	1393	1496	1402	1494	1459	1397	13,6	0,378	17,5	0,818	0,009	0,040
Propionate	388	397	398	391	382	391	2,7	0,214	5,6	0,751	0,554	0,538
Butyrate	325	359	337	357	344	326	6,6	0,839	6,4	0,928	0,044	0,045
Valérate	21,7	23,8	22,6	23,4	22,6	22,0	0,40	0,891	0,41	0,748	0,140	0,072
Isobutyrate	19,8	20,9	19,9	22,2	20,7	19,9	0,50	0,379	0,46	0,271	0,181	0,129
Isovalérate	27,2	30,1	28,0	31,0	28,7	27,1	0,63	0,601	0,60	0,381	0,048	0,019
Acétate/Propionate (mol/mol)	3,62	3,79	3,57	3,86	3,86	3,59	0,014	0,010	0,042	0,535	0,002	0,201
MOF (mg/flacon)	197	211	200	211	205	198	2,3	0,683	2,7	0,976	0,033	0,049
NH ₃ -N (mg/l)	220	233	214	225	229	217	1,7	0,695	2,7	0,778	0,002	0,489

¹T: Traitement témoin sans lipides correspondant à l'incorporation de Tourteau; T+H: Traitement «Tourteau+ Huile»; G: Traitement «Graines entières»; F.Pr: Forme de Présentation d'oléagineuse; ETM: écart type de la moyenne ; C1: Contraste (T vs T+H & G); C2: contraste (T+H vs G).

²AGV: Acides gras volatils; MOF: Matière organique fermentescible

Comme effet de niveau d'incorporation de lipides qui n'a pas été affecté par les interactions discutés, une petite augmentation (3%) à 17 heures a été seulement détectée pour le rapport acétate/propionate avec l'accroissement de niveau des lipides incorporés. Les effets relatifs à la comparaison des traitements sans lipides «T» à ceux avec lipides «T+H» et «G» ont été affectés avec les interactions précédemment décrites. La comparaison de «T+H» au «G» montre seulement deux effets qui ne sont pas affectés par les interactions: une réduction pour le traitement «G» de rapport acétate/propionate détectée comme tendance ($p=0,08$) et à $p=0,002$ pour 6 et 17 heures, respectivement, et une diminution significative de NH₃-N à 17 heures.

Les effets observés à l'utilisation de cardon avec le substrat «Lait» ont été peu nombreuses et très restreintes (Tableau 11). Effectivement, l'augmentation de NI entraîne une diminution significative de propionate et de butyrate à 6 heures, de même elle montre une tendance à réduire la production d'acétate ($p=0,085$) et de gaz ($p=0,079$) à 17 heures. Egalement, une faible réduction de ratio acétate/propionate à 17 heures a été constatée. Quant à la concentration de NH₃-N, elle présente une tendance à augmenter avec l'accroissement de NI à 6 heures, cependant cette variation est très faible et d'ailleurs la valeur d'ETM est très petite. La comparaison entre le traitement sans lipides «T» et ceux avec lipides «T+H» et «G» montré que l'addition de lipides a réduit d'une manière modérée la production de l'isovalérate à 6 heures. En comparant «T+H» au «G», l'incorporation de l'huile libre a révélé une tendance à diminuer la production de méthane ($p=0,066$) ainsi que la proportion de ce dernier dans le gaz (0,094) à 17 heures.

Les résultats obtenus pour le cardon avec le substrat «Engrassement» figurent dans le Tableau 12. Les différences considérables entre les traitements pour la production de CH₄ avec l'accroissement de taux d'incorporation de lipides (une diminution de 2,55% et 20,9% pour «T» et «T+H», respectivement, et une augmentation de 6,71% pour «G») aboutissent à une interaction significative qui affecte les paramètres associés (% de CH₄ dans le gaz et le ratio CH₄/AGV totaux). Egalement, une diminution de ratio acétate/propionate a été notée à 6 heures avec l'augmentation de NI. Aussi, une moindre production de méthane a été enregistrée pour les traitements «T» par comparaison aux 2 autres traitements. Le reste des effets sont affectés par les interactions antérieurement décrites et déjà expliquées.

D'une façon similaire à ce qui a été indiqué dans la comparaison des graines, en général peu d'effets du NI des huiles sur la fermentation ruminale *in vitro* ont été notés pour les deux substrats, et ceux-ci n'étaient pas également uniformes pour toutes les graines utilisées. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par d'autres auteurs (Dohme et al., 2000; Hervas et al., 2008; Patra y Yu, 2013; Cieślak et al., 2013), qui n'ont pas également observé aucun effet sur la fermentation ruminale *in vitro* en ajoutant différents types d'huiles (de coprah, de poisson, de soja, de lin, de raisin et de cassis) à des doses inférieures à 6% à des cultures de micro-organismes du rumen dans un environnement fermé. Nos résultats indiquent l'absence d'effets négatifs marqués lorsque les huiles sont ajoutées à des niveaux qui ne dépassent pas 5,5%, au moins dans les conditions *in vitro* utilisés dans notre expérience. En revanche, dans d'autres études *in vitro* les effets de différents types d'huiles ont été détectés, même si elles ont été ajoutées à des niveaux similaires. Par exemple, Vargas et al. (2011) ont constaté que l'addition de 5% d'huile d'olive, de tournesol et de lin à une ration riche en concentré dans des fermenteurs Rusitec réduit la production de méthane, le rapport acétate/propionate et la concentration de NH₃-N. De même Machmüller et al. (1998) ont noté que l'addition d'huile de coprah ou de graines de tournesol et de lin afin d'apporter 6 et 9% de lipides dans des fermenteurs Rusitec réduit la production de méthane et de certains AGV, et la concentration de NH₃-N.

Il y a plusieurs raisons qui peuvent expliquer la variabilité entre les différentes études, notamment le type et la dose d'huile ajoutée. Jacob et al. (2012) n'ont pas observé aucun effet de l'ajout de 4,5% des huiles de soja et de tournesol à une ration ayant un rapport fourrage: concentré de 65:35 dans un système Rusitec, tandis que lorsque le taux d'incorporation a été 6%, ils ont noté une réduction de la fermentation ruminale, la dégradabilité et la production des AGV. Ces résultats indiquent que de petits changements dans la dose des huiles utilisées peuvent provoquer des différences importantes dans les résultats.

Tableau 11. Effets de l'incorporation de lipides de cardon sous forme d'huile ou de graines selon deux niveaux d'incorporation de lipides (NI1: 2,75% et NI2: 5,5%) dans le substrat «Lait» sur les fermentations ruminales et la production de gaz¹

Temps d'incubation et item ²	Traitement						Effet				
	NI1			NI2			SEM	NI	SEM	F. Pr.	
	T	T+H	G	T	T+H	G				C1	C2
<i>6 heures</i>											
AGV Totaux (μmol/flacon)	920	889	935	867	879	882	1,6	0,118	26,9	0,947	0,537
Différents AGV (μmol/flacon)											
Acétate	620	593	634	582	592	594	10,4	0,175	18,2	0,914	0,421
Propionate	146	141	146	137	139	138	1,2	0,033	4,87	0,941	0,848
Butyrate	123	121	121	117	115	117	1,2	0,050	3,4	0,701	0,734
Valérate	12,5	12,3	12,2	12,1	11,0	11,6	0,26	0,102	0,435	0,295	0,592
Isobutyrate	7,17	10,6	10,6	7,29	10,4	10,3	0,23	0,713	1,51	0,105	0,991
Isovalérate	12,0	11,7	11,3	12,1	11,3	10,9	0,15	0,274	0,27	0,047	0,290
Acétate/Propionate (mol/mol)	4,23	4,19	4,33	4,25	4,21	4,27	0,045	0,933	0,077	0,959	0,387
MOF (mg/flacon)	82,0	79,0	82,8	77,2	77,9	78,3	1,07	0,106	2,35	0,970	0,538
NH ₃ -N (mg/l)	162	160	160	162	167	162	0,7	0,072	2,4	0,908	0,450

Tableau 11. Suite

Temps d'incubation et item ²	Traitement						Effet				
	NI1			NI2			SEM	NI	SEM	F. Pr.	
	T	T+H	G	T	T+H	G				C1	C2
<i>17 heures</i>											
Gaz ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)	3392	3322	3341	3351	3280	3305	10,7	0,079	27,5	0,103	0,575
CH ₄ ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)	780	786	808	777	700	779	11,9	0,101	17,7	0,629	0,066
% CH ₄ in gaz	23,1	23,8	24,2	23,3	21,6	23,7	0,40	0,234	0,50	0,904	0,094
AGV Totaux ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)	2149	2154	2142	2123	2110	2168	10,8	0,414	21,2	0,783	0,456
CH ₄ /AGV Totaux (mol/mol)	0,366	0,366	0,378	0,367	0,333	0,360	0,0054	0,117	0,0080	0,479	0,109
Différents AGV ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)											
Acétate	1459	1453	1439	1430	1423	1446	4,8	0,085	15,6	0,844	0,846
Propionate	305	312	307	310	307	322	2,6	0,287	3,8	0,353	0,420
Butyrate	304	307	312	301	298	315	2,8	0,504	4,2	0,345	0,091
Valérate	29,7	30,3	31,1	30,2	29,8	31,6	0,43	0,832	0,55	0,273	0,110
Isobutyrate	21,9	22,3	22,7	22,9	22,5	23,0	0,41	0,443	0,41	0,689	0,412
Isovalérate	29,2	29,1	30,3	29,9	29,3	31,0	0,44	0,465	0,59	0,583	0,114
Acétate/Propionate (mol/mol)	4,78	4,69	4,71	4,63	4,64	4,55	0,021	0,028	0,059	0,426	0,663
MOF (mg/flacon)	192	193	192	190	188	194	1,0	0,367	1,9	0,719	0,379
NH ₃ -N (mg/l)	243	237	239	236	237	243	2,8	0,774	2,6	0,756	0,250

¹T: Traitement témoin sans lipides correspondant à l'incorporation de Tourteau; T+H: Traitement «Tourteau+ Huile»; G: Traitement «Graines entières»; F.Pr: Forme de Présentation d'oléagineuse; ETM: écart type de la moyenne ; C1: Contraste (T vs T+H & G); C2: contraste (T+H vs G).

²AGV: Acides gras volatils; MOF: Matière organique fermentescible

Aucune interaction «NI x forme de présentation d'oléagineuse» a été significative (p>0,10)

Tableau 12. Effets de l'incorporation de lipides de cardon sous forme d'huile ou de graines selon deux niveaux d'incorporation de lipides (NI1: 2,75% et NI2: 5,5%) dans le substrat «Engrangement» sur les fermentations ruminale et la production de gaz¹

Temps d'incubation et item ²	Traitements						Effets				
	NI1			NI2			SEM	NI	SEM	F. Pr.	
	T	T+H	G	T	T+H	G				C1	C2
<i>6 heures</i>											
AGV Totaux (μmol/flacon)	873	871	885	863	877	837	13,5	0,426	22,0	0,986	0,678
Différents AGV (μmol/flacon)											
Acétate	572	569	573	561	567	539	8,4	0,274	14,6	0,790	0,566
Propionate	152	153	152	152	156	150	1,9	0,921	3,9	0,920	0,543
Butyrate	119	119	129	119	123	118	2,9	0,639	3,4	0,448	0,589
Valérate	7,91	8,23	8,47	8,06	8,50	8,19	0,238	0,895	0,266	0,288	0,928
Isobutyrate	10,1	10,1	10,3	10,2	10,7	9,71	0,156	0,978	0,170	0,680	0,121
Isovalérate	11,8	11,9	12,6	12,2	12,6	11,8	0,29	0,792	0,34	0,666	0,938
Acétate/Propionate (mol/mol)	3,80	3,75	3,78	3,70	3,65	3,62	0,019	0,022	0,035	0,297	0,960
MOF (mg/flacon)	78,0	77,8	79,6	77,1	78,5	75,0	1,27	0,438	2,01	0,944	0,776
NH ₃ -N (mg/l)	154	152	157	162	158	155	1,3	0,114	2,6	0,508	0,814

Tableau 12. Suite

Temps d'incubation et item ²	Traitements						Effets				
	NI1			NI2			SEM	NI	SEM	F. Pr.	
	T	T+H	G	T	T+H	G				C1	C2
<i>17 heures</i>											
Gaz ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)	3377	3356	3316	3414	3388	3252	14,7	0,927	37,3	0,165	0,122
CH ₄ ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)	744	694	686	725	549	732	21,5	0,284	24,5	0,039	0,026
% CH ₄ in gaz	22,0	20,6	20,8	21,1	15,9	22,4	0,77	0,315	0,77	0,113	0,010
AGV Totaux ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)	1983	2057	2075	2052	2137	2021	30,1	0,506	40,1	0,284	0,399
CH ₄ /AGV Totaux (mol/mol)	0,375	0,337	0,331	0,354	0,252	0,364	0,0140	0,306	0,0112	0,008	0,006
Différents AGV ($\mu\text{mol}/\text{flacon}$)											
Acétate	1275	1319	1327	1320	1370	1295	22,7	0,558	27,2	0,380	0,404
Propionate	344	360	369	351	374	356	4,9	0,700	6,1	0,039	0,602
Butyrate	298	309	309	311	322	302	2,8	0,218	6,3	0,441	0,283
Valérate	19,3	20,5	20,4	20,3	20,9	20,2	0,244	0,330	0,527	0,337	0,620
Isobutyrate	19,6	19,2	20,0	20,0	21,0	19,3	0,319	0,328	0,661	0,885	0,637
Isovalérate	27,3	28,2	28,0	29,8	29,4	27,5	0,190	0,029	0,608	0,733	0,235
Acétate/Propionate (mol/mol)	3,74	3,69	3,65	3,78	3,70	3,68	0,031	0,579	0,031	0,057	0,472
MOF (mg/flacon)	179	186	187	186	193	183	2,6	0,486	3,6	0,294	0,375
NH ₃ -N (mg/l)	221	218	216	220	223	226	3,2	0,419	4,8	0,972	0,964

¹T: Traitement témoin sans lipides correspondant à l'incorporation de Tourteau; T+H: Traitement «Tourteau+ Huile»; G: Traitement «Graines entières»; F.Pr: Forme de Présentation d'oléagineuse; ETM: écart type de la moyenne ; C1: Contraste (T vs T+H & G); C2: contraste (T+H vs G).

²AGV: Acides gras volatils; MOF: Matière organique fermentescible

Les interactions «NI x forme de présentation d'oléagineuse» ont montré une tendance à 6 heures pour isobutyrate (p=0,090) et ont été significatives à 17 heures pour CH₄ (p=0,050), % CH₄ in gaz (p=0,038) et CH₄/AGV totaux (p=0,010).

Le type de régime alimentaire utilisé dans les différentes expériences est également un facteur qui peut influer sur l'efficacité des huiles à modifier la fermentation ruminale (Ueda et al., 2003). Palmquist (1988) a noté que les effets négatifs de l'ajout d'huile sur la fermentation dans le rumen pourraient être minimisés si le régime contenait une forte proportion de fourrage, puisque une concentration élevée de fibres favorise la croissance des micro-organismes responsables de l'hydrolyse et de biohydrogénéation des lipides de la ration (Jenkins, 1993). Ainsi, Jalc et al. (2006a) ont observé que l'apport 5% d'huile de lin, colza ou poisson à une ration 100% foin de luzerne dans des fermentateurs Rusitec n'a pas changé les paramètres de la fermentation, alors que la même dose de ces huiles ajoutée à une ration composée de 40% de luzerne verte et 60% de maïs réduit la dégradation de la fibre et le rapport acétate/propionate (Jalc et al., 2006b).

Un autre facteur qui peut affecter les résultats est le type de système *in vitro* utilisé. Dans les systèmes *in vitro* fermés les incubations habituellement ne durent plus de 24 heures, de sorte que l'adaptation des populations microbiennes est limitée (Matthew et al., 2015) et en plus les huiles sont ajoutées une seule fois. En revanche, dans les fermentateurs les huiles sont ajoutées pendant plusieurs jours et il y a des changements dans les populations ruminales au cours de la période d'incubation (Soto et al., 2012). Ces faits peuvent justifier que les effets des huiles sont manifestés de façon plus marquée dans des fermentateurs que dans des systèmes fermés *in vitro*, puisque les changements qui se produisent chez les populations du rumen sensibles aux effets des huiles seront reflétés dans les paramètres de fermentation.

Les études qui ont comparé les effets de graines oléagineuses dans la fermentation ruminale à ceux observés à l'inclusion des huiles ont également produit des résultats variables. Avec les graines entières, les lipides seraient libérées plus lentement dans le rumen et donc il sera attendu des effets plus faibles sur la fermentation ruminale qu'avec l'administration des huiles (Jouany et al., 2000). Cependant, dans différents travaux *in vivo*, des différences entre les deux formes d'administration au niveau la fermentation ruminale n'ont pas été observées comme a été le cas des graines de lin (Martin et al, 2008; Doreau et al, 2009; Benchaar et al, 2014) avec les vaches laitières et des graines colza avec les moutons (Pallister and Smithard, 1987). Dans tous ces travaux, le niveau d'administration de l'huile fut

inférieur à 6%. Ces résultats ne sont pas en accord avec certains effets observés dans notre étude, puisque dans certains cas on a observé une moindre production de certains AGV avec les grains de soja et tournesol relativement aux traitements « T+H ». Au contraire, ces effets n'ont pas été observés pour les graines de cardon, indiquant que les effets varient selon le type de graine. En outre, il faut rappeler que, dans notre étude on a utilisé l'huile extraite des graines testées dans l'étude, tandis qu'en d'autres travaux les huiles utilisées ont été commerciales qui ne disposent pas exactement du même profil d'acides gras que les graines avec lesquelles elles ont été comparées.

Parmi les trois graines analysées, le cardon était le seul qui a montré un effet inhibiteur de la production de méthane. Cet effet fut plus prononcé lorsque le cardon a été administré sous forme huile que sous forme des graines entières et avec le substrat «Engrassement» qu'avec le substrat «Lait». Cependant, cet effet n'a pas été accompagné par des changements importants dans la production d'AGV ou de la concentration de NH₃-N, ce qui pourrait indiquer un effet direct sur les archées méthanogènes sans affecter les autres populations du rumen. Dans une étude récente, Patra et Yu (2015) ont analysé le nombre des UTOs (unités taxonomiques opérationnelles) sur cultures *in vitro* qui ont été supplémentées avec différentes huiles essentielles et ils ont constaté que 60 UTOs étaient significativement corrélées avec des paramètres fermentatifs comme la dégradabilité du substrat, la concentration de NH₃-N et les proportions molaires d'AGV, mais seulement quatre d'entre eux ont été corrélées avec la production de méthane. En accord avec ces résultats, Patra et Yu (2013) ont constaté que l'ajout d'huile de coprah ou de poisson dans des cultures *in vitro* réduit la production de méthane et l'abondance des archées méthanogènes, sans aucun effet sur les bactéries totales. De même, Mao et al. (2012) a été indiqué que les changements dans les populations bactériennes et le profil d'AGV peuvent dépendre d'autres variables telles que la concurrence entre bactéries vis-à-vis les substrats et le métabolisme bactérien.

V. CONCLUSIONS

1. Les effets des graines sur la réduction de méthane ont été principalement associés avec la diminution du niveau de fermentation.
2. Concernant la fermentation, le tournesol et le cardon compensent leurs teneurs en fibres et en lignine plus élevés en comparaison au soja par une dégradation plus rapide. Cette compensation est au moins totale pour le tournesol, pendant qu'elle est élevé mais partielle pour le cardon.
3. L'ajout de soja, de tournesol ou de cardon sous forme d'huile ou comme graines pour apporter 2,75 et 5,5% de lipides supplémentaires à peine a entraîné des modifications de la fermentation in vitro du substrat «Lait» et dans le cas du substrat «Engraissement», elles furent peu marquées alors que celles entre les deux formes de présentation de lipides ont été incohérents. Egalement, pas de différences significatives entre les deux niveaux d'inclusion indiqués ci-dessus ont été observées.
4. La graine de cardon était le seul qui a provoqué une réduction significative de la production de méthane par rapport au traitement de contrôle et cet effet a été observé (réduction de 9,4%) seulement avec le substrat "Engraissement". La réduction observée était plus élevé avec l'huile (15,4%) qu'avec la graine (3,4%).

VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2000. Official Methods of Analysis. Gaithersburg, MD, USA: AOAC International.
- Beauchemin K.A., Kreuzer M., O'Mara F., McAllister T.A. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. Austr. J. Exp. Agric. 48: 21–27.
- Beauchemin K.A., McGinn S.M., Benchaar C., Holtshausen L. 2009. Crushed sunflower, flax, or canola seeds in lactating dairy cow diets: effects on methane production, rumen fermentation, and milk production. J. Dairy Sci. 92: 2118–2127.
- Benchaar C., McAllister T.A., Petit H.V., Chouinard P.Y. 2014. Whole flax seed and flax oil supplementation of dairy cows fed high-forage or high-concentrate diets: Effects on digestion, ruminal fermentation characteristics, protozoal populations and milk fatty acid profile. Anim. Feed Sci. Technol. 198: 117–129.
- Boadi D., Benchaar C., Chiquette J., Massé D. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. Can. J. Anim. Sci. 84: 319–335.
- Bracmort K., Ramseur J.L., McCarthy J.E., Folger P., Marples D.J. 2011. Methane Capture : Options for Greenhouse Gas Emission Reduction. Congressional Research Service. USA.
- Cajarville C., González J., Repetto J. L., Alvir M.R., Rodríguez C.A. 2000. Nutritional evaluation of cardoon (*Cynara cardunculus*) seed for ruminants. Anim. Feed Sci. Tech. 87: 203-213.
- Chung Y.H., He M.L., McGinn S.M., McAllister T.A., Beauchemin K.A. 2011. Linseed suppresses enteric methane emissions from cattle fed barley silage, but not from those fed grass hay. Anim. Feed Sci. Technol. 166-167: 321-329.
- Cieślak A., Váradiová Z., Kišidayová S., Jalč D., Szumacher-Strabel M. 2013. Effect of diets with fruit oils supplements on rumen fermentation parameters, fatty acid composition and methane production *in vitro*. J. Anim. Feed Sci. 22: 26–34.

- Cieślak A., Miltko R., Bełżecki G., Szumacher-Srabel M., Potkański A., Kwiatkowska E., Michałowski T. 2006 a. Effect of vegetable oils on the methane concentration and population density of the rumen ciliate, *Eremoplastrondilobum*, grow in vitro. J. Anim. Feed Sci. 15: 15-18.
- Cieślak A., Szumacher-Strabel M., Szymankiwicz E., Piękniewski M., Oleszak P., Siwinski Ł., Potkański A. 2006 b. Coconut oil reduces protozoa count and methane release during fermentation in a RUSITEC system. J. Anim Feed Sci. 15: 19-22.
- Demeyer D., Fievez V. 2000. Ruminants et environnement: la méthanolégenèse. Ann. Zootech. 49: 95-112.
- Dohme F., Machmüller A., Wasserfallen A., Kreuzer, M. 2000. Comparative efficiency of various fats rich in medium chain fatty acids to suppress ruminal methanogenesis as measured with RUSITEC. Can. J. Anim. Sci. 80: 473–482.
- Dohme F., Machmüller A., Wasserfallen A., Kreuzer, M., 2001. Ruminal methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets. Lett. Appl. Microbiol. 32: 47-51.
- Dong Y., Bae H.D., McAllister T.A., Mathison G.W., Cheng K.J. 1997. Lipid induced depression of methane production and digestibility in the artificial rumen system (RUSITEC). Can. J. Anim. Sci. 77: 269–278.
- Doreau M., Aurousseau E., Martin C. 2009. Effects of linseed lipids fed as rolled seeds, extruded seeds or oil on organic matter and crude protein digestion in cows. Anim. Feed Sci. Technol. 150: 187–196.
- Doreau M., Bauchart D., Chilliard Y. 2011. Enhancing fatty acid composition of milk and meat through animal feeding. Anim. Prod. Sci. 51(1): 19-29.
- Doreau M., Marin C., Eugène M., Popova M., Morgavi D.P. 2011. Leviers d'action pour réduire la production de méthane entérique par les ruminants. INRA Prod. Anim. 24 (5): 461-474.
- Eugène M., Benchaar C., Chiquette J., Massé D. 2008. Meta-analysis on the effects of lipid supplementation on methane production of lactating dairy cows. Can. J. Anim. Sci. 88: 331-337.

- FAO. 1997. Élevage et environnement: à la recherche de l'équilibre. En: <http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/fr/lead/toolbox/FAO/Main1/index.htm>
- FAO. 2002. Agriculture mondiale: Horizon 2015/2030. Disponible sur <http://www.fao.org/docrep/004/y3557f/y3557f00.htm#TopOfPage>
- FAO. 2006a. Livestock's long shadow: environmental issues and options. Disponible sur <http://www.fao.org/docrep/010/a0701e/a0701e00.HTM>
- FAO. 2006b. Focus: les impacts de l'élevage sur l'environnement. Disponible sur <http://www.fao.org/ag/fr/magazine/0612sp1.htm>
- FAO. 2006c. L'élevage aussi est une menace pour l'environnement, des remèdes s'imposent. En: <http://www.fao.org/Newsroom/fr/news/2006/1000448/index.html>.
- Garcés R., Mancha M. 1993. Anal. Biochem. 211: 139-143.
- Giger-Reverdin S., Morand-Fehr P., Tran G. 2003. Literature survey of the influence of dietary fat composition on methane production in dairy cattle. Livest. Prod. Sci. 82: 73-79.
- Grainger C., Williams R., Clarke T., Wright A.D.G., Eckard R.J. 2010. Supplementation with whole cottonseed causes long-term reduction of methane emissions from lactating dairy cows offered a forage and cereal grain diet. J. Dairy Sci. 93: 2612–2619.
- Georing H.K., Van Soest P.J., 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). USDA Agricultural Handbook No.379.
- Hervás G., Luna P., Mantecón A.R., Castañares N., de la Fuente M.A., Juárez M., Frutos P. 2008. Effect of diet supplementation with sunflower oil on milk production, fatty acid profile and ruminal fermentation in lactating dairy ewes. J Dairy Res. 75: 399-405.
- INRA. 2008. Projections des émissions/absorptions de gaz à effet de serre dans les secteurs forêt et agriculture aux horizons 2010 et 2010. Disponible sur http://www.grignon.inra.fr/economie-publique/publi/GES_MAP.pdf
- Jacob A.B., Balakrishnan V., Kathirvelan C. 2012. Effect of amount and source of vegetable oils in a high fibrous cattle diet on in vitro fermentation, nutrient degradability and rumen cis-9, trans-11 CLA concentration. J. Appl. Anim. Res.

- 40: 148-153.
- Jalc D., Potkanski A., Szumacher-Strabel M., Kowalczyk J., Cieslak A. 2006a. The effect of a forage diet and different fat sources on rumen fermentation *in vitro*. *J. Anim. Feed Sci.* 15, Suppl. 1: 129–134.
- Jalc D., Potkanski A., Szumacher-Strabel M., Kowalczyk J., Cieslak A. 2006b. The effect of a high concentrate diet and different fat sources on rumen fermentation *in vitro*. *J. Anim. Feed Sci.* 15, Suppl. 1: 137-140.
- Jalc D., Certik M., Kundrikova K., et Namestkova P., 2007. Effect of unsaturated C18 fatty acids (oleic, linoleic and α -linolenic acid) on ruminal fermentation and production of fatty acid isomers in an artificial rumen. *VeterinarniMedicina*, 52, 2007 (3): 87-94.
- Jenkins T.C. 1993. Lipid metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 76:3851–3863.
- Jordan E., Kenny D., Hawkins M., Malone R., Lovett D. K., et O'Mara F. P., 2006 c. Effect of refined soy oil or whole soybeans on intake, methane output, and performance of young bulls. *J. Anim. Sci.* vol. 84(9): 2418–2425.
- Jordan E., Lovett D.K., Hawkins M., Callan J. J., O'Mara F.P. 2006a. The effect of varying levels of coconut oil on intake, digestibility and methane output from continental cross beef heifers. *Anim. Sci.* 82: 859–865.
- Jordan E., Lovett D. K., Monahan F. J., Callan J., Flynn B., O'Mara F.P. 2006b. Effect of refined coconut oil or copra meal on methane output and on intake and performance of beef heifers. *J. Anim. Sci.* 84: 162–170.
- Jouany J. P. 2010. Mieux comprendre le rumen, un fermenteur multitâche très efficace. En: <http://www.paysan-breton.fr/images/upload/pdf/111014alire.pdf>.
- Jouany J.P., Michalet-Doreau B., Doreau M. 2000. Manipulation of the rumen ecosystem to support high-performance beef cattle. *Asian-Austr. J. Anim. Sci.* 13: 96–114.
- Jouany J.P., Thivend P. 2008. La production de méthane d'origine digestive chez les ruminants et son impact sur le réchauffement climatique. *Revue mangement et avenir* 2008/6 (n° 20).

- Lovett D.K., Lovell S., Stack L., Callan J., Finlay M., Conolly J., O'Mara F.P. 2003. Effect of forage/concentrate ratio and dietary coconut oil level on methane output and performance of finishing beef heifers. *Livest. Prod. Sci.* 84: 135-146.
- Machmüller A., Ossowski D. A., Wanner M., Kreuzer, M. 1998. Potential of various fatty feeds to reduce methane release from rumen fermentation in vitro (Rusitec). *Anim. Feed Sci. Technol.* 71: 117–130.
- Machmüller A., Ossowski D.A., Kreuzer M. 2000. Comparative evaluation of the effects of coconut oil, oilseeds and crystalline fat on methane release, digestion and energy balance in lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 85: 41–60.
- Mao H.L., Wang J.K., Zhou Y.Y., Liu J.X. 2010. Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. *Livest. Sci.* 129: 56–62.
- Mao S., Zhang R., Wand D., Zhu W. 2012. The diversity of the fecal bacterial community and its relationship with the concentration of volatile fatty acids in the feces during subacute rumen acidosis in dairy cows. *BMC Vet .Res.* 8: 237 (13 pp.). Disponible sur <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/8/237>.
- Martin C., Ferlay A., Chilliard Y., Doreau M. 2009. Decrease in methane emissions in dairy cows with dietary linseed content. *Proc. Ann. Meet. Brit. Soc. Anim. Sci.*: 21.
- Martin C., Morgavi D.P., Doreau M. 2006. Comment réduire la production de méthane chez les ruminants?. *Fourrages* 187: 283-300.
- Martin C., Morgavi D.P., Doreau M. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal*, 4: 351-365.
- Martin C., Rouel J., Jouany J.P., Doreau M., Chilliard Y. 2008. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed or linseed oil. *J. Anim. Sci.* 86: 2642–2650.
- Martínez M.E., Ranilla M.J., Tejido M.L. Ramos S., Carro M.D. 2010. The effect of the diet fed to donor sheep on *in vitro* methane production and ruminal fermentation of diets of variable composition. *Anim. Feed Science Technol.* 158: 126–135.

- Mateos I., Ranilla M.J., Saro C., Carro M.D. 2015. Comparison of fermentation characteristics and bacterial diversity in the rumen of sheep and batch cultures or rumen microorganisms. *J. Agric. Sci.* (En prensa).
- Mateos I., Ranilla M.J., Tejido M.L., Saro C., Kamel C., Carro M.D. 2013. The influence of diet on the effectiveness of garlic oil and cinnamaldehyde to manipulate *in vitro* ruminal fermentation and methane production. *Anim. Prod. Sci.* 53: 299-307.
- Moletta R. 2011. Méthanisation. 2ème Édition. Editions Tech et Doc chez Lavoisier. 547 pp.
- NASA. 2014. NASA Finds 2013 Sustained Long-Term Climate Warming Trend. Disponible sur <http://www.giss.nasa.gov/research/news/20140121/>
- Pallister S.M., Smithard R.R. 1987. The digestion, by sheep, of diets containing different physical forms of rapeseed. *J. Agric. Sci. Camb.* 109: 459–465.
- Palmquist D. L. 1988. The feeding value of fats. In: *Feed Science*. E. R. Orskov, ed. Elsevier Sci. Publ. A.V., Amsterdam, The Netherlands. pp: 293–311.
- Patra A. K., Yu Z. 2013. Effects of coconut and fish oils on ruminal methanogenesis, fermentation, and abundance and diversity of microbial populations *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 96:1782–1792.
- Patra A. K., Yu Z. 2015. Essential oils affect populations of some rumen bacteria *in vitro* as revealed by microarray analysis. *Microbiol.* 6: article 297. En: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00297/abstract>.
- Popova M., Morgavi D.P., Doreau M., Martin C., 2011. Production de méthane et interactions microbiennes dans le rumen. In : Gaz à effet de serre en élevage bovin: le méthane. Doreau M., Baumont R., Perez J.M. (Eds). Dossier, INRA Prod. Anim. 24: 447-460.
- Rasmussen J., Harrison A. 2011. The Benefits of Supplementary Fat in Feed Rations for Ruminants with Particular Focus on Reducing Levels of Methane Production. ISRN Vet. Sci. Article ID 613172, 10 pages.

- SAS (2012). SAS Institute Inc. SAS/STAT 12.1 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Sauvant D. 1992. La production de méthane dans la biosphère : le rôle des animaux d'élevage. Le Courrier de la Cellule Environnement n°18, décembre 1992. En: <http://www7.inra.fr/dpenv/sauvac18.htm>
- Soliva C.R., Hindrichsen I.K., Meile L., Kreuzer M., Machmüller A. 2003. Effects of mixtures of lauric and myristic acid on rumen methanogens and methanogenesis in vitro. Lett. Appl. Microbiol., 37(1): 35-39.
- Soto E.C., Yáñez-Ruiz D.R., Cantalapiedra-Hijar G., Vivas A., Molina-Alcaide E. 2012. Changes in ruminal microbiota due to rumen content processing and incubation in single-flow continuous-culture fermenters. Anim. Prod. Sci. 52: 813-822.
- Ueda K., Ferlay A., Chabrot J., Loor J.J. Chilliard Y., Doreau M. 2003. Effect of linseed oil supplementation on ruminal digestion in dairy cows fed diets with different forage:concentrate ratios. J. Dairy Sci. 86: 3999–4007.
- Van Soest P.J. 1982. Nutritional ecology of the ruminant. O & B BOOKS, Inc. Corvallis, Oregon. USA.
- Van Soest P.J., Robertson J.B., Lewis B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-strach polysaccharides in relation to animal nutrition. J.Dairy Sci. 74: 3583-3597.
- Vargas J.E., Andrés S., Yáñez Ruiz D.R., López S. 2011. The effect of olive, sunflower or linseed oils on the fermentation pattern and methane production in the rumen simulating technique. Options Méditerranéennes, Série A. 99: 163-168.
- Weatherburn M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Analytical Chemistry 39: 971-974.

