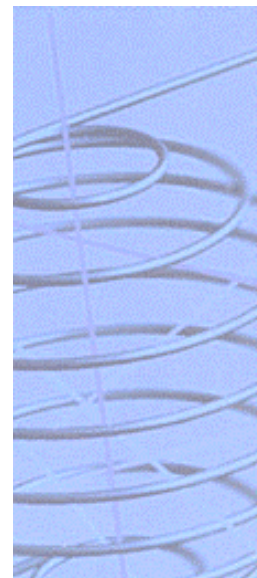


# Effet de la composition botanique et la supplémentation sur les émissions de méthane par du bétail sur pâturage

Rapport Final

UG - Département de Production animale – CLO - Gent



## Changement global et développement durable

*Sous-programme 2 : appui scientifique à la politique belge*

## Global change en duurzame ontwikkeling

*Deelprogramma 2: wetenschappelijke ondersteuning van het beleid in België*

N° CG/02/29a & CG/34/29b

Développement durable | Duurzame ontwikkeling



FEDERALE DIENSTEN VOOR  
WETENSCHAPPELIJKE, TECHNISCHE  
EN CULTURELE AANGELEGENHEDEN  
Wetenschapsstraat 8 ■ B-1000 BRUSSEL  
Tel. 02 238 34 11 ■ Fax 02 230 59 12  
URL : [www.belspo.be](http://www.belspo.be)

SERVICES FEDERAUX DES  
AFFAIRES SCIENTIFIQUES,  
TECHNIQUES ET CULTURELLES

rue de la Science 8 ■ B-1000 BRUXELLES  
Tél. 02 238 34 11 ■ Fax 02 230 59 12  
URL : [www.belspo.be](http://www.belspo.be)



D/2001/1191/19  
Uitgeven in 2001 voor de  
Federale diensten voor wetenschappelijke, technische en culturele aangelegenheden  
Publié en 2001 par les  
Services fédéraux des affaires scientifiques, techniques et culturelles

Voor meer informatie / Pour d'autres renseignements :

Madame A. Fierens  
DWTC/SSTC  
Wetenschapstraat 8 rue de la science  
Brussel 1000 Bruxelles  
Tel. : +32-2-238.36.60  
Fax. : +32-2-230.59.12  
E-mail : fier @belspo.be  
Internet : <http://www.belspo.be>

Noch de Federale diensten voor wetenschappelijke, technische en culturele aangelegenheden (DWTC), noch eenieder die handelt in de naam van de DWTC is verantwoordelijk voor het gebruik dat van de volgende informatie zou worden gemaakt.

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een gegevensbestand of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën of enige andere manier zonder de aanduiding van de referentie.

Les services fédéraux des Affaires scientifiques, techniques et culturelles (SSTC) ainsi que toute personne agissant en leur nom ne peuvent être tenus pour responsables de l'éventuelle utilisation qui serait faite des informations qui suivent.

Cette publication ne peut ni être reproduite, même partiellement, ni stockée dans un système de récupération ni transmise sous aucune forme ou par aucun moyens électronique, mécanique, photocopies, enregistrement ou autres sans y avoir indiqué la référence.

**SERVICES DU PREMIER MINISTRE  
AFFAIRES SCIENTIFIQUES, TECHNIQUES ET CULTURELLES**

---

**PROGRAMME: CHANGEMENT GLOBAL ET DEVELOPPEMENT DURABLE**

**Sous - Programme 2**

**PROJET:  
EFFET DE LA COMPOSITION BOTANIQUE ET LA  
SUPPLEMENTATION SUR LES EMISSIONS  
DE METHANE PAR DU BETAIL SUR PATURAGE**

**RAPPORT FINAL  
CG/02/29a & CG/43/29b**

**Promoteur:**

**Prof. Dr. ir. Daniel Demeyer**

Département de Production Animale

Université de Gand

**Co-promoteur:**

**Prof. Dr. ir. L. Carlier**

Département de Phytotechnie et Ecophysiologie

Centre de Recherche Agricole de Gand

## **Données concernant le projet**

### **Financé par :**

Services fédéraux des affaires Scientifiques, Techniques et Culturelles

**Durée :** 24 mois (15 Mars 1999 - 14 Mars 2001)

**Coût :** 10.396.000 Fbe

### **Promoteur : Prof. Dr. ir. Daniel Demeyer**

Université de Gand, Département de Production Animale

Proefhoevestraat, 10 (9090 Melle, Belgique)

Tél : + 32 9 264 90 00 ; Fax : + 32 9 264 9099 ; e-mail Daniel. Demeyer@rug.ac.be

### **Co-promoteur : Prof. Dr. ir. L. Carlier**

Ministère des Petites Entreprises, du Commerce et de l'Agriculture

DG 6 Conseil de la Recherche et du Développement

Centre de Recherche Agricole - Gand

Département de Phytotechnie et Ecophysiologie

Burg. Van Gansberghelaan 109 (9820 Merelbeke, Belgique)

Tél : + 32 9 252 19 81 ; Fax : + 32 9 252 11 50 ; e-mail : dfe@clo.fgov.be

### **Equipe scientifique et technique :**

Dr. Léonidas Mbanzamihigo (scientifique : coordonateur du projet) (à charge du projet)

ir. Veerle Fievez (scientifique)

Mr. Paul Sterck (technicien) (à charge du projet) remplacé par M<sup>lle</sup> Sandra Saey (technicienne)

Mr. Benedict Van Oost (technicien) (à charge du projet)

### **Collaborateurs en provenance des autres institutions :**

Dr. ir. Federica Piattoni (scientifique, boursier de l'OCDE mais attachée à l'Université de Bologne, Italie) ; Dr. ir. Claudius Dacosta Gomez (scientifique, boursier de l'Université de Göttingen, (Allemagne) ; Dr. ir. Dragomir Catalin (scientifique de Institut de Biologie et Nutrition Animale de Balotesti, Roumanie, boursier de l'SSTC, service du Premier Ministre Belge)

## TABLE DES MATIERES

Données concernant le projet	2
<b>I. Introduction</b>	<b>10-15</b>
1.1. Importance de l'étude dans le programme	
1.2. Objectifs	
1.2.1. Développer une méthode facile et peu onéreuse pour mesurer les émissions de méthane par les ruminants	
1.2.2. Etudier les effets de la fertilisation et du niveau de fertilisation azotée sur la production de matière sèche, la composition botanique et chimique de deux types de pâturages	
1.2.3. Réduire les émissions de méthane par la fertilisation azotée des pâturages	
1.2.4. Etudier les effets de la fertilisation et du niveau de fertilisation azotée sur l'efficacité d'utilisation de l'azote par l'animal	
1.3. Résultats attendus	
<b>II. Ière année (1999): Effets de la fertilisation azotée sur la composition botanique et chimique d'un pâturage, les émissions de méthane et l'efficacité d'utilisation de l'azote</b>	<b>17-43</b>
2.1. Méthodologie	17-27
2.1.1. Expérience préliminaire	
2.1.2. Préparation et utilisation du pâturage	
2.1.3. Animaux et ration	
2.1.4. Mesure des paramètres du pâturage	
2.1.5. Evaluation de la quantité de matière sèche ingérée et apparemment digérée et collecte de urines	
2.1.6. Collecte des gaz et évaluation des émissions de méthane	
2.1.7. Collecte du jus du rumen et dosage des acides gras volatils et de l'ammoniac	
2.1.8. Dégradabilité <i>in sacco</i> (MS, protéines brutes)	
2.1.9. Incubations <i>in vitro</i>	
2.1.10. Vitesse de passage	
2.1.11. Comptage des protozoaires	

2.1.12. Analyses statistiques	
2.2. Résultats	27-43
2.2.1. Expérience préliminaire	
2.2.2 Effet de la saison et de la fertilisation azotée sur la production de matière sèche, la composition botanique et chimique du fourrage	
2.2.3. Evaluation de la méthode de mesure des émissions de méthane	
2.2.4. L'effet de la fertilisation azotée sur les émissions de méthane et le profil fermentaire dans le rumen	
2.2.5. Effet animal sur la production de méthane <i>in vivo</i> et les autres paramètres de la digestion ruminale	
2.2.6. Comparaison entre la quantité de méthane mesurée et celle estimée à l'aide des équations de l'IPCC	
2.2.7. Stoechiométrie de fermentation ruminale estimée à partir de la concentration des AGV et de la dégradabilité effective dans le rumen	
2.2.8. Effet de la fertilisation azotée sur l'efficacité de l'utilisation de l'azote dans le rumen	
2.2.9. Effet de la fertilisation azotée sur les protozoaires	
<b>IIème année (2000): Effet du niveau de fertilisation azotée et du système de supplémentation sur les émissions de méthane</b>	45-71
3.1. Méthodologie	45-50
3.1.1. Préparation et utilisation du pâturage	
3.1.2. Mesure des paramètres du pâturage	
3.1.3. Animaux et ration	
3.1.4. Collecte des gaz et évaluation de la production de méthane	
3.1.5. Collecte du jus du rumen et dosage des AGV et de l'ammoniac	
3.1.6. Incubations <i>in vitro</i>	
3.1.7. Dégradabilité <i>in sacco</i> (MS, protéines brutes) et vitesse de passage	
3.1.8. Mesure de la digestibilité totale apparente, de la croissance microbienne et de l'excrétion d'azote	
3.1.9. Analyses statistiques	
3.2. Résultats	51-68
3.2.1. Effet du niveau de fertilisation azotée sur la production de MS et la composition chimique du fourrage	

- 3.2.3. Effet du niveau de fertilisation azotée sur les émissions de méthane
- 3.2.4. Effet du système de supplémentation sur les émissions de méthane
- 3.2.5. Effet de la fertilisation azotée sur l'efficacité de l'utilisation de l'azote dans le rumen
  - 3.2.5.1. Effets du niveau de fertilisation azotée sur les valeurs OEB
  - 3.2.5.2. Effets du niveau de fertilisation azotée sur la concentration en  $\text{NH}_3$  dans le rumen
  - 3.2.5.3. Effets du niveau de fertilisation azotée sur la concentration en  $\text{NH}_3$  dans le rumen
  - 3.2.5.4. Effets du niveau de fertilisation azotée sur la croissance microbienne
- 3.2.6. Effets de la supplémentation et du système de supplémentation sur l'utilisation de l'azote alimentaire
  - 3.2.6.1. Effets de la supplémentation sur l'efficacité d'utilisation de l'azote
  - 3.2.6.2. Effets du système de supplémentation sur l'utilisation de l'azote alimentaire

#### **IV. Conclusion et recommandations**

69-71

- 4.1. Première année expérimentale (1999)
- 4.2. Deuxième année expérimentale (2000)
- 4.3. Première et deuxième années expérimentales (1999 et 2000)

#### **V. Annexe**

73-103

- 5.1. Bibliographie
- 5.2. Publications et communications découlant de la recherche
- 5.3. Mémoires découlant du projet et présentés pour l'obtention du Diplôme de bio-ingénieur en agriculture
- 5.4. Autres communications
- 5.5. Participation à des colloques et séminaires
- 5.6. Résultats détaillés

## TABLEAUX ET FIGURES

### 1. Tableaux

#### 1.1. Première année expérimentale

**Tableau 1:** Plan de coupe de l'herbe, fertilisation du pâturage et récolte du fourrage pour expérimentation

**Table 2:** Plan expérimental pour chaque saison

**Table 3:** Composition des gaz avant et après l'incubation *in vitro*

**Table 4:** Recouvrement de l'éthane et son effet sur la production des gaz *in vitro* (moyenne)

**Table 5:** Comparaison entre le CH<sub>4</sub> mesuré et le CH<sub>4</sub> calculée en utilisant C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> infusé

**Table 6:** L'effet de l'éthane sur les fermentations *in vitro* des contenus du rumen

**Table 7:** Effet de la fertilisation sur la production de matière sèche ainsi que la composition botanique et chimique du pâturage

**Tableau 8:** Comparaison de nos résultats avec ceux obtenus avec d'autres méthodes

**Table 9:** Effet de la fertilisation azotée sur les émissions de méthane *in vivo*, le pH, la concentration et les proportions des AGV

**Table 10:** Effet de la fertilisation azotée sur la production de méthane *in vitro*, la concentration et les proportions des AGV

**Table 11:** Effet animal sur les émissions de méthane *in vivo*, la digestion et les paramètres de fermentation ruminale

**Tableau 12:** Effet animal sur la production de méthane *in vitro* et les paramètres de la fermentation dans le rumen

**Table13:** Comparaison entre les émissions de méthane mesurées et estimées à l'aide des équations établies par l'IPCC

**Tableau 14:** Les bilans d'hydrogène métabolique calculés à partir de la dégradabilité effective de la matière organique et de la concentration des AGV dans le rumen

**Table 15:** Effet du traitement et de l'animal sur la concentration des protozoaires dans le rumen

**Tableau 16:** Dégradabilité *in sacco* des protéines brutes fraction rapidement dégradable a et dégradabilité effective DE

**Tableau 17:** Protéines brutes dégradées dans le rumen en comparaison de la matière sèche dégradée



**Tableau 18:** Pool d'ammoniacale dans le rumen, l'excrétion urinaire d'urée, et les dérivées purines excrétées dans les urines

## 1.2. Deuxième année expérimentale

**Tableau 19:** Plan expérimental: coupe de l'herbe, fertilisation du pâturage et récolte du fourrage pour expérimentation

**Table 20:** Effet du niveau de fertilisation azotée sur la production de MS et la composition chimique du fourrage

**Table 21:** Effet du niveau de fertilisation azotée sur les émissions de méthane *in vivo*, le pH et les AGV (saison 1)

**Table 22 :** Effet du niveau de fertilisation azotée sur les émissions de méthane *in vivo*, le pH et les AGV (saison 2)

**Tableau 23:** Effet de la fertilisation azotée sur la production de méthane et des AGV *in vitro* au cours de la première saison

**Tableau 24:** Effet du système de supplémentation sur la production de méthane *in vivo*, le pH et les AGV

**Table 25:** Effets de deux niveaux de fertilisation sur les valeurs OEB (g PB / jour) dans chaque mouton au début (saison 1) et à la fin (saison 2) de la saison de pâture

**Table 26:** Effets du niveau de fertilisation azotée sur la concentration en NH<sub>3</sub> dans le rumen de chaque mouton au début (saison 1) et à la fin (saison 2) de la saison de pâture

**Tableau 27:** Effets du niveau de fertilisation azotée sur la quantité d'azote ingérée, l'azote uréique excrété dans les urines, l'azote excrété dans les faécès par chaque mouton au début (saison 1) et à la fin (saison 2) de la saison de pâture

**Tableau 28:** Effets du niveau de fertilisation azotée sur la croissance dans le rumen de chaque mouton au début (saison 1) et à la fin (saison 2) de la saison de pâture

**Tableau 29:** Effets de la supplémentation avec de l'ensilage de maïs d'un fourrage fertilisé avec 400kgN/ha/an sur les valeurs OEB

**Tableau 30:** Effets de la supplémentation sur la concentration en NH<sub>3</sub> dans le rumen de chaque mouton

**Tableau 31:** Effets de la supplémentation sur la quantité d'azote ingérée, l'azote uréique excrété dans les urines et l'azote excrété dans les faécès par chaque mouton au début (saison 1) et à la fin (saison 2) de la saison de pâture

**Tableau 32:** Effets de la supplémentation sur le rendement de la croissance microbienne dans le rumen de chaque mouton au début (saison 1) et à la fin (saison 2) de la saison de pâture

**Tableau 33:** Effets de la stratégie de supplémentation sur la MS ingérée, les valeurs OEB, la concentration en  $\text{NH}_3$  dans le rumen ainsi que sur le rendement de la croissance microbienne dans le rumen de chaque mouton

**Tableau 34:** Effets de la stratégie de supplémentation sur la quantité d'azote ingérée, l'azote uréique excrété dans les urines l'azote excrété dans les faecès

## 2. Figures

### 2.1. Première année expérimentale

**Figure I:** Effet de la fertilisation azotée sur les émissions de méthane

**Figure II:** Effet du système de supplémentation sur les émissions de méthane

**Figure III:** Programme de fertilisation et subdivision du pâturage en parcelles

**Figure IV:** Plan quotidien de rationnement des animaux, d'infusion d' $\text{C}_2\text{H}_6$  et de collecte des gaz

**Figure V:** Schéma du dispositif utilisé pour infuser l'éthane et collecter les gaz et le jus du rumen

### 2.1. Deuxième année expérimentale

**Figure VI:** Plan quotidien de rationnement des animaux, d'infusion d' $\text{C}_2\text{H}_6$  et de collecte des gaz

**Figure VII:** Corrélation entre la production de méthane et la quantité de MS ingérée

## **I INTRODUCTION**

## 1.1. Importance de l'étude dans le programme

L'augmentation de la température globale provoquée par l'élévation de la concentration atmosphérique des gaz à effet de serre est devenue un sujet de grande préoccupation d'où l'attention particulière portée sur le méthane comme l'un des principaux gaz à effet de serre. En effet, la concentration atmosphérique du méthane est passée de 0.70 à 1.68 ppm de 1787 à 1987 (Blake and Rowland, 1988) et continue d'augmenter chaque année de 0.6% (Steele et al., 1992). En plus de l'absorption direct des rayons infrarouges, le méthane réagit photochimiquement pour produire d'autres gaz à effet de serre comme l'ozone et le gaz carbonique (Rhode, 1990). Comparé aux autres gaz à effet de serre, le méthane possède une plus courte durée de vie dans l'atmosphère (10 ans) faisant de lui un excellent candidat pour le contrôle. A titre indicatif, une diminution de sa production de 10% seulement pourrait stopper son augmentation annuelle (UNEP, 1993). Bien plus, sa capacité potentielle d'augmenter la température globale étant 21 fois celle du gaz carbonique (Rhode, 1990), la réduction des émissions de méthane aurait des retombés positifs très importants sur le changement climatique. Le gouvernement Belge ayant ratifié la convention internationale sur la réduction des gaz à effet de serre (Protocole de Kyoto, 1997), il est important d'explorer certaines mesures susceptibles de réduire ou tout au moins de stabiliser les émissions de méthane.

Contrairement aux autres parties du monde comme l'Asie par exemple où le méthane d'origine agricole est produit en grande partie dans les rizières, en Europe en générale et en Belgique en particulier, ce gaz est produit surtout dans les fermes laitières. Au niveau Européen les émissions de méthane d'origine agricole principalement en provenance du cheptel laitier sont estimées à 45% de la totalité des émissions de méthane alors qu'en Belgique ces émissions vont jusqu'à 60% (OECD, 1998 ; IPCC, 1999). Au cours de la fermentation microbienne qui a lieu principalement dans le rumen, les ruminants en générale et les vaches en particulier produisent du méthane qui est expiré dans l'atmosphère. Le méthane produit dans le tube digestif des animaux monogastriques et dans les entrepôts de fescès est d'une importance mineure. Puisque les pâturages occupent environ 42% de la surface agricole nationale et que la pâture est considérée comme la façon la moins onéreuse d'élever les ruminants, l'évaluation des émissions de méthane par du bétail au pâturage s'avère indispensable. Bien plus, l'utilisation du méthane comme source d'énergie testée dans quelques fermes laitières ayant montré ses limites, il est plus intéressant d'attaquer le problème à sa source en adoptant un système de fertilisation des pâturages susceptible de

réduire les émissions de méthane par les ruminants.

## **1.2. Objectifs**

### **1.2.1. Développer une méthode facile et peu onéreuse pour mesurer les émissions de méthane par les ruminants**

Les chiffres sur les émissions de méthane par les animaux domestiques cités plus ne sont qu'approximatifs suite à l'absence d'une méthode de mesure de la production de CH<sub>4</sub> sur pâturage. La méthode utilisant l'hexafluorure de soufre comme gaz traceur, proposée il y a 7 ans par Johnson et al. (1994) ainsi que la méthode micro-météorologique développée il y a seulement deux ans par Harper et al. (1999) ce sont avérées très coûteuses et difficiles à mettre en oeuvre. Bien plus, le SF<sub>6</sub> étant lui-même un gaz à effet de serre, il ne serait pas éthiquement acceptable de vouloir réduire les émissions d'un gaz à effet de serre (le méthane) en utilisant un autre gaz à effet de serre même si celui-ci n'est utilisé qu'en petite quantité. Ce projet a donc comme première ambition de combler cette lacune en fournissant une méthode en même temps simple et moins chère.

### **1.2.2. Etudier les effets de la fertilisation et du niveau de fertilisation azotée sur la production de matière sèche, la composition botanique et chimique de deux types de pâturages**

L'élevage des ruminants est basé en grande partie sur l'utilisation des pâturages. L'un des facteurs limitants pour la production de la biomasse végétale est l'azote. Néanmoins, pour ne pas polluer l'environnement avec des excédents d'azote, en plus de l'utilisation des engrais verts, il faut adopter des niveaux de fertilisation compatibles avec les conditions écologiques. Le deuxième objectif de ce projet est d'étudier les effets d'un niveau modéré de fertilisation azotée (150kg/ha/an) sur la production de la biomasse et la composition botanique et chimique d'un pâturage mixte (ray grass / trèfle). Dans un deuxième temps, l'effet de deux niveaux de fertilisation azotée (200kg et 400kg/ha/an) sur la production de matière sèche (MS) et la composition chimique d'un pâturage composé de ray-grass uniquement a été étudié.

### **1.2.3. Réduire les émissions de méthane par la fertilisation azotée des pâturages**

Durant les trois dernières décennies, plusieurs produits destinés à réduire les émissions de méthane issues du rumen ont été étudiés (pour plus d'information, lire: Van Nevel and Demeyer, 1992 ; Mbanzamihigo et al., 1995, 1996 ; Van Nevel and Demeyer, 1996 ; Assuma, 1999). Le rumen étant un système intégré, certains produits ont provoqué des conséquences néfastes sur l'ingestion, la digestion des fibres, la croissance microbienne alors que d'autres n'ont eu qu'un effet passager (Chalupa et al., 1980 ; Russel and Martin, 1984 ; Demeyer et Van Nevel, 1987 ; Immig et al., 1995). Bien plus, la méfiance des consommateurs envers l'utilisation des produits chimiques dans l'alimentation des animaux domestiques est de plus en plus grande. Ainsi, les chercheurs ont tenté de réduire la méthanogenèse par des moyens biologiques et par le changement des stratégies d'alimentation. L'utilisation des graisses végétales naturelles a montré de bons résultats, mais leur incorporation dans l'alimentation des ruminants à plus de 5% de la ration a malheureusement entraîné une diminution de la digestion des fibres (Kowalczyk et al., 1977 ; Broudiscou et al., 1990 ; Machmuller et al., 1998). Une autre solution qui a été envisagée est la réduction des méthanogènes accompagnée d'une installation dans le rumen de l'acétogénèse réductrice, phénomène naturel qui a lieu dans le caecum des ruminants transformant le CO<sub>2</sub> et l'H<sub>2</sub> non pas en CH<sub>4</sub> mais en acétate très riche en énergie (Lajoie et al., 1988 ; Demeyer and de Graeve, 1991). Malheureusement, les méthanogènes se sont adaptées et les acétogènes réductrices ont été mis hors compétition par les méthanogènes (Demeyer et al., 1996 ; Immig et al., 1997 ; Nollet et al., 1998). Toutes ces expériences ont montré qu'il est probablement plus facile de manipuler les aliments que de changer un système aussi complexe que le rumen. La conférence Intergouvernementale sur le Changement Climatique a publié un rapport (IPCC, 1996) soulignant qu'il est possible de diminuer significativement la méthanogénèse en améliorant la qualité des aliments du bétail et / ou en changeant le système d'alimentation. Dans ce projet, en se basant sur le fait qu'il a été prouvé *in vitro* dans notre laboratoire (Demeyer et Van Nevel, 1979) et ailleurs (Cone et al., 1999) que les protéines produisent moins de méthane que les hydrates de carbone; nous avons tenté d'augmenter les protéines dans l'herbe par la fertilisation, afin de réduire les émissions de méthane sans polluer ni l'environnement ni les produits destinés à la consommation humaine.

#### **1.2.4. Etudier les effets de la fertilisation et du niveau de fertilisation azotée sur l'efficacité d'utilisation de l'azote par l'animal**

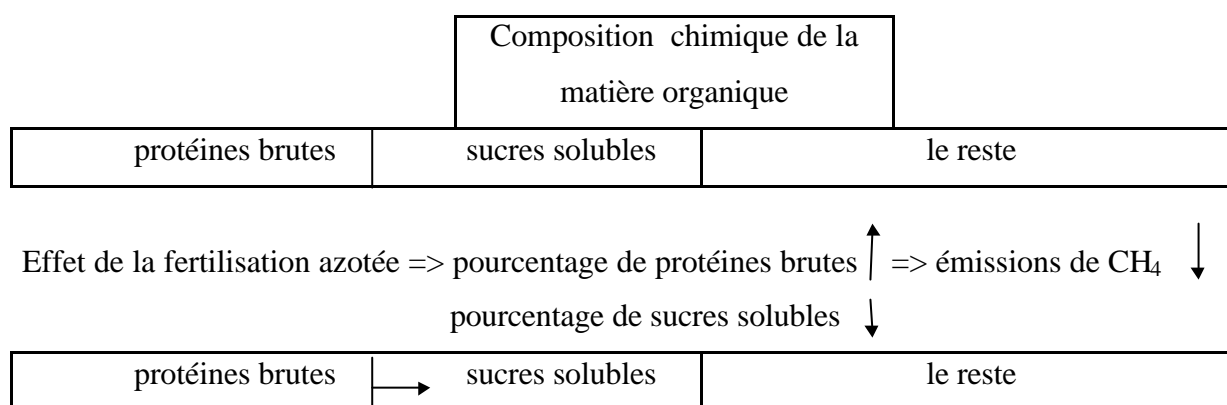
Un niveau de fertilisation azoté élevé, peut induire en plus d'une mauvaise utilisation par la plante, une augmentation de l'azote dans le rumen dont l'excédent sera excrété dans l'environnement, déplaçant ainsi le problème de la pollution de l'air par le méthane à la pollution de l'air par les gaz azotés et de l'eau par les nitrates. Pour ce faire, dans ce projet, l'étude de l'effet de la fertilisation azotée sur les émissions de méthane a été combinée avec celle de l'efficacité d'utilisation de l'azote par les ruminants. Trois niveaux de fertilisation étaient adoptés (150, 200 et 400kgN/ha/an). Pour réduire les rejets d'azote dans l'environnement, avec le niveau élevé de fertilisation (400kg/ha/an), deux systèmes de supplémentation (synchronisé ou non) ont été étudiés afin de dégager celui qui permet une meilleure croissance microbienne et donc une meilleure utilisation de l'azote.

**NB: Ce projet était donc un projet intégré tenant compte simultanément de la production végétale, de la production animale et de la protection de l'environnement. Il aurait fallu utiliser des bovins, mais comme c'est surtout les paramètres de la fermentation ruminale qu'il fallait étudier et pour des raisons pratiques et de coût, le mouton a été choisi comme animal modèle. Pour pouvoir collecter simultanément les urines et le jus du rumen, l'expérience a été faite en cage métabolique tout en simulant les conditions du pâturage par l'utilisation d'une herbe fraîche (1999) ou ayant subi un séchage doux (2000) et par la distribution de la ration en quatre temps.**

#### **1.3. Résultats attendus**

Au cours de la première année (Mars 1999 - Mars 2000), il a été procédé à une mise au point d'une méthode de quantification du méthane produit dans le rumen en utilisant l'éthane comme gaz traceur. En second lieu, les effets d'un niveau de fertilisation modéré (150kg N/ha) sur la composition botanique d'un pâturage composé de ray-grass et de trèfle, la production de MS, l'excrétion de méthane dans l'environnement ainsi que l'efficacité d'utilisation de l'azote ont été étudiées. Les résultats attendus sont une augmentation de la MS produite par ha accompagnée d'une augmentation de la proportion de protéines suite à la fertilisation azotée. **Etant donné que les protéines génèrent moins de méthane que les hydrate de carbones, cette augmentation des protéines dans le fourrage devrait s'accompagner d'une diminution des émissions de méthane (figure I).** Bien plus, il a été

prouvé que l'augmentation des protéines s'accompagne d'une diminution de la concentration des sucres solubles dans l'herbe d'un pâturage fertilisé avec l'azote et ce paramètre est positivement corrélé avec le nombre de protozoaires (Eadie et al., 1970). Comme 25% du méthane produit dans le rumen dépend des protozoaires (Newbold et al. 1995), **une diminution des sucres solubles dans le fourrage devrait s'accompagner de celle du méthane**. Ces paramètres ont été étudiés sur deux "saisons": le début de l'été (Juin-Juillet) et la fin de l'été (Août-Septembre) à l'exception des protozoaires qui ont été étudiés seulement au cours de la première saison.



**Figure I : Effet de la fertilisation azotée sur les émissions de méthane**

La deuxième année (Mars 2000 - Mars 2001) a été consacrée à l'étude des effets de deux niveaux de fertilisation azotée (200 et 400kg N/ha/an) sur la production de matière sèche, la composition chimique d'un pâturage composé de ray-grass, l'excrétion de méthane dans l'environnement (effet attendu: voir figure I) ainsi que l'efficacité d'utilisation de l'azote. Comme plus haut, ces paramètres ont été mesurés au cours de deux "saisons": le début de l'été (Mai-Juin) et la fin de l'été (Août-Septembre). Suite à une méthode de supplémentation inadéquate, un niveau de fertilisation élevé peut entraîner une excrétion plus élevée d'azote sous forme d'urée. Ainsi, avec l'herbe issue du pâturage fertilisé avec 400kgN/ha/an, il a été procédé à l'évaluation de l'effet d'une supplémentation synchronisée sur les émissions de méthane dans l'environnement ainsi que l'efficacité d'utilisation de l'azote. **Avec la supplémentation synchronisée, le résultat attendu est une croissance microbienne plus élevée (Sinclair et al., 1993, 1995 ; Witt et al., 1999) au détriment de la matière organique fermentée et donc des émissions de méthane diminuées (figure II).**



**Matière Organique  
Microbienne (MOM)**

Matière Organique Fermentée (MOF) => acétate, propionate, butyrate, CH <sub>4</sub>	Matière Organique Microbienne (MOM)
---	-------------------------------------

**1. Supplémentation asynchrone** => efficacité de la croissance microbienne ↑ => émissions de méthane ↓

Matière Organique Fermentée (MOF) => acétate, propionate, butyrate, CH <sub>4</sub>	←	Matière Organique Microbienne (MOM)
---	---	-------------------------------------

**2. Supplémentation asynchrone** => efficacité de la croissance microbienne ↓ => émissions de méthane ↑

Matière Organique Fermentée (MOF) => acétate, propionate, butyrate, CH <sub>4</sub>	→	Matière Organique Microbienne (MOM)
---	---	-------------------------------------

**Figure II:** Effet du système de supplémentation sur les émissions de méthane

## **II. Ière année (1999)**

**Effets de la fertilisation azotée sur la composition botanique  
et chimique d'un pâturage, les émissions de méthane et l'efficacité  
d'utilisation de l'azote**

**Pâturage: mixte (ray-grass / trèfle)**

**Niveau de fertilisation: 0 et 150 kg N ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup>**

## 2.1. Méthodologie

### 2.1.1. Expérience préliminaire

\* Objectifs: Des incubations *in vitro* ont été faites avec ou sans éthane ( $C_2H_6$ ), gaz traceur choisi pour mesurer la production de méthane ( $CH_4$ ) dans le rumen. Ces incubations *in vitro* étaient du type batch et visaient trois objectifs: 1/ tester si  $C_2H_6$  n'est pas métabolisé pendant la fermentation ruminale ; 2/ voir si le gaz traceur n'a pas d'effet sur la fermentation ruminale ; 3/ étant donné que lors de l'ingestion, les ruminants avalent de l'oxygène, il était important de voir si l'éthane n'est pas oxydé.

\* Méthodes: Deux incubations *in vitro* de 24 h ont été faites avec des contenus du rumen (CR) collectés sur des moutons sur pâturage naturel puis dilués avec un tampon phosphaté (TP). Pour chaque incubation, 8 flacons étaient utilisés avec différentes concentrations de  $N_2$ , de  $O_2$  et de  $C_2H_6$ :

Traitement 1 (T1): 2 flacons : 10 ml CR + 40 ml TP + 100 %  $N_2$

Traitement 2 (T2): 2 flacons : 10 ml CR + 40 ml TP + 5 ml  $O_2$  + reste  $N_2$

Traitement 3 (T3): 2 flacons : 10 ml CR + 40 ml TP + 10 ml  $C_2H_6$  + 5 ml  $O_2$  + reste  $N_2$

Traitement 4 (T4): 2 flacons : 10 ml CR + 40 ml TP + 10 ml  $C_2H_6$  + reste  $N_2$

Aucun substrat supplémentaire n'a été ajouté.

Les paramètres suivants ont été mesurés :

- La quantité de  $N_2$ , de  $O_2$  et de  $C_2H_6$  ajoutée avant l'incubation.
- La production nette d'AGV = Production d'AGV totaux – les AGV dans les blancs non incubés.
- La concentration de  $CH_4$ ,  $H_2$ ,  $N_2$ ,  $CO_2$ ,  $O_2$  et de  $C_2H_6$
- Des traitements 3 et 4, la production de  $CH_4$  mesurée directement était comparée avec celle calculée en utilisant l'éthane comme gaz traceur. Ces incubations ont été faites au Département de Productions Animales, Université des Gand.

### 2.1.2. Préparation et utilisation du pâturage

Un pâturage mixte de ray grass (*Lolium pérenne*) et de trèfle (*Trifolium repens*) a été utilisé pour étudier les effets de la fertilisation azotée sur la composition botanique, les émissions de méthane et l'efficacité d'utilisation de l'azote. L'expérience a eu lieu à Merelbeke sur un pâturage qui a été mis en défend et non fertilisé depuis deux ans. Avant la fertilisation, il a été procédé à la détermination de l'azote présent dans le sol. Un échantillon de sol a été pris à plusieurs endroits du pâturage entre 0 et 30 cm de profondeur dans un premier temps et entre

30 et 60 cm dans un deuxième temps. Ces échantillons ont été analysés au Département de Phytotechnie et Ecophysiologie par la méthode Kjeldhal (AOAC, 1990). La concentration de l'azote dans le sol avant la fertilisation était en moyenne de 16mg/l, concentration trop faible comparée avec l'optimum de 140mg/l (Gabiëls et al, 1984) d'où la fertilisation azotée était nécessaire. Le pâturage utilisé ayant une superficie de 1640 m<sup>2</sup> a été subdivisé en deux parties: une partie témoin (sans fertilisation azotée) et une autre destinée à être fertilisée avec 150 kgN/ha/an. Etant donné la variabilité inter-animaux quant aux paramètres de la fermentation dans le rumen, nous avons adopté un système en carré latin de telle façon que chaque animal soit comparée avec lui-même, la seule variable étant la composition de l'herbe ingérée (provenant d'un pâturage fertilisé ou non). Pour que ce système soit applicable sur une herbe en croissance continue, chaque saison a été subdivisée en deux périodes et chaque portion du pâturage (portion non fertilisée et portion fertilisée) subdivisée à son tour en deux parcelles. Ainsi, comme le montre la figure III, la portion du pâturage sans azote a été subdivisée en parcelles 1 et 3 et celle à fertiliser en parcelles 2 et 4. Le tableau 1 montre que la coupe des parcelles et la fertilisation (parcelle 2 au cours de la première période et parcelle 4 au cours de la deuxième période) ainsi que la récolte du fourrage se faisaient de telle manière qu'un même mouton recevait (à différentes périodes du carré latin) du fourrage après un même nombre de jours de fertilisation.

<b>1ère période du carré latin (P1)</b>		<b>2ème période du carré latin (P2)</b>	
<b>Parcelle 1</b>		<b>Parcelle 3</b>	
0 kg N / ha / an		0 kg N / ha / an	
moutons C et D	460 m <sup>2</sup>	moutons A et B	406 m <sup>2</sup>
<b>Parcelle 2</b>		<b>Parcelle 4</b>	
150 kg / ha / an		150 kg / ha / an	
moutons A et B	368 m <sup>2</sup>	moutons C et D	406 m <sup>2</sup>

**Figure III:** Programme de fertilisation et subdivision du pâturage en parcelles

### **2.1.3. Animaux et ration**

Pour des raisons pratiques (quantité de fourrage disponible, système de collecte des gaz, facilité de manipulation), le mouton a été choisit comme animal modèle pour les ruminants. Quatre moutons adultes (A, B, C, D) castrés pesant respectivement 66.8, 99.5, 66, 90 kg, porteurs d'une fistule permanente au niveau du rumen ont été utilisés. Pour pouvoir évaluer aussi bien les émissions CH<sub>4</sub> que les rejets d'azote dans l'environnement, les animaux étaient gardés dans des cages métaboliques où ils recevaient *ad libitum* de l'herbe fraîchement coupée du pâturage selon le plan décrit dans le tableau 1.

**Tableau 1: Plan de coupe de l'herbe, fertilisation du pâturage et récolte du fourrage pour expérimentation**

	<b>Parcelles</b>	<b>Traitement</b>	<b>Utilisation du fourrage</b>
<b><u>1ère saison</u></b>			
5 Mai 99	1, 2, 3, 4	coupe	-
12 Mai 99	2	fertilisation (150kg N/ha)	-
26 Mai 99	3, 4	coupe	-
Du 31 Mai au 13 Juin 99	1, 2	récolte	offerte aux moutons adaptation
2 Juin 99	4	fertilisation (150kg N/ha)	-
Du 14 au 25 Juin 99	1, 2	récolte	offerte aux moutons: 1ère période expérimentale
Du 26 Juin au 4 Juillet 99	3, 4	récolte	offerte aux moutons adaptation
Du 5 au 19 Juillet 99	3, 4	récolte	offerte aux moutons: 2ème période expérimentale
<b><u>2ème saison</u></b>			
14 Juillet	1, 2, 3, 4	coupe	-
21 Juillet	2	fertilisation (150kg N/ha)	-
3 Août	3, 4	coupe	-
Du 9 au 22 Août	1, 2	récolte	offerte aux moutons adaptation
11 Août	4	fertilisation (150kg N/ha)	-
Du 23 Août au 3 Septembre	1, 2	récolte	offerte aux moutons: 1ère période expérimentale
Du 4 au 12 Septembre	3, 4	récolte	offerte aux moutons adaptation
Du 13 au 26 Septembre	3, 4	récolte	offerte aux moutons: 2ème période expérimentale

Pour simuler les conditions du pâturage, la ration subdivisée en 4 portions égales (distribuées à 10.00 h du matin, 16.00 h de l'après-midi, 22.00 h du soir et 4.00 h du matin) (figure IV), était donnée à l'état frais. Notons au passage que le plan expérimental décrivant comment les animaux étaient traités avait été préalablement approuvé par le comité d'éthique en matière d'utilisation des animaux à des fins de laboratoire (Université de Gand). A chaque saison, au cours de la première période du carré latin, les moutons A et B recevaient de l'herbe fraîche provenant de la parcelle fertilisée alors que les moutons C et D recevaient l'herbe de la parcelle non fertilisée. Au cours de la deuxième période du carré latin de chaque saison, on procédait à une inversion du traitement des animaux (tableau 2).

#### **2.1.4. Mesure des paramètres du pâturage**

Les paramètres du pâturage ayant fait l'objet de notre étude sont: l'effet de la fertilisation azotée sur la quantité de matière sèche (MS) produite par ha, la composition botanique (proportion de trèfle et de ray-grass dans la MS) ainsi que la composition chimique du fourrage: matière organique, minéraux, protéines brutes (PB), fibres insolubles dans les solvants neutres (NDF), fibres insolubles dans les solvants acides (ADF), les sucres solubles dans l'eau (SS) et la concentration en nitrates. La composition chimique été déterminée selon les méthodes officielles décrites par l'AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (AOAC, 1990). Ces paramètres du pâturage ont été étudiés à partir d'une semaine après la fertilisation. Au début de chaque semaine, des échantillons d'herbe étaient pris à plusieurs endroits du pâturage et au hasard selon la technique des placeaux (20 placeaux environ), puis mélangés pour étudier l'effet de l'azote sur le rapport ray-grass / trèfle et la composition chimique du fourrage. Chaque placeau avait une superficie de 625 cm<sup>2</sup> (25 cm x 25 cm) et l'herbe était coupée à 5 cm du sol, simulant ainsi la hauteur minimale de pâture d'un bovin. Une partie de l'échantillon était utilisée pour déterminer la MS et la composition chimique du mélange alors que l'autre servait à déterminer le pourcentage de trèfle et de ray-grass dans la MS par une séparation entre trèfle et ray-grass. La récolte, la détermination de la composition botanique et chimique du fourrage étaient faites par le Laboratoire de Phytotechnie et Ecophysiologie

### 2.1.5. Evaluation de la quantité de matière sèche ingérée et apparemment digérée et collecte de urines

La quantité de matière sèche donnée aux animaux, celle refusée ainsi que la matière sèche excrétée sous forme de fescès était estimée en soumettant un échantillon de 50g à une température de 70°C pendant 72h. Une partie des fescès étaient collecté était conservée à -18°C afin de déterminer le pourcentage des protéines apparemment digérées. Pour compléter l'étude de l'efficacité d'utilisation de l'azote, concomitamment à la collecte des fescès, des urines ont été collectées pour le dosage de la quantité d'azote excrétée dans les urines ainsi que la croissance microbienne. La quantité d'azote dans les urines et les fescès était déterminée en utilisant la méthode Kjeldhal alors que la croissance microbienne était estimée indirectement par le dosage des dérivés de purine excrétés dans les urines en utilisant le HPLC (LKB-Bromma, 2152 HPLC Controller) (Barcells et al., 1994). Ces paramètres en rapport avec l'ingestion, la digestion apparente, l'excrétion d'azote et la croissance microbienne étaient déterminés au Laboratoire de Production Animale de l'Université de Gand.

**Table 2: Plan expérimental pour chaque saison**

période / mouton	durée (jours)	A	B	C	D
adaptation	14	N150	N150	N0	N0
expérience	14	N150	N150	N0	N0
adaptation	10	N0	N0	N150	N150
expérience	14	N0	N0	N150	N150

N0: pâturage non fertilisé; N150: pâturage fertilisé avec 150kg N / ha / an

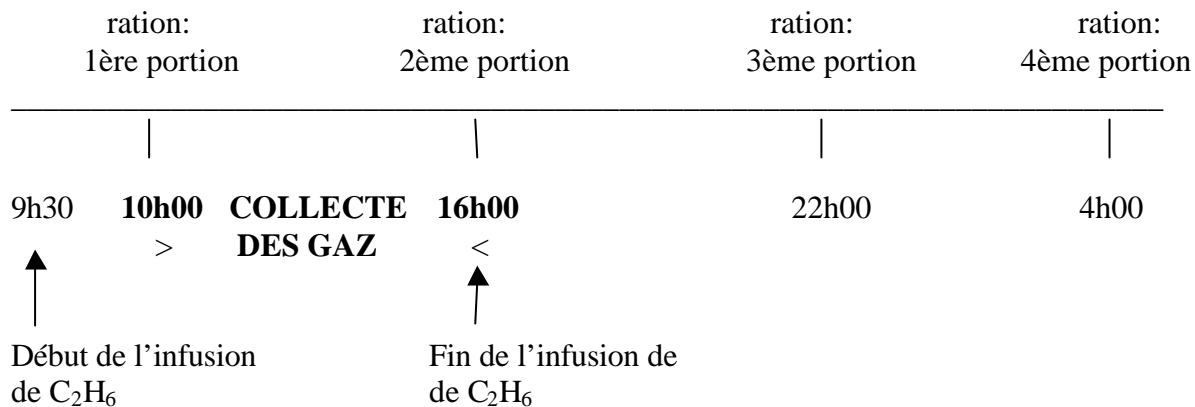
### 2.1.6. Collecte des gaz et évaluation des émissions de méthane

Au cours de chaque saison, les émissions de méthane dans le rumen ont été étudiées pendant deux périodes de deux semaines chacune (P1 et P2) séparées par 10 jours d'adaptation dans un système en carré latin (tableau 2). Au cours de la P1 de chaque saison, les moutons A et B ont été adapté au pâturage fertilisé avec 150kg/ha/an d'azote (N150) alors que les moutons C et D recevaient le pâturage non fertilisé (N0). Pendant la deuxième période, le traitement des moutons a changé, les moutons A et B étaient alimentés avec le pâturage N0 alors que les moutons C et D recevaient le pâturage N150. Pour mesurer la production totale de méthane *in*

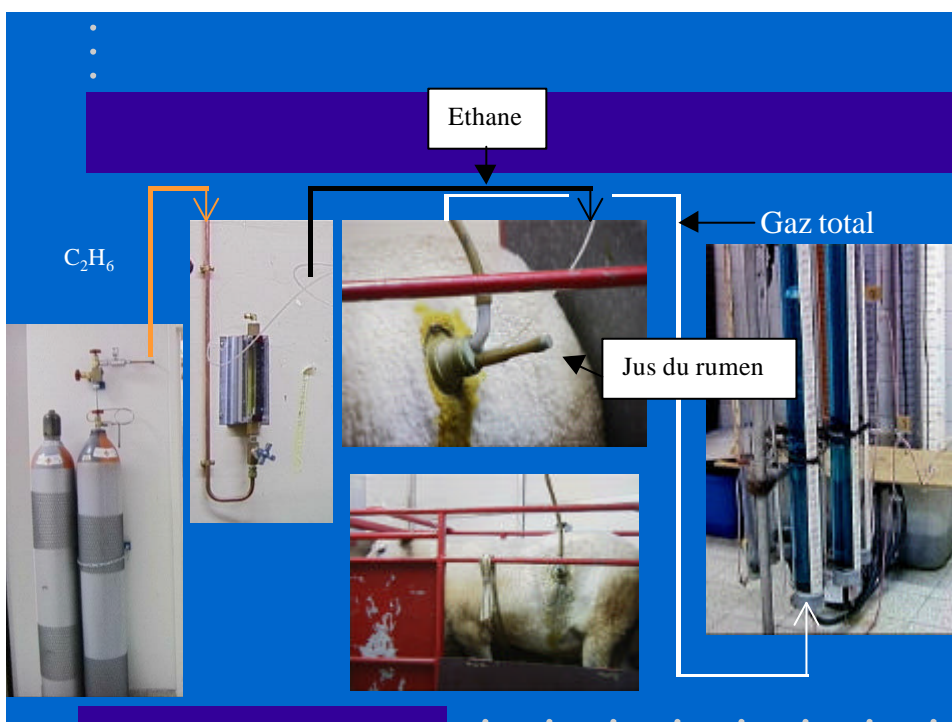


*in vivo*, l'éthane ( $C_2H_6$ ), un gaz qui se comporte comme du  $CH_4$  a été utilisé comme gaz traceur telle que inspiré par les travaux néo-zélandais (Moate et al., 1997). Contrairement à ces derniers qui étudiaient la composition des gaz du rumen à un moment bien précis, au cours de notre expérience, l'éthane était infusé continuellement dans le rumen à l'aide d'un dosimètre de précision (Brooks instruments B.V., G/T 1000, Hollande) à une vitesse de 10ml par minute pendant 6h. Au cours d'une expérience préliminaire menée *in vitro*, il a été mis en évidence que l'éthane n'est ni métabolisée ni oxydée dans le rumen et qu'il n'a pas d'effet sur les paramètres de fermentation ruminale. Le gaz totale expulsé par la fistule était collecté continuellement pendant 6h entre 10.00 h (ration du matin) et 16.00 h (ration de l'après-midi) (figure IV). La collecte se faisait à l'aide d'un dispositif décrit par Van Nevel et al. (1970) modifié par Mbanzamihiho et al. (1995) pour l'adapter à plusieurs moutons. Un tube en Durit recourbé à bords mousses (pour ne pas léser la paroi du rumen) est introduit dans le rumen jusqu'au niveau du sac dorsal. Le tube est relié à des colonnes préalablement graduées remplies de  $H_2SO_4$  (0.1N) (deux par mouton: une en verre (7.5 l) et une autre en PVC (17.5 l)) à l'aide de tubes fins en caoutchouc souple. Les contractions ou l'augmentation de la pression intra-ruminale entraînent l'expulsion du gaz total dans une des colonnes provoquant ainsi l'évacuation de l'acide sulfurique vers un grand bac prévu à cet effet, ce qui permet de lire directement la quantité de gaz total expulsé. La lecture est facilitée par du bleu de méthylène préalablement mélangé avec l'eau acidifiée (pH: 2-3). Entre la canule du rumen bien fermée et les colonnes, se trouve un tube collectant d'éventuels contenus du rumen expulsés en même temps que le gaz. Les pinces installées sur les tubes en caoutchouc permettent de fermer une colonne pleine de gaz et en ouvrir une autre. La colonne remplie de gaz est ensuite reliée à une pompe aspirante à eau qui permet de la vider. Au cours du vidange, un échantillon (1ml) de gaz total est pris à l'aide d'une seringue hermétiquement fermée pour la détermination de la composition du gaz total en  $CH_4$  et  $C_2H_6$  par chromatographie (chromatographe: F&M, Dual Column GC 700). Le dispositif décrit plus haut est illustré par la figure V. La méthode utilisée pour collecter les gaz expulsés par la fistule nous a permis de récolter non pas la totalité, mais seulement une portion du gaz total produit au niveau du rumen. En effet, une partie des gaz de fermentation a été évacuée par éructation et par respiration (Van Nevel et al. 1970) d'où l'intérêt de l'éthane. Etant donné que l' $C_2H_6$  et le  $CH_4$  se comportent de la même façon, ils se trouvent donc dans les mêmes proportions aussi bien dans le gaz collecté que dans le gaz éructé ou expiré. Connaissant le % v/v  $CH_4$  et celui de  $C_2H_6$  dans la quantité collectée ainsi que la quantité totale d'éthane infusée dans le rumen ( $Q C_2H_6$ ), on peut

calculer la quantité totale de CH<sub>4</sub> produite (Q CH<sub>4</sub>) en 6h comme suit:  $Q \text{ CH}_4 \text{ (ml)} = (\% \text{ v/v CH}_4 / \% \text{ v/v C}_2\text{H}_6) * Q \text{ C}_2\text{H}_6 \text{ (ml)}$  représentant 1 / 4 de la quantité produite en 24 h par un mouton ayant ingéré une quantité connue de MS.



**Figure IV:** Plan quotidien de rationnement des animaux, d'infusion d'C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> et de collecte des gaz



**Figure V -** Schéma du dispositif utilisé pour infuser l'éthane et collecter les gaz et le jus du rumen

### **2.1.7. Collecte du jus du rumen et dosage des acides gras volatils et de l'ammoniac**

Pour étudier l'effet de la fertilisation azotée sur les proportions des AGV et l'utilisation des protéines, nous avons dosé les AGV et l'ammoniac dans le jus du rumen. Grâce à un tube en Durit traversant le bouchon du rumen, le système de collecte des gaz permettait de prendre concomitamment des échantillons de jus du rumen à 10.00 h (avant l'ingestion de la ration du matin) à 12.00 h (3 h après) et à 16.00 h (6 h après). Un échantillon de 50 ml de jus du rumen était récolté, le pH directement mesuré puis acidifié (2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10N), centrifugé (12000 x g pendant 15 minutes) avec une centrifugeuse (MSE, Amsterdam, Hollande). Les échantillons filtrés étaient conservés à 4°C avant le dosage des AGV (chromatographie) et de l'NH<sub>3</sub> à l'aide d'un électrode du type Ammonia - selective gas electrode (Metrohm Ltd CH - 9101, Herisan, Switzerland).

### **2.1.8. Dégradabilité *in sacco* (MS, protéines brutes)**

Pour mettre en relation la production de méthane avec la dégradabilité de la MS, et pour évaluer la dégradabilité des protéines dans le rumen, des incubations *in sacco* en utilisant de l'herbe lyophilisée issues de deux pâturages étaient faites. Du fourrage frais récolté sur les deux pâturages (fertilisés et non fertilisés) était coupé et amené immédiatement au laboratoire. Chaque échantillon était bien mélangé, coupé puis congelé pendant 24 (-18°C) avant d'être lyophilisé. Les échantillons étaient moulus dans un moulin à marteau de type Brabander sur tamis d'1mm puis stockés dans des sacs en plastique avant leur utilisation. Des sachets en polyamide (Solana, Edegem, Belgium) ayant 14 cm de longueur, 5 cm de largeur et des pores de 37µm de diamètre ont été utilisés. Neuf sachets contenant chacun 2 g d'herbe (pâturage fertilisé et non fertilisé) ont été introduits dans le rumen de chaque mouton à 10.00 h (avant l'ingestion du repas du matin) pour être retirés successivement 3h, 6h, 9h, 12h, 23h, 48h et 72h après, les deux sachets restant servant de réserve. Après le retrait des sachets du rumen, ceux-ci étaient rincés à la main, lavés deux fois à la machine pendant 15 minutes (Miniwash, Liège, Belgium) puis séchés à 65°C pendant 48h et les résidus analysés pour en déduire finalement le pourcentage de matière sèche (MS) et de protéines dégradées dans le rumen. Un sachet était non incubé mais lavé comme les autres pour déterminer la MS et les protéines solubles ou rapidement dégradées. Les résultats de la dégradation de la MS et des protéines étaient introduits dans le modèle proposé par Orkov et McDonald (1979):  $D(t) = a + b(1 - e^{-ct})$  où D: dégradabilité au temps t, a: la fraction soluble considérée comme rapidement dégradable, b: fraction non soluble mais potentiellement dégradable, c: vitesse de dégradation de b.

### **2.1.9. Incubations *in vitro***

Etant donné la multitude de phénomènes qui se passent *in vivo* (ex: absorption des AGV, recyclage de l'azote, sécrétion de l'azote endogène), pour confirmer les résultats observés *in vivo*, nous avons procédé à deux incubations *in vitro* par semaine expérimentale. Un échantillon 500mg d'herbe lyophilisée et moulue (1mm) provenant des deux types de pâturages (fertilisé et non fertilisé) a été incubé (39°C) sous une atmosphère de CO<sub>2</sub> (pureté: 99.99%) en double dans du contenu du rumen (10 ml) récolté sur chaque mouton avant le repas du matin et mélangé avec 40ml de tampon phosphate. Une autre incubation était faite sans substrat. Après 24h, l'incubation a été stoppée avec 2% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10N et un échantillon (2ml) de gaz a été pris sur chaque flacon pour déterminer la production de méthane alors que le jus était conservé pour le dosage des AGV. La production nette de méthane et des AGV était calculée en faisant la différence entre les produits de l'incubation avec et sans substrat. Pour vérifier si les incubations ont été bien conduites et qu'il n'y a pas de substance réduite qui n'aurait pas été analysée, les bilans d'hydrogène métabolique des différentes incubations ont été calculés à l'aide des équations stoechiométriques établies par Demeyer (1991): Bilan 2H métabolique (2Hr) = 2H utilisé x 100 / 2H produit où 2H produit = 2A + P + 4B et 2H utilisé = 2P + 2B + 4CH<sub>4</sub>.

### **2.1.10. Vitesse de passage**

Afin de pouvoir calculer la dégradabilité effective de l'herbe ingérée, la vitesse de passage des particules du rumen était déterminée à l'aide du Chrome comme marqueur selon la méthode décrite par Uden et al. (1980). Du foin mordancé au chrome (12-14 % de chrome dans le foin) (40g foin mordancé / mouton) était introduit dans le rumen à 10.00 h et un échantillon de 50g du contenu du rumen était pris successivement après 3h, 6h, 9h, 12h, 24h, 36h, 48h and 72h pour suivre le taux de passage des particules du rumen. En combinant la dégradabilité *in sacco* et le taux de passage des particules du rumen (k), la dégradabilité effective (DE) de la MS et des protéines dans le rumen était calculée comme suit:  $DE = a + b \cdot c / (c + k)$  (Orkov et MacDonald (1979).

### **2.1.11. Comptage des protozoaires**

Les protozoaires jouent un rôle important dans la production de méthane. En effet, il a été établi par plusieurs auteurs (Whitelaw et al., 1984 ; Hegarty et al., 1991 ; Newbold et al., 1995) que la production de méthane est largement dépendante de la symbiose des méthanogènes avec les protozoaires. Pour ce faire, pendant la première saison expérimentale,

des contenus du rumen étaient récoltés avant le repas du matin et 3h après, 10ml fixés avec 10ml d'une solution fixatrice (50% glycérol + 48% d'eau déminéralisée + 2% formalhehyde) et le tout était conservé à 3°C pour la détermination de la concentration des protozoaires dans le rumen ainsi que la proportion de certaines familles de protozoaires. Avant le comptage, un échantillon de 10ml du mélange étaient 10 fois dilué avec la solution fixatrice puis 0.55ml du diluât introduit dans la chambre de comptage du type Hawksley (England). Après 10 minutes de stabilisation, le comptage des protozoaires était faite sous microscope avec le grossissement 125 dans 30 champs représentant 1/293<sup>ème</sup> de toute la chambre de comptage qui a un volume de 0.55ml. Un tenant compte du taux de dilution et du nombre de champs comptés, la concentration des protozoaires (P) était calculée comme suit:  $P = X * 200 * 293 / 0.55$  (X: nombre de protozoaires dans les 30 champs). L'identification des genres de protozoaires (*Entodinium*, *Isotrichidae*, *Diplodinium* et *Epidinium*) était faite selon une clé d'identification publiée par Ogimoto et Soichi (1981).

#### **2.1.12. Analyses statistiques**

Les effets de la fertilisation azotée sur les paramètres étudiés ont été évalués en utilisant la procédure GLM et le test de Duncan en mettant tous les animaux ensemble. En second lieu, le test "one-way ANOVA" était utilisé pour évaluer l'effet animal et saison indépendamment du traitement subit par les animaux. Tous ces tests étaient faites avec le programme statistique SPSS. Les résultats sont sous forme de moyennes  $\pm$  écart type et la différence significative était déclarée à  $P < 0.05$ . Pour les protozoaires, le nombre total des protozoaires était transformé en logarithme naturel et l'effet azote et animal était testé comme décrit plus haut. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  écart-type des valeurs non transformées.

### **2.2. Résultats**

#### **2.2.1. Expérience préliminaire**

Les résultats présentés montrent que l'éthane n'est ni métabolisé dans le rumen ni oxydé. En effet comme le montre les tableaux 3 et 4, le recouvrement de ce gaz est bon avec ou sans oxygène et ce gaz traceur n'a pas d'effet sur la production de méthane.

**Table 3: Composition des gaz avant et après l'incubation *in vitro* (moyenne (et)) (n=4)**

Traitement*	Avant l'incubation ( $\mu$ mole / flacon)			Après l'incubation ( $\mu$ mole / flacon)					
	O <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>	N <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>	N <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	H <sub>2</sub>
T1	0 (0)	0 (0)	6221 (394)	5.1 (7.8)	0 (0)	5129 (1218)	672 (63)	476 (35)	1.8 (0.4)
T2	217 (15)	0 (0)	6468 (800)	2.0 (2.3)	0 (0)	6343 (491)	950 (203)	379 (43)	1.4 (0.2)
T3	224 (33)	447 (65)	7378 (1442)	5.8 (5.1)	462 (37)	7329 (1268)	882 (155)	364 (23)	1.7 (0.5)
T4	21 (21)	428 (68)	6029 (598)	19 (26)	399 (77)	5477 (1101)	831 (37)	426 (34)	1.4 (0.1)

\*:T1, T2, T3, T4: incubations *in vitro* faites respectivement sous N<sub>2</sub> ; N<sub>2</sub> + 5 ml O<sub>2</sub> ; N<sub>2</sub> + 5 ml O<sub>2</sub> + 10 ml C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> et N<sub>2</sub> + 10 ml C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> ; et: écart type.

**Table 4: Recouvrement de l'éthane et son effet sur la production des gaz *in vitro* (moyenne (et)) (n=4)**

Traitement*	avant incubation	après incubation	CO <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	H <sub>2</sub>
	$\mu$ moles C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> / mmole N <sub>2</sub>				
T1	0 (0)	0 (0)	672 (63)	476 (35)	1.8 (0.4)
T2	0 (0)	0 (0)	950 (203)	379 (43)	1.4 (0.2)
T3	61 (7)	64 (7)	882 (155)	364 (23)	1.7 (0.5)
T4	72 (12)	74 (12)	831 (37)	426 (34)	1.4 (0.1)

\*: T1, T2, T3, T4: incubations *in vitro* faites respectivement sous N<sub>2</sub> ; N<sub>2</sub> + 5 ml O<sub>2</sub> ; N<sub>2</sub> + 5 ml O<sub>2</sub> + 10 ml C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> et N<sub>2</sub> + 10 ml C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> ; et: écart type.

Comme le montre le tableau 5, la quantité de méthane mesurée est égale à la quantité calculée à l'aide de l'éthane infusé montrant ainsi que l'éthane est un bon gaz traceur.

**Table 5: Comparaison entre le CH<sub>4</sub> mesuré et le CH<sub>4</sub> calculée en utilisant C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> infusé (moyenne (et)) (n=4)**

Traitement <sup>*</sup>	CH <sub>4</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> infusé	CH <sub>4</sub> <sup>**</sup> calculé	CH <sub>4</sub> mesuré
	(%)			μmoles/flacon	
T3	4.1 (0.4)	5.2 (0.5)	447 (65)	350 (44)	364 (23)
T4	6.1 (1.0)	5.6 (0.8)	428 (68)	466 (92)	427 (34)

\*: T3, T4: Incubations *in vitro* faites sous N<sub>2</sub> + 5 ml O<sub>2</sub> + 10 ml C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> et N<sub>2</sub> + 10 ml C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> respectivement ; \*\*: CH<sub>4</sub> produit = (%CH<sub>4</sub> après incubation x C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> infusé avant l'incubation) / (% C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> après l'incubation) ; et: écart type.

L'éthane n'a pas d'effet ni sur la production d'AGV totaux et donc sur la quantité de substrat fermentée ni sur les proportions d'AGV (tableau 6).

**Table 6: L'effet de l'éthane sur les fermentations *in vitro* des contenus du rumen (moyenne (et)) (n=4)**

Traitement <sup>*</sup>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	AGV totaux	CH <sub>4</sub>	H <sub>2</sub>	2Hr
	production nette						
	μmoles / flacon						(%)
T1	871 (80)	309 (36)	201 (6)	1384 (118)	476 (35)	1.2 (0.4)	103 (3)
T2	919 (90)	281 (37)	203 (8)	1403 (134)	380 (43)	1.4 (0.1)	85 (2)
T3	939 (79)	287 (10)	178 (17)	1404 (106)	364 (23)	1.7 (0.5)	83 (2)
T4	833 (80)	308 (17)	168 (21)	1308 (115)	427 (34)	1.4 (0.1)	101 (1)

C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>: acétate, propionate, butyrate ; \*: T1, T2, T3, T4: : incubations *in vitro* faites respectivement sous N<sub>2</sub> ; N<sub>2</sub> + 5 ml O<sub>2</sub> ; N<sub>2</sub> + 5 ml O<sub>2</sub> + 10 ml C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> et N<sub>2</sub> + 10 ml C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> ; et: écart type ; -: non mesuré.

Les résultats ci-haut confirment globalement que l'éthane n'est pas métabolisé dans le rumen, n'est pas oxydé, n'influence pas la fermentation ruminale et qu'il peut donc être utilisé comme gaz traceur. Les quelques variations observées ici et là traduisent de petites imprécisions lors des différents dosages.

### **2.2.2 Effet de la saison et de la fertilisation azotée sur la production de matière sèche, la composition botanique et chimique du fourrage**

Comparé avec le contrôle (N0), la fertilisation azotée (N150) a augmenté la quantité de MS produite par ha ainsi que la proportion de ray grass au dépend du trèfle et ces effets sont dépendants de la saison (tableau 7). Ainsi, en moyenne, au début de l'été (Juin - Juillet: saison 1), la fertilisation avec 150kgN/ha/an a augmenté de 29% la production de MS par ha et réduit la proportion de trèfle de 35 à 16% de la MS totale. A la fin de l'été (Août - Septembre: saison 2) la production de MS a augmenté de 46% et la proportion de trèfle est passée de 51% à 40% de la MS. L'effet de la saison sur la production de la biomasse était plus important que l'effet de la fertilisation étant donné qu'en moyenne, la MS produite par ha a plus que doublé au cours de la première saison en comparaison avec la deuxième saison indépendamment du traitement.

L'effet positif de la fertilisation azotée sur la production de la biomasse dans un pâturage mixte fertilisé avec un niveau d'azote relativement faible est bien documenté (Reid 1970 ; Frame et Newbould 1986 ; Barthram et al., 1992) montrant que l'azote reste un facteur limitant pour la fixation du carbone même en cas de mélange: graminées - légumineuses. L'effet de la saison sur la production de MS observé dans cette expérience avait été précédemment rapportée par Salaun et al. (1999) et est lié aux conditions climatiques comme: la température, l'eau, le nombre de jours et la durée de l'ensoleillement. L'augmentation de l'accumulation du ray grass au dépend du trèfle quand l'azote est ajouté est aussi bien connue (Schils, 1997 ; Höglind, 1998 ; Kessler et Jolidon, 1998). La diminution du trèfle est provoquée principalement par l'effet compétitif du ray grass pérenne pour l'utilisation de l'azote et Schils (1997) a souligné que cet effet pourrait être atténué par une augmentation de la fréquence de coupe. L'effet négatif du fertilisant azoté sur le trèfle était plus forte au cours de première qu'au cours de la deuxième saison. Cela est due à l'effet additionnel de l'ombrage exercé par le ray grass sur le trèfle au début de l'été (Schwank et al., 1986 ; Barthram et al., 1992), étant donné qu'il y'avait plus de ray grass au cours de la première qu'au cours de la deuxième saison.



**Table 7: Effet de la fertilisation sur la production de matière sèche ainsi que la composition botanique et chimique du pâturage (moyenne (et)) (n=4)**

paramètre / traitement	saison 1		saison 2		effet saison
	N0	N150	N0	N150	
production de MS (kg ha <sup>-1</sup> )	4607 (1666)	5930 (1323)	1646 <sup>a</sup> (64)	2397 <sup>b</sup> (482)	***
proportion de trèfle (% MS)	35.0 <sup>a</sup> (3.3)	15.9 <sup>b</sup> (2.4)	51.4 <sup>a</sup> (1.7)	39.4 <sup>b</sup> (10.1)	***
PB (% MS)	12.2 (1.4)	13.8 (2.1)	21.9 (1.9)	23.2 (2.3)	***
protéines (kg ha <sup>-1</sup> )	550 <sup>a</sup> (148)	804 <sup>b</sup> (116)	360 <sup>a</sup> (37)	551 <sup>b</sup> (98)	***
NDF (% MS)	49.5 (6.5)	49.4 (7.7)	58.7 (2.7)	60.8 (1.5)	**
SS (% MS)	13.4 (3.3)	14.1 (4.3)	5.0 (0.8)	4.9 (1.2)	***
GB (% DM)	4.0 (0.4)	4.6 (1.2)	-	-	-
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (ppm)	55 <sup>a</sup> (28)	250 <sup>b</sup> (210)	1402 <sup>a</sup> (1136)	3475 <sup>b</sup> (1486)	***

N0: pâturage non fertilisé; N150: pâturage fertilisé avec 150kg N ha<sup>-1</sup>an<sup>-1</sup>; MS: matière sèche; PB: protéines brutes; NDF: neutral détergent fibre; SS: sucres solubles; GB: graisses brutes; a, b: les valeurs moyennes porteuse d'une lettre différente dans la même ligne et au cours d'une même saison sont significativement différentes (p<0.05); -: non déterminé; \*\* et \*\*\*: effet significatif avec p<0.01 et p<0.001.

Lors de l'étude de l'effet de la fertilisation azotée sur la composition chimique du fourrage, notre attention a été portée principalement sur les composantes du fourrage pouvant avoir une influence directe ou indirecte sur la production de méthane: les protéines brutes (PB), les fibres (NDF), les graisses brutes (GB) et les sucres solubles (SS). Comme le montre le tableau 3, la fertilisation azotée n'a pas changé significativement le taux de protéines brutes dans la MS. Au contraire, une fois de plus, l'effet de la saison était plus important que celui de l'azote étant donné que le pourcentage des PB était clairement plus élevé au cours de la deuxième

(23%) que la première saison (13%). Une augmentation du pourcentage de PB suite à la fertilisation azotée était attendue. Au cours de cette expérience, l'absence d'une augmentation du pourcentage des PB quand l'azote est incorporé dans le sol pourrait être expliquée par la diminution du trèfle, plante connue pour contenir beaucoup plus de protéines que le ray grass à un même stade de croissance. Bien plus, l'effet de la dilution des protéines dans de la MS augmentée suite à la fertilisation azotée n'est pas négligeable. Ainsi, une augmentation de la production totale des protéines brutes par ha suite à la fertilisation a été observée au cours des deux saisons (tableau 7). Même si un plus grand pourcentage de PB était observé au cours la deuxième qu'au cours de la première saison, l'inverse était observé quant à la production totale de PB. Ces résultats confirment que les engrais azotés sont plus efficacement utilisés pour la production de MS et de protéines au début qu'à la fin de l'été. En rapport avec la nutrition des ruminants, il a été rapporté que les protéines du trèfle comparées à celles des herbes sont moins ou aussi bien protégées contre la dégradation dans le rumen mais leur absorption au niveau de l'intestin grêle est plus élevée (Peyraud, 1993 ; Steg et al., 1994). Comme le montre le tableau 7, il n'y a aucun effet clair du fertilisant azoté sur le pourcentage de fibres (NDF), seul l'effet saison a été observé, la deuxième saison montrant un plus grand pourcentage de NDF que la première (56 vs 44%). La fertilisation azotée a augmenté l'accumulation des nitrates dans la MS. Néanmoins, cette dose est en deçà de 15000 ppm, dose au dessus de laquelle les animaux alimentés en cage avec de l'herbe fraîche *ad libitum* peuvent être intoxiqués (Geurink et al., 1982). La fertilisation n'a eu aucun effet sur les SS, seul un effet saison très fort ( $P < 0.001$ ) a été observé. Ainsi contrairement au pourcentage des PB, au cours de la deuxième saison, l'herbe était plus riche en SS qu'au cours de la première saison. En moyenne, le pourcentage des graisses brutes (GB) est toujours faible (c.a 4.5%) indépendamment du traitement, de la période et de la saison.

### **2.2.3. Evaluation de la méthode de mesure des émissions de méthane**

Au cours d'une expérience préliminaire *in vitro*, il a été démontré que l'éthane n'est ni métabolisé ni oxydé et n'a pas d'effet négatif sur les paramètres de la fermentation ruminale et qu'il peut donc être utilisé comme gaz traceur. Les résultats des expériences *in vivo* rapportés dans le tableau 8 montrent qu'en moyenne la production de méthane mesurée au cours de cette expérience en utilisant l'éthane comme gaz traceur est dans la limite des valeurs rapportées par MacCaughey et al., (1999) utilisant le SF<sub>6</sub>. En acceptant comme le suggère Murray et al., (1976) que 15% du méthane total est produit dans le gros intestin, nos résultats obtenus *in vivo* sont comparables avec ceux obtenus en utilisant une chambre respiratoire

(Shibata et al., 1993) ou avec la méthode micrométéorologique (Judd et al., 1999).

**Tableau 8: Comparaison de nos résultats avec ceux obtenus avec d'autres méthodes**

Source	animal	méthode	CH <sub>4</sub>	ration
<b>Nos résultats</b>	<b>mouton</b>	<b>C<sub>2</sub>H<sub>6</sub></b>	<b>25.8 l (5.0) / kg MSI</b>	<b>ray-grass / trèfle blanc</b>
<b>McCaughey et al. 1997</b>	bouvillon	SF <sub>6</sub>	32.7 l / kg MSI	alfalfa / herbe
<b>Shibata et al., 1993</b>	mouton & chèvre	chambre respiratoire	26.7 l / kg MSI	fouillage / concentré
	bovin, mouton & chèvre	équation de régression	24.2 l / kg MSI	fouillage / concentré
<b>Judd et al., 1999</b>	mouton	micro- météolo- gique	16.0 l (5.9) / kg MSI	ray-grass / trèfle blanc

MSI: Matière sèche ingérée

#### 2.2.4. L'effet de la fertilisation azotée sur les émissions de méthane et le profil fermentaire dans le rumen

Même si le système en carré latin utilisé n'a pas pu empêcher l'interaction des effets de la fertilisation azotée et de la saison sur la composition botanique et chimique du fourrage, nos résultats n'ont montré aucun effet significatif de la fertilisation azotée sur les émissions de méthane et aucun effet clair sur le profil fermentaire dans le rumen n'a été décelé (tableau 9). L'absence de l'effet de la fertilisation azotée sur la méthanogénèse est confirmée par les résultats *in vitro* (tableau 10). Bien plus, aucune différence entre les deux saisons n'a été observée quant à la production de méthane malgré une différence claire dans le pourcentage de PB (13 vs 23% pour la première et la deuxième saison respectivement). Ces résultats ne sont pas en accord avec l'hypothèse qu'une augmentation du pourcentage des PB dans l'herbe par la fertilisation devrait se traduire par une diminution de la méthanogénèse (Demeyer et Van Nevel, 1979; Cone et Van Ghelder, 1999). L'absence d'effet des protéines brutes sur la production de méthane est probablement due à la différence dans la nature de l'azote présent dans l'herbe mais aussi aux interactions avec les effets de la composition botanique et

chimique du fourrage. En effet, la diminution de la méthanogénèse induite par un pourcentage élevé de PB au cours de la deuxième saison pourrait avoir été compensée par une augmentation de la production de méthane consécutive à une augmentation du pourcentage des fibres (NDF) observée au cours de la même saison (tableau 7).

**Table 9: Effet de la fertilisation azotée sur les émissions de méthane *in vivo*, le pH, la concentration et les proportions des AGV ( moyenne (et)) (n=16)**

traitement	MSI	CH <sub>4</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	iAGV	AGVt	pH
	(g jour <sup>-1</sup> )	(lkg <sup>-1</sup> MSI)	%				mmoles l <sup>-1</sup>	
saison 1								
N0	1114 (171)	25.2 (1.7)	67.8 (0.6)	19.1 <sup>a</sup> (0.4)	11.3 (0.4)	2.1 (0.7)	104.8 (3.4)	6.21 (0.07)
N150	1082 (133)	24.5 (2.4)	66.4 (0.6)	20.2 <sup>b</sup> (0.4)	11.3 (0.3)	2.6 (0.9)	102.8 (3.4)	6.44 (0.07)
saison 2								
N0	1062 (193)	27.3 (1.6)	67.3 (0.5)	17.2 (0.3)	12.0 <sup>a</sup> (0.3)	4.0 (0.4)	114.4 (4.1)	6.35 (0.06)
N150	1063 (111)	26.5 (2.2)	66.4 (0.4)	18.6 (0.4)	11.7 <sup>b</sup> (0.2)	3.5 (1.1)	111.0 (5.3)	6.48 (0.07)

MSI: matière sèche ingérée; C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>: acétate, propionate, butyrate; iAGV: iso-acides gras volatiles; AGVt : acides gras volatiles totaux; N0: pâturage non fertilisé; N150: pâturage fertilisé avec 150kg Nha<sup>-1</sup>an<sup>-1</sup>; a, b: les valeurs moyennes avec des lettres différentes dans la même colonne diffèrent significativement (p<0.05)

**Table 10: Effet de la fertilisation azotée sur la production de méthane *in vitro*, la concentration et les proportions des AGV (moyenne (et)) (n=4)**

Traitement	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	iAGV	CH <sub>4</sub>	AGVt	2Hr
	mmoles mole <sup>-1</sup> AGVt					μmoles flacon <sup>-1</sup>	(%)
saison 1							
N0	568 (53)	268 (57)	120 <sup>a</sup> (14)	22 <sup>a</sup> (7)	197 (39)	2457 (265)	84 (7)
N150	588 (40)	258 (41)	108 <sup>b</sup> (15)	17 <sup>b</sup> (7)	200 (52)	2470 (360)	84 (10)
saison 2							
N0	601 (42)	217 (22)	97 (13)	27 (3)	196 (30)	2389 (121)	80 (5)
N150	613 (24)	217 (26)	97 (15)	26 (4)	194 (35)	2397 (79)	79 (5)

C<sub>2</sub> , C<sub>3</sub> , C<sub>4</sub>: acétate, propionate, butyrate; iAGV: iso-acides gras volatiles; AGVt: acides gras volatiles totaux; 2Hr: bilan d'hydrogène métabolique=[(2P+2B+4CH<sub>4</sub> / 2A+P+4B)\*100] (Demeure, 1991); N0: pâturage non fertilisé; N150: pâturage fertilisé avec 150kg Nha<sup>-1</sup>an-1; a, b: les valeurs moyennes avec des lettres différentes dans la même colonne diffèrent significativement (p<0.05).

### 2.2.5. Effet animal sur la production de méthane *in vivo* et les autres paramètres de la digestion ruminale

A la place de l'effet azote sur les émissions de méthane, un effet animal significatif (P<0.05) a été observé, un animal a produit en moyenne moins de méthane (20.3±3.1 l / kg MSI que les trois autres (27.6±4.1 l / kg MSI, n=48) (calculs issus du tableau 11). La variabilité inter-animal pour les émissions de méthane a été rapportée depuis trois décennies auparavant par Blaxter et Clapperton (1965) et plus récemment par Ulyatt et al. (1999). La faible production de méthane par kg de matière organique ingérée observée chez le mouton A était accompagnée d'un pH du jus du rumen faible et d'une plus grande concentration en AGV totaux. Une variation individuelle dans la dégradation de la MS liée à un faible pH avait déjà été observée par De Smet et Demeyer (1992) et on pourrait penser que la faible production de

méthane observée chez le mouton A est seulement liée à cette faible dégradabilité de la MS. Néanmoins, la production de méthane *in vivo* calculée par kg de MS effectivement dégradée montre un effet animal persistant (tableau 11) confirmant ainsi l'effet dépressif du pH sur la méthanogénèse comme récemment rapporté par Lana et al. (1998). Lassey et al. (1997) et Judd et al. (1999) ont émis l'hypothèse que l'effet interindividuel était d'origine génétique et Martin et al. (2000) ont suspecté la entre animaux quant aux communautés microbiennes du rumen. Dans tous les cas, l'effet animal tend à être persistant dans les incubations *in vitro* (tableau 12) montrant que ces différences dans la production de méthane pourraient traduire effectivement une différence des communautés microbiennes présentes dans le rumen des différents moutons.

**Table 11:** Effet animal sur les émissions de méthane *in vivo*, la digestion et les paramètres de fermentation ruminale (moyenne (et))

moutons	A	B	C	D
MSI (g jour <sup>-1</sup> )	1021 <sup>a</sup> (172)	1073 <sup>ab</sup> (161)	1057 <sup>a</sup> (118)	1171 <sup>b</sup> (126)
CH <sub>4</sub> (1 kg <sup>-1</sup> MSI)	20.3 <sup>a</sup> (3.1)	26.8 <sup>b</sup> (4.6)	27.7 <sup>b</sup> (3.8)	28.3 <sup>b</sup> (3.8)
V (%MS)	4.2 <sup>a</sup> (1.2)	8.5 <sup>b</sup> (3.1)	6.9 <sup>bc</sup> (2.0)	6.3 <sup>c</sup> (1.5)
DP (%MS)	87.5 (3.5)	88.2 (3.1)	86.7 (3.5)	86.4 (3.3)
k (%/h)	4.6 <sup>ab</sup> (1.1)	5.2 <sup>a</sup> (1.0)	4.6 <sup>ab</sup> (0.5)	3.4 <sup>b</sup> (0.6)
DE (%)	61.7 <sup>a</sup> (5.0)	66.9 <sup>ab</sup> (5.6)	68.7 <sup>b</sup> (5.7)	69.6 <sup>b</sup> (5.5)
CH <sub>4</sub> (1 kg <sup>-1</sup> MSD)	33.0 <sup>a</sup> (5.3)	40.7 <sup>b</sup> (8.1)	40.4 <sup>b</sup> (6.6)	41.0 <sup>b</sup> (7.2)
DTA (%MS)	76.2 <sup>a</sup> (6.2)	79.1 <sup>a</sup> (4.3)	71.8 <sup>b</sup> (3.8)	75.9 <sup>a</sup> (5.7)
C <sub>2</sub> (%)	68.0 <sup>a</sup> (2.8)	68.7 <sup>a</sup> (2.5)	63.2 <sup>b</sup> (2.0)	68.3 <sup>a</sup> (1.6)
C <sub>3</sub> (%)	20.0 <sup>a</sup> (2.2)	17.6 <sup>b</sup> (1.5)	20.7 <sup>a</sup> (2.3)	17.2 <sup>b</sup> (1.3)
C <sub>4</sub> (%)	9.5 <sup>a</sup> (1.5)	9.6 <sup>a</sup> (1.5)	11.6 <sup>b</sup> (1.5)	12.2 <sup>c</sup> (0.8)
iAGV (%)	2.0 <sup>a</sup> (1.1)	3.7 <sup>b</sup> (0.9)	3.4 <sup>b</sup> (0.8)	3.1 <sup>b</sup> (0.9)
AGVt (μmoles/100ml)	135.5 <sup>a</sup> (15.5)	86.8 <sup>b</sup> (13.9)	106.8 <sup>c</sup> (19.6)	102.2 <sup>c</sup> (15.0)
pH	5.92 <sup>a</sup> (0.25)	6.66 <sup>b</sup> (0.19)	6.49 <sup>c</sup> (0.28)	6.41 <sup>c</sup> (0.27)

MSI: matière sèche ingérée; MSD: matière sèche dégradée; DTA: digestibilité totale apparente; V: vitesse de dégradation; DP: dégradabilité ruminale potentielle; DE: dégradabilité ruminale effective; C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>: acétate, propionate, butyrate; iAGV: iso-acides gras volatiles; AGVt: acides gras volatiles totaux; a, b, c: les valeurs moyennes avec des lettres différentes dans la même colonne diffèrent significativement (p<0.05).

**Tableau 12: Effet animal sur la production de méthane *in vitro* et les paramètres de la fermentation dans le rumen (moyenne (et)) (n=8)**

moutons	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	iAGV	CH <sub>4</sub>	AGVt	2Hr.
	mmoles mole <sup>-1</sup> AGVt					mmoles flacon <sup>-1</sup>	(%)
A	558 <sup>a</sup>	272 <sup>a</sup>	104	24	175 <sup>a</sup>	2375	82
	(48)	(54)	(14)	(6)	(42)	(191)	(10)
B	615 <sup>b</sup>	227 <sup>b</sup>	108	22	209 <sup>b</sup>	2515	81
	(31)	(33)	(23)	(7)	(36)	(293)	(7)
C	571 <sup>a</sup>	257 <sup>a</sup>	103	24	180 <sup>a</sup>	2411	81
	(29)	(37)	(16)	(7)	(33)	(208)	(8)
D	628 <sup>b</sup>	206 <sup>b</sup>	106	23	223 <sup>b</sup>	2413	82
	(12)	(14)	(14)	(7)	(23)	(221)	(4)

C<sub>2</sub> , C<sub>3</sub> , C<sub>4</sub>: acétate, propionate, butyrate; iAGV: iso-acides gras volatiles; AGVt: acides gras volatiles totaux; 2Hr: bilan d'hydrogènes métabolique=[(2P+2B+4CH<sub>4</sub> / 2A+P+4B)\*100] (Demeyer, 1991) ; N0: pâturage non fertilisé; N150: pâturage fertilisé avec 150kg Nha<sup>-1</sup>an-1; a, b: les valeurs moyennes avec des lettres différentes dans la même colonne diffèrent significativement (p<0.05).

D'après la stoechiométrie (Wolin 1960; Demeyer 1991), la faible production de méthane *in vivo* dans le mouton A devrait s'accompagner d'une plus grande proportion de propionate et d'une plus faible proportion d'acétate. Malgré tout, aucun effet claire du profil fermentaire n'a été observé. La corrélation négative entre la production de méthane et la proportion de propionate suppose que les AGV sont absorbés dans les mêmes proportions qu'ils sont produits. D'après McLeod et al. (1984), quand le pH du rumen est bas, la vitesse d'absorption du propionate et du butyrate est plus élevée que celle de l'acétate. Ainsi, l'absence d'une plus grande proportion propionate dans le jus du rumen du mouton A malgré sa plus faible production de méthane serait due à son pH bas qui induit des différences dans la vitesse d'absorption des différents AGV. En accord avec la stoechiométrie, la faible production de méthane observée *in vitro* chez le mouton A était accompagnée d'une plus grande production de propionate et d'une plus faible production d'acétate alors que le butyrate n'a pas changé significativement (tableau 11).

### 2.2.6. Comparaison entre la quantité de méthane mesurée et celle estimée à l'aide des équations de l'IPCC

La quantité de méthane produite dans le rumen de chaque mouton par an a été estimée et comparée avec celle calculée en utilisant les équations de l'IPCC. Ainsi, les coefficients de variation entre la quantité de méthane mesurée et celle calculée est élevée pour le mouton A (33.8%) alors pour les moutons B, C et D le facteur d'émission (IPCC, tier 1) (8kg de méthane / ha / an) ainsi que le méthane calculé en utilisant la méthode de l'IPCC (tier 2) (7.4-8.5kg de méthane / animal / an) est dans les limites de la production de méthane mesurée (tableau 13). Il est donc clair que la précision des estimations de la production de méthane effectuées par l'IPCC pourrait être améliorée en incorporant le facteur animal entre autre.

**Table13:** Comparaison entre les émissions de méthane mesurées et estimées à l'aide des équations établies par l'IPCC

moutons	MSI (g jour <sup>-1</sup> )	méthane produit (kg an <sup>-1</sup> )		
		mesuré	IPCC: tier 1 <sup>a</sup>	IPCC: tier 2 <sup>b</sup>
A	1093	5.3	8.0 (33.8 <sup>c</sup> )	8.0 (33.8)
B	1169	7.5	8.0 (6.3)	8.5 (11.8)
C	1012	6.8	8.0 (5.0)	7.4 (8.1)
D	1120	8.0	8.0 (0.0)	8.2 (2.4)
moyenne (n=4)	1099	6.9	8.0 (13.8)	8.0 (13.8)

MSI: matière sèche ingérée; a: facteur d'émission dépendant de l'espèce animale et du sous-groupe; b: émissions de méthane (kg / an) = [l'ingéré (Mj / jour \* Ym \* (365 jours / an)] / [55.65Mj / kg de méthane] où Ym = facteur de conversion exprimé en forme décimale (ici 0.06) ; c: coefficient de variation ( $\pm$ ) entre les émissions de méthane mesurées et calculées en utilisant les équations de l'IPCC (IPCC 1996).

### 2.2.7. Stoechiométrie de fermentation ruminale estimée à partir de la concentration des AGV et de la dégradabilité effective dans le rumen

La quantité de méthane produite dans les incubations *in vitro* en utilisant un inoculum du rumen peut être calculée à partir des AGV produits en utilisant les équations stoechiométriques décrivant les flux d'hydrogène (Demeyer, 1991). Suite à une absorption continue des AGV dans le rumen, la production nette des AGV *in vivo* est difficile à mesurer.



Néanmoins, au cours de cette expérience, à partir de la dégradabilité de la matière organique mesurée à l'aide de la technique des sachets de nylon et du taux de passage des particules du rumen et de la concentration des AGV dans le rumen, il a été possible de valider les équations stoechiométriques décrivant le flux d'hydrogène métabolique *in vivo* (tableau 14).

**Tableau 14:** Les bilans d'hydrogène métabolique (%), calculés à partir de la dégradabilité effective de la matière organique et de la concentration des AGV dans le rumen (moyenne (et))

mouton	saison 1	saison 2
A	96 (12)	92 (12)
B	97 (16)	109 (20)
C	109 (20)	104 (13)
D	103 (20)	102 (14)

Bilan d'hydrogène métabolique:  $2Hr = (2P + 2B + 4 M)*100 / (2A + P + 4B)$  (Demeyer, 1991); A, P, B, M: production d'acétate, de propionate, de butyrate et de méthane dans le rumen.

### 2.2.9. Effet de la fertilisation azotée sur les protozoaires

En moyenne, la fertilisation azotée n'a pas eu un effet significatif sur le nombre de protozoaires (tableau 15). Seule une tendance (P=0.233) vers une concentration plus faible des protozoaires quand les animaux sont alimentés avec de l'herbe provenant d'un pâturage non fertilisé est observée. Cela est probablement due à la proportion de trèfle plus élevée dans ce pâturage car cette légumineuse qui contient des saponines capable d'agir négativement sur le nombre de protozoaires. Néanmoins, la diminution des protozoaires semble trop faible pour induire une diminution des émissions de méthane.

**Table 15: Effet du traitement <sup>(I)</sup> et de l'animal <sup>(II)</sup> sur la concentration des protozoaires dans le rumen (moyenne (et))(n= 64 ou 16 pour (I) et (II) respectivement)**

traitement <sup>(I)</sup>	<i>entodinium</i>	<i>isotrichidae</i>	<i>diplodinium</i>	<i>epidinium</i>	total 10 <sup>5</sup>
	(%)				
N0	83.9 (9.6)	3.0 (2.4)	5.8 (4.1)	7.2 (5.0)	8.3 (1.8)
N150	83.6 (7.7)	3.9 (3.5)	6.9 (5.1)	5.8 (3.3)	9.3 (2.6)
mouton <sup>(II)</sup>					
A	88.9 <sup>b</sup> (5.8)	1.4 <sup>a</sup> (1.4)	4.4 (3.9)	5.8 <sup>ab</sup> (3.0)	8.1 <sup>a</sup> (2.1)
B	78.1 <sup>a</sup> (5.8)	5.9 <sup>b</sup> (3.2)	7.6 (3.4)	8.4 <sup>b</sup> (2.6)	10.6 <sup>b</sup> (2.8)
C	88.0 <sup>b</sup> (8.1)	1.7 <sup>a</sup> (1.0)	7.1 (6.2)	3.3 <sup>a</sup> (3.9)	7.9 <sup>a</sup> (1.6)
D	80.1 <sup>a</sup> (9.3)	4.8 <sup>b</sup> (3.4)	6.2 (4.4)	8.4 <sup>b</sup> (5.1)	8.5 <sup>a</sup> (1.4)

N0: pâturage non fertilisé ; N150: pâturage non fertilisé avec 150kg Nha<sup>-1</sup>an<sup>-1</sup> ; a, b: les valeurs moyennes avec des lettres différentes dans la même colonne diffèrent significativement (p<0.05)

### 2.2.8. Effet de la fertilisation azotée sur l'efficacité de l'utilisation de l'azote dans le rumen

La fertilisation ne provoque pas d'effet significatif sur la dégradabilité des protéines brutes (tableau 16). De nouveau, l'effet de la saison interfère avec le carré latin du plan expérimental. Pourtant, en tenant compte de la variation due aux animaux et à la saison, il est clair, que la qualité du pâturage en terme de dégradabilité ruminale ne change pas sous l'influence de la fertilisation.

**Tableau 16: Dégradabilité *in sacco* des protéines brutes fraction rapidement dégradable a et dégradabilité effective DE (%) (Orskov & McDonald, 1979) (moyenne (et))**

saison	Mouton				Moyenne	
	A	B	C	D		
saison 1	a (%)	<b>55,8</b>	<b>55,1</b>	56,1	54,4	55.4
		<b>(1,0)*</b>	<b>(1,4)</b>	(4,9)	(1,5)	(2.2)
		62,6	54,3	<b>59,7</b>	<b>62,1</b>	59.7
		(11,9)	(6,7)	<b>(2,2)</b>	<b>(5,1)</b>	(6.5)
	DE (%)	<b>72,8</b>	<b>77,9</b>	81,6	81,4	78.4
		<b>(0,7)</b>	<b>(3,1)</b>	(4,4)	(1,9)	(2.5)
		73,2	74,6	<b>74,2</b>	<b>78,2</b>	75.1
		(7,3)	(5,7)	<b>(1,8)</b>	<b>(1,9)</b>	(4.2)
saison 2	a (%)	<b>54.2</b>	<b>54.7</b>	55.2	54.5	54.6
		<b>(3.9)</b>	<b>(3.9)</b>	(0.8)	(4.3)	(2.7)
		59.9	59.0	<b>65.5</b>	<b>62.8</b>	61.8
		(3.5)	(3.7)	<b>(7.7)</b>	<b>(6.3)</b>	(5.0)
	DE (%)	<b>73.5</b>	<b>79.5</b>	75.1	77.1	76.3
		<b>0.6)</b>	<b>(2.3)</b>	(0.9)	(0.7)	(2.6)
		76.6	72.8	<b>81.3</b>	<b>78.9</b>	77.4
		(1.6)	0.7)	<b>(0.8)</b>	<b>(1.3)</b>	(3.4)

\* Les valeurs foncées sont déterminées avec de l'herbe du pâturage fertilisé (150 kg/ha/an)

Concernant, le taux d'azote dégradable dans le rumen (tableau 17), il est claire que la saison joue un rôle plus important que le niveau de fertilisation. En effet, comme la valeur des protéines brutes dégradées dans le rumen en comparaison avec la matière sèche dégradée donne une indication du surplus de l'azote par rapport à l'énergie, il est clair que le surplus d'azote (> 165 g de protéines incorporées par kg de matière sèche dégradée Tamminga et al., 1992) est plus important dans la deuxième saison que dans la première quel que soit le niveau de fertilisation (tableau 17). Il est à noter qu'aucun traitement dans n'importe quelle saison ne provoque vraiment un manque d'azote pour la croissance des microbes ruminales.

**Tableau 17: Protéines brutes dégradées dans le rumen en comparaison de la matière sèche dégradée (g PBED/gMSED) (moyenne (et))**

saison	Mouton				Moyenne
	A	B	C	D	
saison 1	<b>173.0</b>	<b>168.3</b>	168.5	167.8	169.4
	<b>(21.3)*</b>	<b>(15.4)</b>	(19.2)	(15.1)	(16.9)
	140.2	146.9	<b>138.5</b>	<b>147.6</b>	143.3
	(23.8)	11.4)	<b>(18.1)</b>	<b>(20.6)</b>	(18.2)
saison 2	<b>213.2</b>	<b>214.7</b>	224.7	224.9	219.4
	<b>(7.2)</b>	<b>(23.0)</b>	(2.8	(2.5)	(8.5)
	228.4	231.0	<b>240.0</b>	<b>240.3</b>	234.9
	(20.3)	(23.0)	<b>(9.6)</b>	<b>(12.3)</b>	(16.4)

PBED: protéines brutes effectivement dégradées ; MSED: matière sèche effectivement dégradée ; \* Les valeurs foncées sont déterminées avec de l'herbe du pâturage fertilisé (150 kg/ha/an)

La concentration ammoniacale (tableau 18) reflète l'ingestion d'azote (corrélation : 0.93) et le surplus d'azote dans le rumen par rapport à l'énergie (corrélation : 0.54). Comme il n'y a pas de déficit d'azote pour les microbes ruminaux, une croissance microbienne similaire pour chaque traitement accompagnée d'une excrétion urinaire d'urée élevée dans la deuxième saison étaient attendues ce que confirme les résultats rapportés dans le tableau 18.

**Tableau 17:** Pool d'ammoniacale dans le rumen (g/jour), l'excrétion urinaire d'urée (g/jour) et les dérivées purines excrétées dans les urines (mmoles/jour) ( moyenne (et))

Période	Mouton				Moyenne	
	A	B	C	D		
saison 1	NH <sub>3</sub>	<b>5.41</b>	<b>3.57</b>	1.75	5.27	3.78
	(rumen)	<b>(59,7)*</b>	<b>(0.67)</b>	(0.46)	(0.52)	(1.44)
		3.56	2.68	<b>1.89</b>	<b>4.18</b>	3.08
		(0.87)	(0.48)	<b>(0.26)</b>	<b>(1.24)</b>	(1.16)
	Urée	<b>9.37</b>	<b>10.07</b>	4.17	8.20	12.45
	(urine)	<b>(2.00)</b>	<b>(6.38)</b>	(4.24)	(2.02)	(6.38)
		5.01	6.24	<b>4.71</b>	<b>5.39</b>	5.34
		(0.42)	(1.01)	<b>(1.23)</b>	<b>(1.09)</b>	(1.01)
	DP (urine)	<b>6.61</b>	<b>8.91</b>	6.84	8.17	7.63
		<b>(2.66)</b>	<b>(1.29)</b>	(2.55)	(1.04)	(2.06)
		7.28	7.51	<b>7.22</b>	<b>6.61</b>	7.15
		(1.94)	(1.94)	<b>(1.40)</b>	<b>(2.51)</b>	(1.80)
saison 2	NH <sub>3</sub>	<b>3.64</b>	<b>3.32</b>	2.39	5.26	3.56
	(rumen)	<b>(0.36)</b>	<b>(0.44)</b>	(0.50)	(0.94)	(1.20)
		3.24	3.66	<b>2.04</b>	<b>4.87</b>	3.45
		(0.75)	(0.44)	<b>(0.52)</b>	<b>(0.75)</b>	(1.19)
	Urée	<b>17.21</b>	<b>11.09</b>	16.23	21.92	16.61
	(urine)	<b>(2.22)</b>	<b>(6.86)</b>	(2.96)	(3.99)	(5.58)
		19.35	13.24	<b>18.87</b>	<b>17.26</b>	14.68
		(4.17)	(3.37)	<b>(4.74)</b>	<b>(6.76)</b>	(5.82)
	DP (urine)	<b>4.92</b>	<b>4.52</b>	6.37	10.03	6.46
		<b>(0.43)</b>	<b>(0.91)</b>	(1.39)	(1.94)	(2.06)
		7.55	7.92	<b>7.92</b>	<b>9.05</b>	7.58
		(1.59)	(0.93)	<b>(0.93)</b>	<b>(1.76)</b>	(1.88)

\* Les valeurs foncées sont déterminées avec de l'herbe du pâturage fertilisé (150 kg/ha.an) ;  
DP: dérivées des purines (allantoïnes, acide urique, xantine et hypoxanthine).

### **III. IIème année (2000)**

**Effet du niveau de fertilisation azotée et du système de  
supplémentation sur les émissions de méthane**

**Pâturage: Ray Grass**

**Niveaux de fertilisation: 200 et 400kg N ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup>**

### 3.1. Méthodologie

#### 3.1.1. Préparation et utilisation du pâturage

Cette deuxième expérience avait pour objectif d'étudier l'effet du niveau de fertilisation azotée et du système de supplémentation sur les émissions de méthane et sur l'efficacité d'utilisation de l'azote. Cette étude a été menée au cours de deux saisons successives (début et fin été 2000: saison 1: Mai, saison 2: Août). Un pâturage de ray grass (*Lolium perenne*) ayant une superficie de 8344m<sup>2</sup> a été subdivisé en deux parties: une partie (2938m<sup>2</sup>) fertilisée avec 400Nha<sup>-1</sup>an<sup>-1</sup>(N400) et une autre (5406m<sup>2</sup>) avec 200kgNha<sup>-1</sup>an<sup>-1</sup> (N200). Avant la fertilisation, il a été procédé à la détermination de l'azote présent dans le sol. Un échantillon de sol a été pris à plusieurs endroits du pâturage à différentes profondeurs: 0-30cm, 30-60cm et 60-90cm. Ces échantillons ont été analysés au Département de Phytotechnie et Ecophysiologie par la méthode Kjeldhal (AOAC, 1990). La teneur en azote dans le sol était en moyenne de 11.2mg kg<sup>-1</sup> de MS du sol traduisant un déficit par rapport la teneur souhaitable (140mg kg<sup>-1</sup>) (Gabriëls et al., 1984).

Suite à la variabilité inter-animaux quant aux paramètres de la fermentation dans le rumen et à l'interaction animal-stade de croissance du fourrage déjà observées au cours de la première année expérimentale (1999), nous avons adopté un système en carré latin en utilisant du fourrage conservé par séchage doux (*c.a.* 40°C). Ce système permet d'avoir un fourrage qui se conserve bien sans pour autant diminuer la dégradabilité des protéines qui faisaient par ailleurs l'objet principal de notre étude. Le programme de coupe, de fertilisation et d'utilisation de l'herbe du pâturage que nous avons suivi est rapporté dans le tableau 19.

**Tableau 19: Plan expérimental: coupe de l'herbe, fertilisation du pâturage et récolte du fourrage pour expérimentation**

saisons	Traitement	Utilisation du fourrage
<u>saison 1</u>		
27 Mars 2000	fertilisation (200kg - 400 N/ha)	
05 Mai 2000	1ère coupe	non utilisé
08 Mai 2000	fertilisation (200kg - 400 N/ha)	
30 Mai 2000	2ème coupe	utilisé pour l'expérience
<u>saison 2</u>		
31 Mai 2000	fertilisation (200kg - 400 N/ha)	
31 Juin 2000	3ème coupe	non utilisé
14 Juillet 2000	fertilisation (200kg - 400 N/ha)	
22 Août 2000	4ème coupe	utilisé pour l'expérience

### 3.1.2. Mesure des paramètres du pâturage

Les paramètres du pâturage qui ont été mesurés sont: l'effet du niveau de fertilisation azotée sur la quantité de matière sèche (MS) produite par ha ainsi que la composition chimique du fourrage. La composition chimique du fourrage (matière organique, minéraux, protéines brutes (PB), fibres brutes, fibres insolubles dans les solvants neutres (NDF), fibres insolubles dans les solvants acides (ADF) et les sucres solubles dans l'eau) a été déterminée avant et après le séchage de la même manière qu'en première année (AOAC, 1990). La concentration en nitrates dans le fourrage a été aussi mesurée par chromatographie en utilisant une colonne spécifique pour les anions (AS 4A, Dionex, Belgium). Vingt deux jours (première saison) et 39 jours (deuxième saison) après la fertilisation azotée, toute l'herbe du pâturage a été coupée, la production de matière fraîche totale pesée et un échantillonnage à plusieurs endroits a été effectué pour déterminer le taux de MS et la composition chimique du fourrage. Après une demie journée de ressuyage à l'air libre, l'herbe était entreposé selon le niveau de fertilisation dans des compartiments de séchage artificielle. Pour éviter le développement des moisissures, de l'air frais



était d'abord pompé dans l'herbe pendant un jour avant que de l'air chaud (*c.a.* 40°C) ne soit pompé à son tour dans les compartiments de séchage pendant trois à sept jours. Chaque jour, un échantillon d'herbe était pris à différentes profondeurs pour déterminer la MS et on a estimé que l'herbe pouvait bien se conserver à 15% de MS. Après le séchage, un échantillon était pris à plusieurs endroits pour les analyses chimiques avant que l'herbe ne soit subdivisée en ballots et conservée dans un hangar bien aéré. C'est l'herbe séchée qui a été distribuée aux animaux au cours de l'expérience *in vivo*. Comme pour la première année (1999) du projet, la récolte, le séchage et les analyses chimiques du pâturage étaient faites par le Laboratoire de Phytotechnie et Ecophysologie. La production de matière sèche par ha, la composition chimique aussi bien avant qu'après le séchage doux sont rapportées dans le tableau 20.

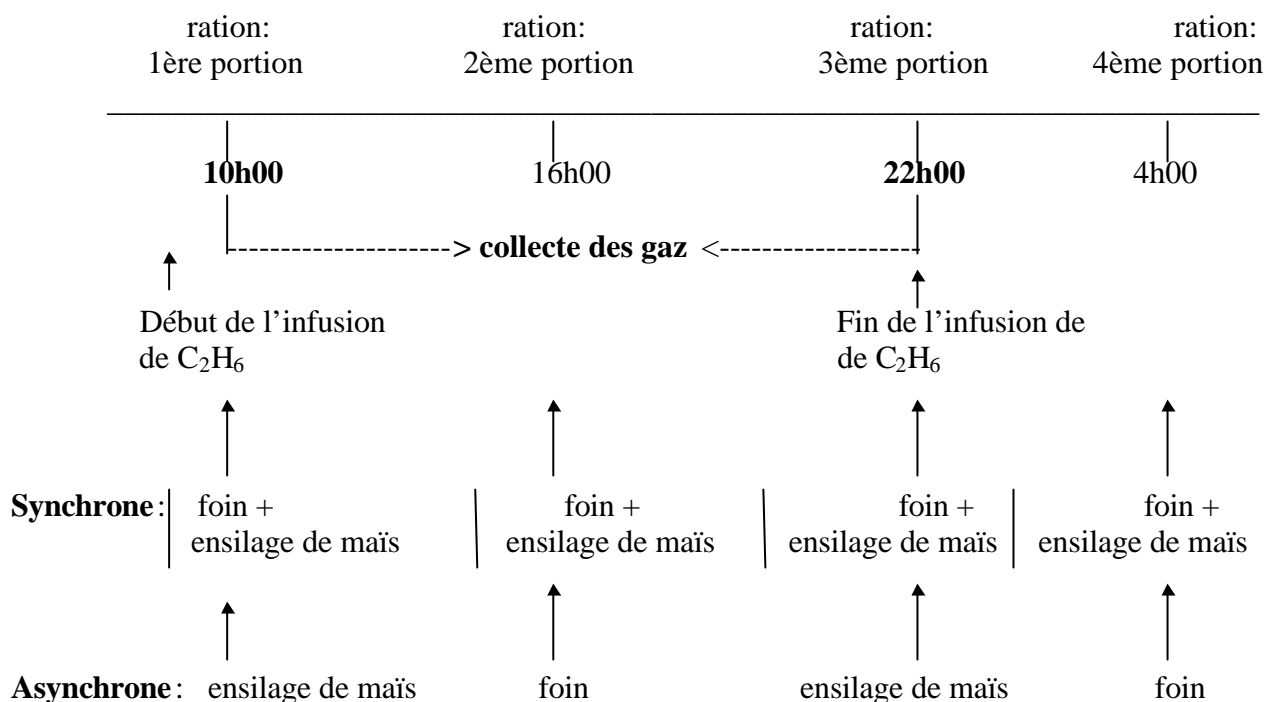
### **3.1.3. Animaux et ration**

Quatre moutons adultes (E, F, G, H) castrés pesant respectivement 72.0, 65.0, 85.0, 86.5kg, porteurs d'une fistule permanente au niveau du rumen ont été utilisés. Comme au cours de la première année expérimentale (1999), l'évaluation aussi bien des émissions CH<sub>4</sub> que des rejets d'azote dans l'environnement, les animaux étaient gardés dans des cages métaboliques où ils recevaient en quatre portions (10h00, 4h00, 22h00 et 4h00) de l'herbe *ad libitum* (figure VI). Lors de l'étude de l'effet de la méthode de supplémentation, les animaux recevaient soit de l'herbe fertilisée (400kgNha<sup>-1</sup>an<sup>-1</sup>) mélangée avec de l'ensilage de maïs (supplémentation synchronisée), soit les deux séparément (supplémentation non synchronisée) (voir figure VI).

### **3.1.4. Collecte des gaz et évaluation de la production de méthane**

Comme décrit précédemment, au cours de chaque saison, l'effet du niveau de fertilisation azotée sur la production de méthane dans le rumen a été étudiée pendant deux périodes de deux semaines chacune séparées par 10 jours d'adaptation dans un système en carré latin. Au cours de la première période, les moutons E et F étaient adaptés au pâturage fertilisé avec 400kgNha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> (N400) alors que les moutons G et H recevaient l'herbe du pâturage fertilisé avec 200kgNha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> (N200). Pendant la deuxième période, le traitement des moutons était inversé, les moutons E et F étaient alimentés avec le pâturage N200 alors que les moutons G et H recevaient le pâturage N400 et il en était de même pour la supplémentation. Pour mesurer la production totale de méthane *in vivo*, la même méthode développée au cours de la première année a été utilisée.

Néanmoins, contrairement à l'étude de l'effet du niveau de fertilisation azotée sur la méthanogénèse où la ration était distribuée *ad libitum* en 4 portions, pour étudier l'effet du système de supplémentation sur les émissions de méthane, la ration distribuée était équivalente à 85% de l'énergie nette contenue dans le foin distribué *ad libitum*. Ainsi, l'équivalent énergie d'une partie du foin a été remplacée par l'équivalent énergie sous forme d'ensilage de maïs, les deux portions étaient distribuées soit mélangées (supplémentation synchronisée) soit alternativement (supplémentation non-synchronisée). Le gaz totale expulsé par la fistule était collecté continuellement pendant 12h entre 10.00 h (ration du matin) et 22.00 h (ration du soir) (figure VI). La collecte se faisait à l'aide d'un dispositif basé sur les mêmes principes que pendant la première année expérimentale (figure V). Etant donné que la collecte se faisait pendant 12h, des colonnes en PVC plus grandes ont été montées. Ainsi, pour chaque mouton, une colonne en verre (7.5l) et une autre en PVC (63.0l) ont été utilisées. La quantité de méthane produite en 12h dans le rumen était calculée en tenant compte de la vitesse d'infusion de l'éthane ainsi que des proportions de méthane et d'éthane dans le gaz collecté (formule: voir première année expérimentale). Néanmoins, étant donné que le gaz était collecté pendant 12h, la production totale de méthane par jour est le double de la production mesurée.



**Figure VI:** Plan quotidien de rationnement des animaux, d'infusion d' $C_2H_6$  et de collecte des gaz

### 3.1.5. Collecte du jus du rumen et dosage des AGV et de l'ammoniac

Pour étudier l'effet de la fertilisation azotée sur les proportions des AGV et l'utilisation des protéines, nous avons dosé les AGV et l'ammoniac dans le jus du rumen pendant la collecte des gaz. Contrairement à la première année où le jus du rumen était collecté seulement deux fois, au cours de la deuxième année, le jus du rumen était collecté toutes les heures. La méthode de collecte du jus du rumen, le dosage des AGV et de l'azote ammoniacal étaient faites comme au cours de la première année expérimentale.

### 3.1.6. Incubations *in vitro*

Les incubations *in vitro* ont été faites seulement pour la première saison où les résultats *in vivo* n'étaient pas très claires. Etant donné la multitude de phénomènes qui se passent *in vivo* (ex: absorption des AGV, recyclage de l'azote, sécrétion de l'azote endogène), pour clarifier les résultats observés *in vivo* lors de la première expérience, il a été procédé à des incubations *in vitro*. La même méthode que celle utilisée en première année a été adoptée mais cette fois avec un échantillon de 0.4g au lieu de 0.5g.

### **3.1.7. Dégradabilité *in sacco* (MS, protéines brutes) et vitesse de passage**

Des incubations *in sacco* en utilisant de l'herbe des deux pâturages étaient faites pour mettre en relation la production de méthane avec la dégradabilité de la MS. Les échantillons étaient moulus dans un moulin à marteau de type Brabander sur tamis de 2mm puis stockés dans des sacs en plastique avant leur utilisation. La même méthode utilisée au cours la première année a été utilisée. Pour calculer la dégradabilité effective dans le rumen de la MS et des protéines de l'herbe ingérée, la vitesse de passage des particules du rumen était déterminée à l'aide du foin mordancé au chrome comme marqueur selon la méthode décrite au cours de la première année.

### **3.1.8. Mesure de la digestibilité totale apparente, de la croissance microbienne et de l'excrétion d'azote**

Les fescès étaient collectés deux fois la semaine pour la détermination de la matière sèche apparemment digérée. Les mêmes échantillons servaient au dosage de la quantité d'azote excrétée dans les fescès. Pour compléter l'étude de l'efficacité d'utilisation de l'azote, nous avons procédé à la détermination de la quantité d'azote excrétée dans les urines ainsi qu'à l'estimation de la croissance microbienne comme décrit au cours de la première année.

### **3.1.9. Analyses statistiques**

Les effets de la fertilisation azotée sur les paramètres étudiés ont été évalués en utilisant la procédure GLM et le test de Duncan en mettant tous les animaux ensemble. En second lieu, le test "one-way ANOVA" était utilisé pour évaluer l'effet animal et saison indépendamment du traitement subit par les animaux. Tous ces tests étaient faites avec le programme statistique SPSS. Les résultats sont sous forme de moyennes  $\pm$  écart type et la différence significative était déclarée à  $P < 0.05$ .

## 3.2. Résultats

### 3.2.1. Effet du niveau de fertilisation azotée sur la production de MS et la composition chimique du fourrage

Le niveau de fertilisation azotée de  $400\text{kg N ha}^{-1}\text{an}^{-1}$  entraîne une production de MS  $\text{ha}^{-1}$  plus élevée que le niveau de  $200\text{ N ha}^{-1}\text{an}^{-1}$  aussi bien au début qu'à la fin de l'été. En effet, comme le montre le tableau 20, comparé à  $200\text{kg N ha}^{-1}\text{an}^{-1}$ , le niveau de fertilisation azotée de  $400\text{kg N ha}^{-1}\text{an}^{-1}$  a augmenté la production de MS de 70% et 110% au cours de la première et la deuxième saison respectivement. Il y a un effet saison sur la production de MS, la production fourragère est plus importante en début de la saison de pâture qu'à la fin. En effet, au cours de la deuxième saison et pour un même niveau de fertilisation, il a fallu environ 2 fois plus de temps de repousse pour produire la même quantité de MS à l'hectare qu'au cours de la première saison.

Comme rapporté dans le tableau 20, le niveau de fertilisation azotée de  $400\text{kg N/ha/an}$  a entraîné un taux de protéines brutes plus élevé que celui de  $200\text{kg N/ha/an}$  au cours des deux saisons, la différence étant plus grande au début qu'à la fin de la saison de pâture. Cette différence est probablement due à l'effet additionnel de l'azotée présent pendant le printemps. Notons aussi que ce ne sont pas toutes coupes générées par la fertilisation azotée qui ont été évaluées. L'effet de dilution des protéines dans la biomasse végétale augmentée suite au niveau de fertilisation élevé n'est pas à négliger. En effet, la production de protéines corrigée par rapport à la MS produite par ha montre des différences plus nettes entre les deux niveaux de fertilisations. Bien plus, la différence entre les deux niveaux de fertilisation au cours des deux saisons est environ la même:  $400\text{kg N ha}^{-1}\text{an}^{-1}$  produit 2.5 fois plus de protéines que  $200\text{kg N ha}^{-1}\text{an}^{-1}$ . L'augmentation du pourcentage de protéines brutes observée lors de l'utilisation d'un niveau de fertilisation élevé s'accompagne d'une diminution des sucres solubles et d'une augmentation des nitrates. Néanmoins le taux de nitrate dans la MS reste très en deca du niveau toxique ( $15000\text{ ppm}$ ) (Geurink et al., 1982). Le séchage doux a diminué les taux de sucres solubles (SS) au cours de la première saison probablement à cause de la respiration qui s'est poursuivie lors du séchage qui a duré plus longtemps dans la première que dans la deuxième saison (7 vs 3 jours).

**Table 20. Effet du niveau de fertilisation azotée sur la production de MS et la composition chimique du fourrage**

saïson / traitement (kgN/ha/an)	MO	PB	FB	NDF	ADF	SS	GB	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (ppm)	PBT (kg/ha <sup>-1</sup> )	MST
	(% DM)									
saïson 1: 22j										
N200 fraîche	89.7	15.3	26.4	49.3	24.1	15.1	-	509		
sèche	84.9	13.6	28.1	49.7	25.3	10.8	3.6	186	218	1604
N400 fraîche	89.3	19.9	25.7	50.1	24.2	11.2	-	3839		
sèche	89.3	20.1	28.2	50.2	25.0	7.3	3.8	2697	547	2722
saïson 2: 39d										
N 200 fraîche	92.8	12.9	29.0	52.4	26.1	16.4	-	246		
sèche	91.7	13.1	27.2	50.9	25.2	16.3	-	211	208	1590
N400 fraîche	89.3	19.9	25.7	50.1	24.2	11.2	-	3839		
sèche	92.0	15.7	29.9	52.7	26.8	12.7	-	2452	525	3347

N200, N400: pâturage fertilisé avec 200 et 400kg N/ha/an respectivement; MS: matière sèche ; MO: matière organique ; PB: protéines brutes ; FB: fibres brutes ; NDF: neutral detergent fiber ; ADF: acid detergent fiber ; SS: sucres solubles ; GB: graisses brutes ; MST: production totale de MS ; PBT: production totale de PB.

### 3.2.3. Effet du niveau de fertilisation azotée sur les émissions de méthane

Au début de la période de pâture (saïson 1), comparé avec 200kg, le niveau de fertilisation azoté de 400kg d'azote par ha et par an a entraîné une diminution des émissions de méthane seulement pour deux moutons (tableau 21). Cette diminution devrait normalement s'accompagner d'une augmentation du propionate et d'une diminution de l'acétate mais aucun changement clair dans les proportions des différents AGV n'a été observé (tableau 21). De même aucune différence claire dans les émissions de méthane entre les deux niveaux de fertilisation à la fin de la période de pâture (saïson 2) n'a été observée (tableau 22).

**Table 21: Effet du niveau de fertilisation azotée sur les émissions de méthane *in vivo*, le pH et les AGV (saison 1) (moyenne (et))(n=4)**

mouton / traitement	MSI (g /jour)	CH <sub>4</sub> (1kg <sup>-1</sup> MSI)	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	iAGV	AGVt	pH
E 200N	717 <sup>a</sup>	38.8 <sup>a</sup>	67.2	21.0	7.8 <sup>a</sup>	2.4	99.1	6.37
	(67)	(5.1)	(1.0)	(1.0)	(0.2)	(0.2)	(4.2)	(0.13)
400N	1245 <sup>b</sup>	25.2 <sup>b</sup>	67.2	22.5	5.8 <sup>b</sup>	2.4	98.0	6.45
	(304)	(3.3)	(2.0)	(1.3)	(0.9)	(0.9)	(20.1)	(0.21)
F 200N	1272 <sup>a</sup>	30.0 <sup>a</sup>	65.9 <sup>a</sup>	20.6	9.5 <sup>a</sup>	2.0	114.9	6.06
	(87)	(2.9)	(0.5)	(0.4)	(0.4)	(0.3)	(6.4)	(0.12)
400N	1600 <sup>b</sup>	23.9 <sup>b</sup>	67.1 <sup>b</sup>	20.1	8.1 <sup>b</sup>	2.6	121.7	6.26
	(121)	(3.4)	(0.4)	(0.9)	(0.6)	(0.6)	(21.1)	(0.38)
G 200N	1832 <sup>a</sup>	24.0	71.2	18.2	7.6	1.2 <sup>a</sup>	95.0	6.41
	(85)	(3.6)	(0.4)	(0.7)	(0.4)	(0.2)	(7.3)	(0.07)
400N	1674 <sup>b</sup>	23.9	69.8	18.2	7.4	2.5 <sup>b</sup>	102.2	6.44
	(77)	(6.4)	(1.1)	(0.6)	(0.2)	(0.2)	(6.7)	(0.07)
H 200N	1915	23.7	68.3	19.1	9.4	1.5 <sup>a</sup>	106.8	6.29
	(42)	(2.5)	(0.5)	(0.5)	(0.3)	(0.1)	(14.7)	(0.29)
400N	1805	24.4	68.3	18.4	8.7	2.4 <sup>b</sup>	106.5	6.41
	(114)	(1.8)	(1.1)	(0.4)	(0.6)	(0.3)	(7.6)	(0.04)

MSI: matière sèche ingérée ; AGV: acides gras volatils ; C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, iAGV: acétate, propionate, butyrate, iso AGV; AGVt: acides gras volatils totaux; 200N, 400N: pâturages fertilisés avec 200 et 400 kg d'azote par ha et par an ; a, b: les valeurs moyennes pour chaque mouton portant des lettres différentes dans une même colonne sont significativement différentes (p<0.05).

**Table 22. Effet du niveau de fertilisation azotée sur les émissions de méthane *in vivo*, le pH et les AGV (saison 2) (moyenne (et))(n=4)**

mouton / traitement	MSI (g /jour)	CH <sub>4</sub> (lkg <sup>-1</sup> MSI)	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	iAGV	AGVt mmoles l <sup>-1</sup>	pH
		(%)						
E 200N	875 <sup>a</sup>	33.4	60.0 <sup>a</sup>	22.8	12.6 <sup>a</sup>	2.8	108.8 <sup>a</sup>	6.33
	(44)	(1.9)	(1.4)	(1.2)	(0.3)	(0.3)	(9.1)	(0.12)
400N	1036 <sup>b</sup>	31.9	63.7 <sup>b</sup>	21.8	9.9 <sup>b</sup>	2.6	129.2 <sup>b</sup>	6.24
	(59)	(4.9)	(0.5)	(0.3)	(0.5)	(0.3)	(11.1)	(0.18)
F 200N	994	26.9	63.9	22.6 <sup>a</sup>	10.7 <sup>a</sup>	1.4 <sup>b</sup>	113.6	6.00
	(39)	(2.0)	(1.0)	(1.0)	(0.5)	(0.3)	(8.5)	(0.08)
400N	1007	28.7	66.1	19.9 <sup>b</sup>	9.7 <sup>b</sup>	2.5 <sup>b</sup>	136.7	6.06
	(239)	(2.0)	(1.6)	(0.8)	(0.5)	(0.7)	(22.1)	(0.32)
G 200N	1478	28.6	66.6 <sup>a</sup>	20.2 <sup>a</sup>	10.2 <sup>a</sup>	1.7 <sup>a</sup>	107.5	6.28 <sup>a</sup>
	(25)	(3.2)	(1.2)	(0.7)	(0.7)	(0.1)	(11.4)	(0.09)
400N	1362	27.8	64.3 <sup>b</sup>	19.3 <sup>b</sup>	11.4 <sup>b</sup>	2.9 <sup>b</sup>	98.3	6.51 <sup>b</sup>
	(158)	(3.7)	(1.3)	(0.6)	(0.7)	(0.2)	(10.6)	(0.06)
H 200N	1498	33.8	62.4	22.3 <sup>a</sup>	11.7	3.2 <sup>a</sup>	110.3	6.31 <sup>a</sup>
	(50)	(1.4)	(1.4)	(0.7)	(0.8)	(0.2)	(4.7)	(0.02)
400N	1442	30.5	62.3	20.6 <sup>b</sup>	11.8	2.2 <sup>b</sup>	101.1	6.48 <sup>b</sup>
	(89)	(2.6)	(0.5)	(0.5)	(0.2)	(0.1)	(7.1)	(0.06)

MSI: matière sèche ingérée ; AGV: acides gras volatils; C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, iAGV: acétate, propionate, butyrate, iso AGV ; AGVt: acides gras volatils; 200N, 400N: pâturages fertilisés avec 200 et 400 kg d'azote par ha et par an ; a, b: les valeurs moyennes pour chaque mouton portant des lettres différentes dans une même colonne sont significativement différentes (p<0.05).

Cette différence entre animaux observée au cours de la première saison n'est liée ni à la composition chimique du fourrage (teneur en protéines brutes pour les différents niveaux de fertilisation) ni à la différence entre animaux quant à la flore microbienne ruminale. En effet, comme rapporté dans le tableau 23, les résultats des incubations *in vitro* en utilisant comme



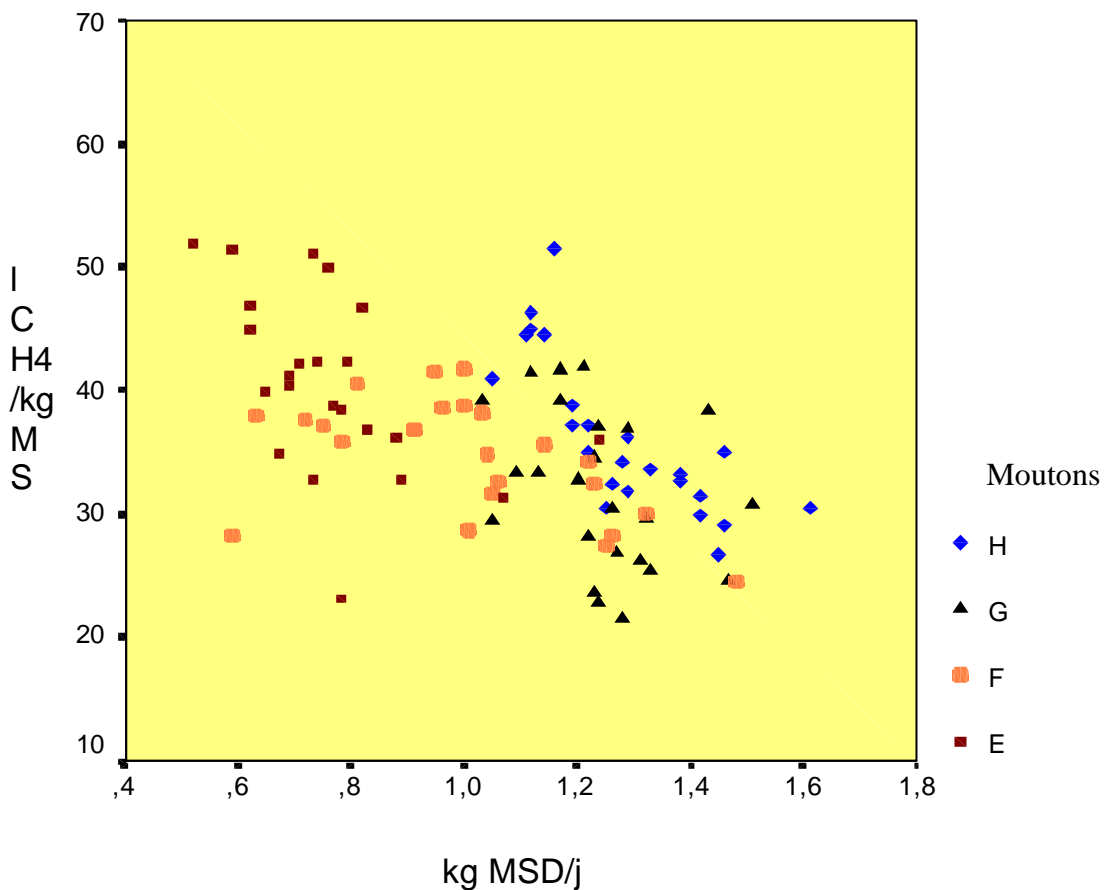
substrat de l'herbe fertilisée avec 200 et 400 kgN/ha/an ne corroborent pas les résultats observés *in vivo* (tableau 21).

**Tableau 23: Effet de la fertilisation azotée sur la production de méthane et des AGV *in vitro* au cours de la première saison (moyenne (et))(n=4)**

mouton / traitement		C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	iAGV	CH <sub>4</sub>	AGV totaux	bilan 2H
		mmoles mole-1 AGV					μmole/flacon	(%)
E	200N	621 <sup>a</sup>	235 <sup>a</sup>	86	21 <sup>a</sup>	209	2096	81
		(2)	(1)	(2)	(1)	(16)	(39)	(4)
	400N	648 <sup>b</sup>	211 <sup>b</sup>	76	28 <sup>b</sup>	230	2042	83
		(15)	(5)	(10)	(4)	(10)	(60)	(2)
F	200N	600 <sup>a</sup>	247 <sup>a</sup>	95	20	208 <sup>a</sup>	2017	83
		(7)	(4)	(5)	(2)	(10)	(82)	(3)
	400N	649 <sup>b</sup>	202 <sup>b</sup>	86	27	253 <sup>b</sup>	1974	86
		(31)	(7)	(8)	(9)	(27)	(47)	(4)
G	200N	653 <sup>a</sup>	215	88	12 <sup>a</sup>	261 <sup>a</sup>	1737 <sup>a</sup>	88
		(9)	(9)	(11)	(2)	(24)	(232)	(6)
	400N	631 <sup>b</sup>	208	85	33 <sup>b</sup>	220 <sup>b</sup>	2125 <sup>b</sup>	81
		(15)	(12)	(3)	(4)	(23)	(30)	(6)
H	200N	636	231 <sup>a</sup>	85	16 <sup>a</sup>	241	1809 <sup>a</sup>	87
		(8)	(6)	(10)	(4)	(10)	(56)	(3)
	400N	634	206 <sup>b</sup>	90	27 <sup>b</sup>	240	2013 <sup>b</sup>	85
		(3)	(12)	(9)	(7)	(6)	(141)	(1)

AGV: acide gras volatils ; C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, iAGV: acétate, propionate, butyrate, iso AGV ; 200N, 400N: pâturage fertilisés avec 200 et 400 kg d'azote par ha et par an ; a, b: les valeurs moyennes pour chaque mouton portant une lettre différente dans une même colonne au cours d'une même saison sont significativement différentes (p<0.05).

La différence entre animaux quant à l'effet azote sur la quantité de méthane émise par kg de matière sèche ingérée est probablement liée aux niveaux d'ingestion différents. En effet, comme rapporté dans le tableau 21, au cours de la première saison, les moutons E et F ayant montré une production de méthane plus élevée pour 200 que pour 400 kg N/ha/an ont montré concomitamment un niveau d'ingestion plus faible pour le niveau de fertilisation bas. En effet, comme le montre la figure VII, il y a une corrélation négative significative ( $p < 0.05$ ) entre la quantité de méthane produite et la quantité de MS ingérée.



**Figure VII: Corrélation entre la production de méthane et la quantité de MS ingérée**

MSD: matière sèche digérée ; MS: matière sèche

Une corrélation négative entre le niveau d'ingestion et la quantité de méthane produite par les ruminants avait été rapportée par plusieurs auteurs (Blaxter and Clapperton, 1965 ; Shibata et al., 1993). En effet, un niveau d'ingestion élevé entraîne une augmentation de la vitesse de passage des particules déplaçant ainsi la digestion du rumen vers les parties les plus basses du tube digestif. Ainsi, les aliments restent moins longtemps dans le rumen et génèrent donc moins de méthane. Une corrélation négative entre les émissions de méthane et le taux de passage des particules avait déjà été mise en évidence par Okine et al. (1989). Au cours de notre expérience, cette hypothèse est vérifiée pour le seul mouton E. En effet, la vitesse de passage des particules est plus lente pour le mouton E lorsqu'il ingère de l'herbe fertilisée avec 200kg N/ha/an comparée à 400kg N/ha/an (0.02 vs 0.03) (voir annexe) alors l'inverse est observée pour les émissions de méthane. L'absence de différence du taux de passage entre les deux traitements en particulier chez le mouton F (ayant montré des niveaux d'ingestion comparables avec ceux du mouton E) est probablement due au fait que le chrome est réputé pour être un mauvais marqueur. Dans tous les cas, une vitesse de passage plus rapide devrait s'accompagner d'une croissance microbienne plus élevée.

#### **3.2.4. Effet du système de supplémentation sur les émissions de méthane**

Le tableau 24 montre l'effet du système de supplémentation sur la production de méthane. Il ressort qu'il n'y a aucune différence significative entre la supplémentation synchronisée et non synchronisée quant aux émissions de méthane. L'hypothèse était que pour une quantité standard de matière organique dégradée (MOD), la synchronisation permettrait d'avoir concomitamment de l'énergie et de l'azote permettant ainsi une augmentation de la matière organique microbienne (MOM) au détriment de la matière organique fermentée (MOF) (Sinclair et al., 1993 ; Witt et al., 199) génératrice de méthane.

**Tableau 24: Effet du système de supplémentation sur la production de méthane *in vivo*, le pH et les AGV (moyenne (et)) (n=4)**

mouton / traitement	MSI (g/jour)	CH <sub>4</sub> (l/kg MSI)	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	iVFA	tot AGV (mmoles/l)	pH
			(%)					
E synchrones	975 (34)	29.3 (2.7)	66.5 (0.8)	18.8 (0.2)	10.0 <sup>a</sup> (0.4)	2.7 (0.1)	105.1 (3.8)	6.10 (0.14)
asynchrones	997 (11)	32.6 (6.5)	65.5 (0.8)	18.2 (1.2)	11.9 <sup>b</sup> (0.7)	2.6 (0.0)	100.1 (7.2)	6.28 (0.08)
F synchrones	1335 (11)	28.0 (1.5)	65.6 (1.5)	17.6 (1.0)	12.6 (1.2)	2.4 (0.2)	123.2 (8.8)	5.79 (0.14)
asynchrones	1338 (8)	26.8 (4.5)	64.8 (1.1)	18.8 (0.4)	12.0 (0.9)	2.4 (0.1)	134.1 (10.8)	5.71 (0.12)
G synchrones	1599 (12)	24.0 (7.5)	65.9 (2.0)	18.0 (0.7)	11.6 (1.2)	2.6 (0.2)	97.1 (11.5)	6.24 (0.16)
asynchrones	1594 (14)	22.1 (1.4)	65.9 (1.4)	18.0 (0.5)	11.9 (0.5)	2.4 (0.3)	99.8 (2.6)	6.17 (0.15)
H synchrones	1654 (18)	29.1 (5.4)	64.0 (1.5)	19.0 (1.2)	12.5 (0.7)	2.6 (0.1)	119.5 (8.8)	5.96 (0.15)
asynchrones	1638 (13)	26.1 (2.5)	64.4 (1.0)	18.5 (0.3)	12.9 (0.7)	2.4 (0.2)	109.7 (7.6)	5.96 (0.20)

MSI: matière sèche ingérée ; AGV: acide gras volatils ; C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, iAGV: acétate, propionate, butyrate, iso AGV ; 200N, 400N: pâturages fertilisés avec 200 et 400 kg d'azote par ha et par an ; a, b: les valeurs moyennes pour chaque mouton portant des lettres différentes dans une même colonne sont significativement différentes (p<0.05).

L'absence de l'effet de la supplémentation synchronisée sur la production de méthane est probablement due à la dégradabilité lente de l'ensilage de maïs. En effet, lors de la supplémentation non synchronisée, le maïs étant distribué à 12h d'intervalle (10h00 et 22h00) il se pourrait qu'il se dégrade lentement de telle façon qu'on a assez d'énergie tout le long de la période nyctémérale simulant ainsi la supplémentation synchronisée.

### 3.2.5. Effet de la fertilisation azotée sur l'efficacité de l'utilisation de l'azote dans le rumen

#### 3.2.5.1. Effets du niveau de fertilisation azotée sur les valeurs OEB

Les effets du niveau de fertilisation azotée sur les valeurs OEB sont rapportés dans le tableau 25. L'analyse de variance montre une interaction entre les effets animal et fertilisation azotée. Dans tous les cas il apparaît que pendant la première saison, le niveau de fertilisation azotée de 400kg/ha/an montre le plus haut niveau OEB alors qu'à la deuxième saison, le niveau de fertilisation azotée de 200kg/ha/an montre les valeurs OEB les plus basses pouvant même être légèrement négatives. Malgré la variabilité inter-animaux, il est clair que la fertilisation azotée de 200kg N/ha/an présente le meilleur équilibre azote-énergie.

**Table 25:** Effets de deux niveaux de fertilisation sur les valeurs OEB (g PB / jour) dans chaque mouton au début (saison 1) et à la fin (saison 2) de la saison de pâture (moyenne (et))(n=4)

Saison / mouton	niveau de fertilisation	E	F	G	H	moyenne (et) (n=16)
saison 1	400 N*	87.9 <sup>2</sup> (16.1)	148.7 <sup>2</sup> (19.7)	146.8 <sup>2</sup> (2.6)	128.6 <sup>2</sup> (16.2)	128.0 <sup>a</sup> (28.6)
	200 N*	2.3 <sup>1d</sup> (5.0)	26.6 <sup>1de</sup> (4.5)	65.7 <sup>1e</sup> (16.8)	62.6 <sup>1e</sup> (14.0)	39.3 <sup>b</sup> (29.0)
saison 2	400 N*	9.9 <sup>1</sup> (10.9)	22.0 <sup>1</sup> (3.7)	37.2 <sup>13</sup> (11.6)	15.1 <sup>3</sup> (8.8)	21.0 <sup>c</sup> (13.5)
	200 N*	0.4 <sup>1</sup> (12.3)	-4.0 <sup>1</sup> (5.6)	25.6 <sup>3</sup> (4.7)	0.7 <sup>4</sup> (1.7)	5.7 <sup>c</sup> (13.6)

\* kg N ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> ; 1, 2, 3 : pour chaque mouton, les moyennes avec des chiffres différents en exposant dans une même colonne diffèrent significativement (P< 0.05) ; a, b, c : dans la dernière colonne, les moyennes avec des lettres différentes diffèrent significativement ( P< 0.05) ; d, e: pour chaque traitement, les moyennes avec des lettres différentes en exposant dans une même ligne diffèrent significativement (P< 0.05)

### 3.2.5.2. Effets du niveau de fertilisation azotée sur la concentration en NH<sub>3</sub> dans le rumen

Les effets du niveau de fertilisation azotée sur la concentration en NH<sub>3</sub> dans le rumen sont rapportés dans tableau 26. Il ressort de ces résultats qu'il y a une interaction entre les effets animal et niveau de fertilisation. Dans toutes les saisons et pour tous les niveaux de fertilisations on a une concentration en ammoniac largement supérieure à la valeur de 50mg / l généralement acceptée comme valeur minimale pour une bonne croissance microbienne. Ceci montre qu'à aucun moment il y a un manque d'azote, confirmant ainsi les résultats de l'OEB (tableau 25). Au cours de chaque saison, c'est le niveau de fertilisation le plus élevé qui s'accompagne d'une concentration élevée en ammoniac.

**Table 26: Effets du niveau de fertilisation azotée sur la concentration en NH<sub>3</sub> dans le rumen (mmol l<sup>-1</sup>) de chaque mouton au début (saison 1) et à la fin (saison 2) de la saison de pâture (moyenne (et))(n=24)**

Saison / mouton	niveau de fertilisation	E	F	G	H	moyenne (et)(n=96)
saison 1	400 N*	12.2 <sup>2</sup> (1.9)	17.7 <sup>2</sup> (1.7)	15.1 <sup>2</sup> (3.4)	14.9 <sup>2</sup> (2.8)	15.0 <sup>b</sup> (3.5)
	200 N*	9.1 <sup>1d</sup> (0.5)	12.1 <sup>1e</sup> (0.9)	8.8 <sup>1d</sup> (1.3)	8.1 <sup>1d</sup> (1.3)	9.6 <sup>a</sup> (1.9)
saison 2	400 N*	15.5 <sup>3</sup> (2.5)	12.3 <sup>12</sup> (0.5)	11.8 <sup>1</sup> (1.9)	12.1 <sup>3</sup> (2.6)	13.3 <sup>c</sup> (1.9)
	200 N*	10.0 <sup>12d</sup> (2.1)	8.4 <sup>3f</sup> (1.0)	9.4 <sup>1de</sup> (1.6)	8.8 <sup>1ef</sup> (1.7)	9.2 <sup>a</sup> (1.0)

\* kg N ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> ; 1, 2, 3 : pour chaque mouton, les moyennes avec des chiffres différents en exposant dans une même colonne diffèrent significativement (P< 0.05) ; a, b, c : dans la dernière colonne, les moyennes avec des lettres différentes diffèrent significativement ( P< 0.05) ; d, e, f: pour chaque traitement, les moyennes avec des lettres différentes en exposant dans une même ligne diffèrent significativement (P< 0.05)

### **3.2.5.3. Effets du niveau de fertilisation azotée sur la concentration en $\text{NH}_3$ dans le rumen**

Les effets du niveau de fertilisation azotée sur la quantité d'azote ingérée, l'azote uréique excrété dans les urines ainsi que l'azote excrété dans les faeces par chaque mouton sont rapportés dans le tableau 27. Au cours des deux saisons, comparé à 200kg N/ha/an, le niveau de fertilisation de 400kg N/ha/an montre une plus grande quantité d'azote ingéré, une excrétion d'azote dans les urines plus élevée. Par contre, les changements de l'azote éliminé dans les urines ne sont pas claires. Comme pour les autres paramètres, l'analyse de variance montre une interaction entre les facteurs animal et fertilisation azotée pour les paramètres cités. Ces interactions sont en grande partie dues à la différence entre animaux quant au niveau d'ingestion.

**Tableau 27: Effets du niveau de fertilisation azotée sur la quantité d'azote ingérée, (g N jour<sup>-1</sup>), l'azote uréique excrété dans les urines (g N jour<sup>-1</sup>) l'azote excrété dans les faeces (g N jour<sup>-1</sup>) par chaque mouton au début (saison 1) et à la fin (saison 2) de la saison de pâture (moyenne (et))(n=4)**

Saison / niveau de mouton	paramètres	E	F	G	H	moyenne (et) (n=16)	
saison 1 400 N*	N-ingéré	37.8 (11.7)	52.3 <sup>2</sup> (2.2)	54.3 <sup>2</sup> (2.5)	58.0 <sup>2</sup> (3.0)	50.6 <sup>b</sup> (9.7)	
	N uréique	20.8 (6.2)	34.0 <sup>2</sup> (9.1)	26.9 <sup>1</sup> (2.5)	38.6 <sup>1</sup> (5.5)	30.1 <sup>b</sup> (9.0)	
	N fécal	6.4 (0.7)	7.9 (1.6)	10.6 (0.5)	10.6 (0.6)	8.7 <sup>b</sup> (2.8)	
	200 N*	N-ingéré	13.4 <sup>d</sup> (4.3)	32.5 <sup>1e</sup> (2.6)	39.0 <sup>1ef</sup> (1.1)	41.6 <sup>1f</sup> (1.1)	31.6 <sup>a</sup> (11.6)
	N uréique	10.4 <sup>d</sup> (2.6)	11.2 <sup>1d</sup> (4.2)	23.6 <sup>1e</sup> (4.4)	27.4 <sup>12f</sup> (2.7)	18.1 <sup>a</sup> (8.4)	
	N fécal	3.3 <sup>d</sup> (1.1)	6.5 <sup>e</sup> (0.9)	8.3 <sup>ef</sup> (1.4)	9.5 <sup>f</sup> (1.3)	6.9 <sup>a</sup> (2.6)	
saison 2 400 N*	N-ingéré	26.2 <sup>d</sup> (1.6)	24.6 <sup>13d</sup> (6.0)	36.9 <sup>13e</sup> (2.8)	38.4 <sup>13e</sup> (1.0)	30.2 <sup>a</sup> (6.1)	
	N uréique	8.9 (5.0)	11.5 <sup>1</sup> (3.3)	11.9 <sup>2</sup> (3.9)	12.9 <sup>2</sup> (6.3)	11.3 <sup>c</sup> (4.5)	
	N fécal	5.6±1.3	4.5±2.2	8.6±2.1	8.8±3.0	7.1 ± 2.7 <sup>a</sup>	
	200 N*	N-ingéré	18.8 <sup>d</sup> (0.7)	21.2 <sup>3d</sup> (1.3)	30.9 <sup>3e</sup> (0.2)	31.5 <sup>3e</sup> (0.8)	24.2 <sup>c</sup> (5.7)
	N uréique	4.7 (2.5)	5.1 <sup>1</sup> (2.8)	9.2 <sup>2</sup> (4.0)	12.2 <sup>2</sup> (4.8)	7.8 <sup>c</sup> (4.5)	
	N fécal	5.6 <sup>d</sup> (0.7)	7.4 <sup>e</sup> (1.3)	9.9 <sup>f</sup> (1.1)	10.0 <sup>f</sup> (0.8)	7.8 <sup>b</sup> (2.1)	

\* kg N ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> ; <sup>1, 2, 3</sup> : pour chaque mouton, les moyennes avec des chiffres différents en exposant dans une même colonne diffèrent significativement (P< 0.05) ; <sup>a, b, c</sup> : dans la dernière colonne, les moyennes avec des lettres différentes diffèrent significativement ( P< 0.05) ; <sup>d, e, f</sup> pour chaque traitement, les moyennes avec des lettres différentes en exposant dans une même ligne diffèrent significativement (P< 0.05)



### 3.2.5.4. Effets du niveau de fertilisation azotée sur la croissance microbienne

Le tableau 28 montre les effets du niveau de fertilisation azotée sur la croissance microbienne. Au cours de chaque saison, la croissance microbienne ne diffère pas entre les deux niveaux de fertilisation. Cela est due au fait que le niveau de fertilisation élevé (400kg/ha/an) entraîne une excrétion d'azote plus élevée (tableau 26) et que le niveau de fertilisation faible (200kg/ha/an) n'entraîne aucun manque d'azote dans le rumen (tableau 27).

**Tableau 28:** Effets du niveau de fertilisation azotée sur la croissance microbienne (mmol PD kg<sup>-1</sup> FOM) dans le rumen de chaque mouton au début (saison 1) et à la fin (saison 2) de la saison de pâture (moyenne (et))(n=4)

Saison / mouton	niveau de fertilisation	E	F	G	H	moyenne (et) (n=16)
saison 1	400 N*	20.6 (3.1)	26.4 <sup>3</sup> (3.0)	23.7 <sup>2</sup> (6.8)	22.2 (4.8)	23.5 <sup>b</sup> (5.2)
	200 N*	17.1 <sup>d</sup> (1.4)	14.9 <sup>1d</sup> (0.6)	26.7 <sup>1e</sup> (2.4)	22.9 <sup>f</sup> (5.8)	21.5 <sup>ab</sup> (6.8)
saison 2	400 N*	20.0 <sup>d</sup> (3.3)	28.0 <sup>3e</sup> (6.9)	16.6 <sup>3f</sup> (1.7)	14.4 <sup>f</sup> (1.0)	21.0 <sup>ac</sup> (6.7)
	200 N*	16.5 <sup>d</sup> (5.0)	22.8 <sup>2e</sup> (2.0)	19.8 <sup>23f</sup> (0.7)	18.9 <sup>f</sup> (1.5)	19.5 <sup>c</sup> (3.8)

\* kg N ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> ; <sup>1, 2, 3</sup> : pour chaque mouton, les moyennes avec des chiffres différents en exposant dans une même colonne diffèrent significativement (P< 0.05) ; <sup>a, b, c</sup> : dans la dernière colonne, les moyennes avec des lettres différentes diffèrent significativement ( P< 0.05) ; <sup>d, e, f, g</sup> : pour chaque traitement, les moyennes avec des lettres différentes en exposant dans une même ligne diffèrent significativement (P< 0.05)

### 3.2.6. Effets de la supplémentation et du système de supplémentation sur l'utilisation de l'azote alimentaire

#### 3.2.6.1. Effets de la supplémentation sur l'efficacité d'utilisation de l'azote

Les effets de la supplémentation d'un fourrage fertilisé avec 400kg N/ha/an avec de l'ensilage de maïs sur les valeurs OEB (g PB / jour) sont rapportés dans le tableau 29. Malgré l'interaction des effet animal et supplémentation quant aux valeurs OEB, les résultats montrent que la supplémentation entraîne une diminution des valeurs OEB de 85% en moyenne.

**Tableau 29:** Effets de la supplémentation avec de l'ensilage de maïs d'un fourrage fertilisé avec 400kgN/ha/an sur les valeurs OEB (g PB / jour) (moyenne (et))(n=4)

Ration / mouton	E	F	G	H	moyenne (et) (n=16)
non-supplémentée	87.9 (16.1)	148.7 (19.7)	146.8 (2.6)	128.6 (16.2)	128.0 (28.6)
supplémentée	14.0* (3.0)	19.3* (3.7)	20.6* (5.9)	21.1* (2.1)	19.2 <sup>+</sup> (4.8)

\* différence significative entre les deux traitements pour chaque mouton (P < 0.05)

<sup>+</sup> différence significative entre les deux traitements pour les quatre moutons (P < 0.05)

Les effets de la supplémentation sur la concentration en NH<sub>3</sub> dans le rumen sont consignés dans le tableau 30. En moyenne, la supplémentation a diminué la concentration en ammoniac de 11%.

**Tableau 30: Effets de la supplémentation sur la concentration en NH<sub>3</sub> dans le rumen (mmol l<sup>-1</sup>) de chaque mouton (moyenne (et)) (n=48)**

Ration / mouton	E	F	G	H	moyenne (n=192)
non-supplémentée	12.2 (1.9)	17.7 (1.7)	15.1 (3.4)	14.9 (2.8)	15.0 (3.5)
supplémentée	11.2 <sup>a</sup> (3.2)	16.8 <sup>c</sup> (3.2)	12.3 <sup>*ab</sup> (3.3)	13.9 <sup>b</sup> (2.6)	13.3 <sup>+</sup> (2.8)

\* différence significative entre les deux traitements pour chaque mouton ( $P < 0.05$ ) ; <sup>+</sup> différence significative entre les deux traitements pour les quatre moutons ( $P < 0.05$ ) ; <sup>a, b, c</sup> : les moyennes portant des lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ( $P < 0.05$ )

La diminution des valeurs OEB présentée dans le tableau 29, combinée à la diminution de la concentration en azote ammoniacal dans le rumen rapportée dans le tableau 30 traduisent une meilleure utilisation de l'azote excédentaire généré par l'herbe riche en protéines mais pauvre en énergie suite à l'ensilage de maïs donné en supplément. Cet ensilage riche en énergie et pauvre en protéines assure l'équilibre énergie-azote de la ration. Cela se traduit par une diminution des rejets d'azote dans les urines comme le montre le tableau 31. En effet, en tenant compte de la quantité d'azote ingérée, 59% de l'azote est perdue dans les urines en cas de non supplémentation alors que ce pourcentage n'est que de 39% en cas d'apport d'ensilage de maïs dans la ration.

**Tableau 31: Effets de la supplémentation sur la quantité d'azote ingérée, (g N jour<sup>-1</sup>), l'azote uréique excrété dans les urines (g N jour<sup>-1</sup>) l'azote excrété dans les faèces (g N jour<sup>-1</sup>) par chaque mouton au début (saison 1) et à la fin (saison 2) de la saison de pâture (moyenne (et))(n=4)**

Ration	mouton	E	F	G	H	moyenne (n=16)
non-supplémentée	N-ingéré	37.8* (11.7)	52.3* (2.2)	54.3* (2.5)	58.0* (3.0)	50.6 <sup>+</sup> (9.7)
	N uréique	20.8* (6.2)	34.0* (9.1)	26.9* (2.5)	38.6* (5.5)	30.1 <sup>+</sup> (9.0)
	N fécal	6.4* (0.7)	7.9 (1.6)	10.6* (0.5)	10.6 (0.6)	8.7 (2.8)
supplémentée	N-ingéré	21.0 <sup>a</sup> (0.1)	28.4 <sup>b</sup> (0.1)	33.9 <sup>c</sup> (0.1)	35.1 <sup>d</sup> (0.2)	29.6 (5.7)
	N uréique	6.8 (2.1)	12.9 (4.7)	12.7 (4.1)	13.8 (6.0)	11.5 (5.1)
	N fécal	4.8 <sup>a</sup> (0.5)	7.0 <sup>b</sup> (0.9)	7.0 <sup>b</sup> (1.0)	8.5 <sup>c</sup> (1.5)	6.8 (1.6)

\* différence significative entre les deux traitements pour chaque mouton ( $P < 0.05$ ) ; <sup>+</sup> différence significative entre les deux traitements pour les quatre moutons ( $P < 0.05$ ) ; <sup>a, b, c</sup> : les moyennes portant des lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ( $P < 0.05$ )

Comme le montre le tableau 32, la supplémentation avec de l'ensilage de maïs n'a pas augmenté significativement le rendement de la croissance microbienne.

### 3.2.6.2. Effets du système de supplémentation sur l'utilisation de l'azote alimentaire

Comme le montre les tableaux 32, 33 et 34, il n'y a pas d'effet claire de la synchronisation ni sur les valeurs OEB, ni sur la concentration ammoniacale ni sur le rendement de la croissance microbienne ou la balance azotée.

**Tableau 32: Effets de la supplémentation sur le rendement de la croissance microbienne (mmol PD kg<sup>-1</sup> FOM) dans le rumen de chaque mouton au début (saison 1) et à la fin (saison 2) de la saison de pâture (moyenne (et))(n=4)**

Ration / mouton	E	F	G	H	moyenne (n=16)
non-supplémentée	20.6 (3.1)	26.4 (3.0)	23.7 (6.8)	22.2 (4.8)	23.5 (5.2)
supplémentée	17.5 (2.8)	23.3 (5.8)	25.6 (8.5)	16.8 (4.8)	21.0 (6.8)

**Tableau 33: Effets de la stratégie de supplémentation sur la MS ingérée, les valeurs OEB (g PB / jour), la concentration en NH<sub>3</sub> dans le rumen (mmol l<sup>-1</sup>) ainsi que sur le rendement de la croissance microbienne (mmol PD kg<sup>-1</sup> FOM) dans le rumen de chaque mouton**

Stratégie de supplémentation	MS ingérée (n=24)	valeur OEB (n=16)	concentration en NH <sub>3</sub> -dans le rumen (n=192)	rendement de la croissance microbienne (n=16)
synchrone	1.40 (0.27)	20.6 (4.7)	12.8* (2.9)	19.8 (7.9)
asynchrone	1.39 (0.27)	17.5 (4.2)	14.3 (2.4)	21.9 (5.9)

\* différence significative entre les deux stratégies de supplémentation (P< 0.05)

**Tableau 34: Effets de la stratégie de supplémentation sur la quantité d'azote ingérée, (g N jour<sup>-1</sup>), l'azote uréique excrété dans les urines (g N jour<sup>-1</sup>) l'azote excrété dans les faeces (g N dag<sup>-1</sup>) (moyenne (et))(n=16)**

Stratégie de supplémentation	N-ingéré	N-urinaire	N fécal
synchrone	29.6* (5.8)	12.3 (5.9)	6.9 (1.7)
asynchrone	29.2 (5.7)	10.7 (4.2)	6.5 (1.7)

\* différence significative entre les deux stratégies de supplémentation (P< 0.05)

L'absence d'effet de la synchronisation sur l'utilisation de l'azote déjà observé pour les émissions de méthane est due probablement à la lente dégradation de l'ensilage faisant équivaloir les deux stratégies de supplémentsations (synchronisée et non synchronisée).

## IV. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

### 4.1. Première année expérimentale (1999)

La méthode de mesure des émissions de méthane que nous avons développée au cours des deux années qu'a duré le projet donne des **résultats comparables avec ceux obtenus par d'autres auteurs utilisant des méthodes plus complexes et plus chères**. Néanmoins, des ovins ont été utilisés comme animal modèle à la place des bovins sur pâturage à cause du coût élevé et des difficultés d'entretien et de manipulation des ces derniers. Les animaux ont été maintenus en cage métabolique afin de collecter en plus des gaz, les fèces, les urines et le jus du rumen ainsi que de la nécessité d'évaluer en même temps la digestibilité *in sacco* et la digestibilité apparente totale. Pour simuler les conditions du pâturage, l'herbe a été distribuée fraîche (1999) ou après séchage doux (2000), en 4 portions et les émissions de méthane sont exprimées par kg de matière sèche ingérée.

Au cours de la première année (1999), la fertilisation azotée (150kg N / ha / an) d'un pâturage mixte (ray grass/trèfle) a entraîné une augmentation de la biomasse végétale produite / ha, une augmentation de la proportion du ray grass au détriment du trèfle sans changement significatif du taux de protéines dans l'herbe. L'ampleur de ces changements dépend de la saison. Comparée à la fin de l'été, le début de la saison estivale correspondant au début de la période de pâture, la production de la biomasse végétale est plus élevée quel que soit le niveau de fertilisation. La fertilisation azotée entraîne une augmentation de la biomasse végétale sans augmentation du taux de protéines brutes. A la fin de l'été, même si la fertilisation azotée entraîne une augmentation de la production végétale, celle-ci reste faible et les taux de protéines brutes sont plus élevés qu'en début de saison. La valeur des protéines brutes dégradées dans le rumen en comparaison avec la matière sèche dégradée donne une indication du surplus de l'azote par rapport à l'énergie. Au cours de nos expériences, il a été mis en évidence que le surplus d'azote (>165 g de protéines incorporées par kg de matière sèche dégradée) est plus important dans la deuxième saison que dans la première quel que soit le niveau de fertilisation. Il est à noter qu'aucun traitement dans n'importe quelle saison ne provoque vraiment un manque d'azote pour la croissance des microbes ruminants. **De tout ce qui précède, on peut conclure que l'efficacité d'utilisation d'azote est plus faible à la fin qu'au début de l'été aussi bien en en terme de**

**production de la biomasse végétale par le pâturage qu'en terme d'utilisation de l'azote par l'animal. Pour un même niveau de fertilisation, il est recommandé d'utiliser la plus grande partie du fertilisant au début plutôt qu'à la fin de l'été.**

Nos résultats n'ont montré aucun effet de la fertilisation azotée sur les émissions de méthane. A la place de l'effet de la fertilisation azotée, un effet animal significatif a été observé, un animal produisant 26% moins de méthane que les trois autres. La variabilité inter-animal pour les émissions de méthane avait déjà été rapportée et certains auteurs estiment qu'elle est d'origine génétique et qu'elle reflète la population microbienne présente dans le rumen de chaque animal. **Ainsi donc, pour une diminution durable des émissions de méthane issues des élevages, on pourrait envisager la possibilité de sélectionner les animaux produisant moins de méthane. Néanmoins, des études approfondies préalables sur l'héritabilité de ce caractère sont nécessaires.**

#### **4.2. Deuxième année expérimentale (2000)**

Comparée à 200kg N/ha/an, le niveau de fertilisation de 400kg N/ha/an d'un pâturage de ray grass a pratiquement doublé la biomasse végétale produite / ha et a augmenté le taux de protéines dans l'herbe aussi bien au début qu'à la fin de l'été. Comme observé précédemment (1999) avec un pâturage mixte, **l'efficacité d'utilisation de l'azote pour la fixation du carbone et donc la production de la biomasse végétale est beaucoup plus élevée au début qu'à la fin de l'été.**

Il n'y a pas d'effet du niveau de fertilisation azotée sur les émissions de méthane. La différence observée est le résultat d'une corrélation négative entre les émissions de méthane et le niveau d'ingestion confirmée ici et qui avait déjà été soulignée par d'autres auteurs. En effet, un niveau d'ingestion élevé entraîne un déplacement de la digestion du rumen vers le gros intestin. Cela est bénéfique pour les productions animales et l'environnement car, lors de la digestion fermentative dans le gros intestin, il y a une diminution des émissions de méthane étant donné qu'une partie de l'hydrogène et du gaz carbonique qui devraient générer du méthane est transformée en acétate, substance très riche en énergie. Néanmoins, il faut que la diminution de la digestion dans le rumen soit compensé par une augmentation de la digestion dans le gros intestin. Si du point de vue énergétique la digestion fermentative est bénéfique pour l'animal, il n'en est pas de même du point de vue protéique car, les protéines microbiennes issues du gros intestin sont



éliminées dans les fèces. Néanmoins, il faut noter que cette azote organique sera mieux utilisé dans le sol que l'azote inorganique (urée) qui résulte de la dégradation des protéines dans le rumen. **Nos expériences avec les moutons montrent clairement que les émissions de méthane diminuent avec l'augmentation du niveau d'ingestion d'où la suggestion que les animaux ayant une plus grande capacité d'ingestion entraîneront certainement moins de pollutions par le méthane et par unité de production (lait, viande, ...). Etant donné les différences anatomo-physiologiques entre les bovins et les ovins, il serait intéressant de vérifier si cette hypothèse est valable chez les bovins qui constituent par ailleurs le gros du cheptel ruminant Belge.**

Nos résultats ne montrent aucune différence significative entre la supplémentation synchronisée et non synchronisée quant aux émissions de méthane. L'absence d'effet du système de supplémentation sur les émissions de méthane est probablement due à la **dégradabilité lente de l'ensilage de maïs faisant équivaloir les deux modes de supplémentation (synchronisée et non synchronisée).**

#### **4.3. Première et deuxième années expérimentales (1999 et 2000)**

Contrairement à notre hypothèse de départ, les résultats de ce projet démontrent clairement que la fertilisation azotée d'un pâturage n'entraîne pas une diminution des émissions de méthane. Des facteurs liés à l'animal: le niveau d'ingestion, les conditions chimiques dans le rumen sont beaucoup plus importants que la fertilisation. Dans tous les cas, que ça soit avec un pâturage mixte (ray grass/trèfle) ou pas (ray grass), la fertilisation azotée entraîne une augmentation des émissions de méthane / ha étant donné l'augmentation de la production de la biomasse par ha consécutive à la fertilisation azotée, sans effet sur les émissions de méthane par kg d'herbe ingérée. Les effets de l'animal et du niveau d'ingestion observés dans ces expériences montrent que **les estimations des émissions de méthane faites par l'IPCC pourraient être améliorées en incorporant le facteur animal et niveau d'ingestion dans un modèle. S'agissant de fertilisation azotée, une attention particulière devrait être portée surtout sur l'équilibre entre la production de matière sèche et les excréments d'azote dans l'environnement.**

## **V. ANNEXE**

## 5.1. Bibliographie

**Association of Official Analytical Chemists 1980.** Official method of analysis. 13<sup>th</sup> ed. AOAC, Washington, DC.

**Barthram, G.T., Grant, S.A. and Elston, D.A. 1992.** The effect of sward height and nitrogen fertiliser application on changes in sward composition, white clover growth and the stock carrying capacity of an upland perennial ray grass/white clover sward grazed by sheep for four years. *Grass and forage Sci.* **47** : 326-341.

**Blaxter, K.L. and Clapperton, J.L. 1965.** Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *Br. J. Nutr.* **19** : 511-522.

**Broudiscou, L., Van Nevel, C.J. and Demeyer, D.I. 1990.** Incorporation of soya oil hydrolysate in the diet of defaunated or refaunated sheep : effect on rumen fermentation *in vitro*. *Arch. Tierernahr.* **40** : 329-337.

**Carlier, L., Limbourg, P., Behaeghe, T., Toussaint, B. and Andries, A. 1981.** Exploitation des prairies 2. La fertilisation d'azote comme facteur quantitatif et qualitatif d'herbe. *Revue de l'Agriculture.* **34**, 479-490.

**Chalupa, W., Corbett, W. and Brethour, J.R. 1980.** Effect of monensin and amichloral on rumen fermentation. *J. Anim. Sci.* **51** : 170-179.

**Clapperton, J.L. 1974.** The effect of trichloroacetamide chloroform and linseed oil given into the rumen of sheep on some of the end products of rumen digestion. *Br. J. Nutr.* **32** : 155-161.

**Cone, J.W. and Van Gelder, A.H. 1999.** Influence of protein fermentation on gas production profiles. *Anim. Feed Sci. Technol.* **76** : 251-264.

**Demeyer, D.I. 1991.** Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and hindgut. Pages 217-237 *in* , J.P. Jouany, ed., *Rumen Microbial Metabolism and Rumen Digestion*. INRA Editions, Paris, Cedex.

**Demeyer, D.I. and De Graeve, K. 1991.** Differences in stoichiometry between rumen and hindgut fermentation. *Adv. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **22** : 50-61.

**Demeyer, D. and Van Nevel C. 1979.** Protein fermentation and growth by rumen microbes. *Ann. Rech. Vét.* **10** : 277-279.

- Demeyer, D. and Van Nevel C. 1987.** Chemical manipulation of rumen metabolism. In “Physiological and pharmacological aspects of the reticulo-rumen ” eds. L.A.A. Ooms, A.D. Degryse & A.S.J.P.A.M. van Miert, pp. 227-251, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 1987.
- Demeyer, D., Fiedler, D. and De Graeve, K. 1996.** Attempted induction of reductive acetogenesis into the rumen fermentation *in vitro*. *Reprod. Nutr. Develop.* **49** : 233-240.
- De Smet, S., Demeyer, D. 1992.** Dégradabilité *in sacco* : variabilité entre animaux. *Ann. Zoot.* **41** : 21-22.
- Frame, J. and Newbould, P. 1986.** Agronomy of white clover. *Adv. Agron.* **40** : 1-88.
- Gabriëls, R., Engels, E. and Van Keirsbulk, W., 1984. Crop fertilisation by computer aided soil testing. Vth international colloquium for optimisation of plant nutrition. *Actes proceedings* : vol. 3 pp 893-897.
- Geurink, J. H., Malestein, A., Kemp, A., Korzenioski, A. and Van't Klooster, A. Th. 1982.** Nitrate poisoning in cattle. 7. Prevention. *Neth. J. agric. Sci.* **30** : 105-113.
- Höglind, M. and Frankow-Lindberg, B. 1998.** Growing point dynamics and spring growth of white clover in a mixed sward and the effects of nitrogen application. *Grass and Forage Sci.* **53** : 338-345.
- Immig, I., Fiedler, D., Van Nevel, C. and Demeyer, D.I. 1995.** Inhibition of methanogenesis in the rumen of a sheep with BES. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* **4** : 68.
- Immig, I., Demeyer, D.I., Fiedler, D., Van Nevel, C. and Mbanzamihigo, L. 1997.** Attempts to induce reductive acetogenesis into a sheep rumen. *Arch. Anim. Nutr.* **49** : 363-370.
- Intergovernmental Panel on Climate Change. 1996.** Technologies, policies and measures for mitigating climate change : IPCC, technical paper 1. 99 pp.
- Judd, M.J., Kellier, F.M., Ulyatt, M.J., Lassey, K.R., Tate, K.R., Shelton, D., Harvey, M.J. and Walker, C.F. 1999.** Net methane emissions from grazing sheep. *Global change biol.* **5** : 647-657.
- Kessler, J. and Jolidon, V. 1998.** Teneur en minéraux de l'herbe en fonction de la fumure azotée et de l'intensité d'utilisation. *Revue suisse Agric.* **30** : 79-83.

- Kirchgeßner, M., Windisch, W. and Müller, H.L. 1995.** Nutritional factors for the quantification of methane production. : Proc. of the 8<sup>th</sup> International Symposium on Ruminant Physiology in Institut für Ernährungsphysiologie Technische Universität München-Weihenstephan Freising, Germany.
- Kowalczyk, J., Orskov, E.R., Robison, J.J. and Stewart, C.S. 1977.** Effect of fat supplementation on voluntary food intake and rumen metabolism in sheep. Br. J. Nutr. **37** : 251-257.
- Kurihara, M., Magner, T., Hunter, R.A. and McCrabb, G.J. 1999.** Methane production and energy partitioning of cattle in the tropics. Br. J. Nutr. **81** : 227-234.
- Kyoto protocol, 1997.** Kyoto protocol to the united nations framework convention on climate change. 11<sup>th</sup> December 1997, Kyoto, Japan. [www.unfccc.de/](http://www.unfccc.de/).
- Lajoie, S.F., Bank, S., Miller, T.L. and Wolin, M.J. 1988.** Acetate production from hydrogen and [C-13] carbon dioxide by the microflora of human faeces. Appl. Environ. Microbiol. **54** : 2723-2727.
- Lana, R.P., Russel, J.B. and Van Amburgh, M.E. 1998.** The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. J. Anim. Sci. **76** : 2190-2196.
- Lassey KR, Ulyatt MJ, Martin RJ, Walker CF, Shelton D. 1997.** Methane emissions measured directly from grazing livestock in New Zealand. Atm. Envir. **31** : 2905-2914.
- Machmuller, A., Ossowski, D.A., Wanner, M. and Kreuzer, M. 1998.** Potential of various fatty feeds to reduce methane release from rumen fermentation *in vitro* (Rusitec). Anim. Feed Sci. Technol. **77** : 117-130.
- Martin, S.A. and Streeter, M.N. 1995.** Effect of malate on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation. J. Anim. Sci. **73** : 2141-2145.
- Martin, C., Rochette, Y., Fabre, M. and Jouany, J.P. 2000.** Influence of cereal supplementation on methane production by sheep measured by the SF<sub>6</sub> tracer method. Reprod. Nutr. Dev. **40** : 211.
- Mbanzamihiogo, L., Van Nevel, C.J. and Demeyer, D.I. 1995.** Essai d'adaptation de la fermentation ruminale au monensin. Reprod. Nutr. Dev. **35** : 353-365.

- Mbanzamihigo, L., Van Nevel, C.J. and Demeyer, D.I. 1996.** Lasting effects of monensin on rumen and caecal fermentation in sheep fed high grain diet. *Anim. Feed Sci. Technol.* **28** : 215-228.
- McCaughey, W.P., Wittenberg, K. and Corrigan, D. 1997.** Impact of pasture type on methane production by lactating beef cows. *Can. J. Anim. Sci.* **79** : 221-226.
- McLeod, N.A., Orskov, E.R. and Atkinson, T. 1984.** The effect of pH on the relative proportions of ruminal volatile fatty acids in sheep sustained by intragastric infusions. *J. Agric. Sci. Camb.* **103** : 459-462.
- Moate, P.J., Clarke, T., Davis, L.H. and Laby, R.H. 1997.** Rumen gases and bloat in grazing dairy cows. *J. Agric. Sci., Camb.* **129**: 459-469.
- Murray, R.M., Bryant, A.M. and Leng, R.A. 1976.** Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. *Br. J. Nutr.* **36**: 1-14.
- Nollet, L., Mbanzamihigo, L., Demeyer, D. and Verstraete, W. 1998.** Effect of the addition of *Peptostreptococcus productus* ATCC 35244 on reductive acetogenesis in the ruminal ecosystem after inhibition of methanogenesis by cell-free supernatant of *Lactobacillus plantarum* 80. *Anim. Feed Sci. Technol.* **71**: 49-66.
- Okine, E.K., Mathison, G.W. and Hardin, R.T. 1989.** Effects of changes in frequency of reticular contractions on fluid and particulate passage rates in cattle. *J. Anim. Sci.*, **67**: 3388-3396.
- Organisation for Economic Co-operation and Development 1998.** Agricultural practices to reduce greenhouse gas emissions : overview and survey instruments. COM / ENV / POC / AGR / CA (98) 149.
- Orskov, E.R. and McDonald, I. 1979.** The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci., Camb.* **92** : 499-503.
- Peyraud, J.L. 1993.** Comparaison de la digestion du trèfle blanc et des graminées prairiales chez la vache laitière. *Fourrages.* **135** : 465-473.
- Reid, D. 1970.** The effects of a wide range of nitrogen application rates on the yields from a perennial ray grass sward with and without clover. *J. Agric. Sci., Camb.* **74** : 227-240.

- Rodhe, H. 1990.** A comparison of the contribution of various gases to the greenhouse effect. *Science*. **243** : 1217-1219.
- Russel, J.B. and Martin, S.A. 1984.** Effect of various methane inhibitors on the fermentation of amino acids by mixed rumen micro-organisms *in vitro*. *J. Anim. Sci.* **59** : 1329-1338.
- Salaün, C., van Straalen, W., Kogut, J., Peyraud, J.-L. and Van Vuuren, A. M. 1999.** *In situ* degradation of perennial ray grass from grazed pastures during the season at two levels of nitrogen fertilisation. *Ann. Zootech.* **48** : 35-45.
- Schils, R.L.M. 1997.** Effect of a spring application of nitrogen on the performance of perennial ray grass-clover swards at two sites in the Netherlands. *Neth. J. of Agric. Sci.* **45** : 263-275.
- Schwank, O., Blum, H. and Nösberger, J. 1986.** The influence of irradiance distribution on the growth of white clover (*Trifolium repens* L.) in differently managed canopies of permanent grassland. *Ann. Bot.* **57** : 273-281.
- Shibata, M., Terada, F., Kurihara, M., Nishida, T. and Iwasaki, K., 1993.** Estimation of methane production in ruminants. *Anim. Sci. Technol. (Jpn)* **64**, 790-796.
- Sinclair, L.A., Garnsworthy, P.C., Newbold, J.R. and Buttery, P.J. 1993.** Effect of synchronizing the rate of dietary energy and nitrogen release on rumen fermentation and microbial protein synthesis. *J. Agric. Sci., Cambridge*, **120**, 251-263.
- Sinclair, L.A., Garnsworthy, P.C., Newbold, J.R. and Buttery, P.J. 1995.** Effect of synchronizing the rate of dietary energy and nitrogen release in diets with asimilar carbohydrate composition on rumen fermentation and microbial protein synthesis. *J. Agric. Sci., Cambridge*, **124**, 463-472.
- Steg, A., Van Straalen, W.M., Wensink, W.A., Dooper, F.M.H. and Schils, R.L.M. 1994.** Rumen degradation and intestinal digestion of grass and clover at two maturity levels during the season in dairy cows. *Grass Forage Sci.* **49** : 378-390.
- Udén, P., Colucci, P. E. and Van Soest, P.J. 1980.** Investigation of Chromium, Cerium and Cobalt as Markers in Digesta. Rate of Passage Studies. *J. Sci. Food Agric.* **31** : 625-632.
- Ulyatt, M.J., Baker, S.K., McCrabb, G.J. and Lassey, K.R. 1999.** Accuracy of SF<sub>6</sub> technique and alternatives for field measurements. *Austr. J. Agric. Res.* **50** : 1229-1334.

**Van Nevel, C.J., Demeyer , D.I. and Henderickx, H.K. 1970a.** Effect of chlorinated analogues on methane and propionic acid production in the rumen *in vitro*. Med. Fac. Landbouw. Univ. Gent. **25** : 145-152.

**Van Nevel, C.J., Demeyer , D.I., Henderickx, H.K. and Martin, J.A. 1970b.** A simple method for the simultaneous determination of gas production and volatile fatty acid concentration in the rumen. Zeitschr. Tierphys. Tierernähr. Futtermittelk. **26** : 91-100.

**Van Nevel, C.J. and Demeyer, D.I. 1977.** Effect of monensin on rumen metabolism in vitro. Appl. Environ. Microbiol. **34** : 251-257.

**Van Nevel, C.J. and Demeyer, D.I. 1992.** Influence of antibiotics and a desaminase inhibitor on volatile fatty acid production from detergent washed hay and soluble starch by rumen microbes in vitro. Anim. Feed Sci. Technol. **37** : 21-31.

**Van Nevel, C.J. and Demeyer, D.I. 1996.** Control of rumen methanogenesis. Environ. Monit. Assess. **42** : 73-97.

**Witt, M.W., Sinclair, L.A., Wilkinson, R.G. and Buttery, P.J., 1999.** Effect of synchronizing the rate of dietary energy and nitrogen supply to the rumen on the metabolism and growth of ram lambs given food at a restricted level. Anim. Sci., **69**, 627-636.

**Wolin, M.J. 1960.** A theoretical rumen fermentation balance. J. Dairy Sci. **43** : 1452-1459.



## 5.2. Publications et communications découlant de la recherche

1. Dragomir, C., Fievez, V., Mbanzamihigo, L., Carlier, L. and Demeyer, D., 2001. The effects of saponins on in vitro methane production and fermentation pattern of rumen contents. *Proceedings of the 26th Studiedag Nederlandstalige Voedingsonderzoekers*, 06 April 2001, Centre de Recherche Agricole de Gand, Belgique, 50-51.
2. Fievez, V., Mbanzamihigo, L., Da Costa Gomez, C., Parera, J., Piattoni, F., Carlier, L. and Demeyer, D., 2001. Effect of forage clover content on rumen methanogenesis and microbial N utilisation in sheep. *Grassland Science in Europe* (accepté).
3. Fievez, V., Mbanzamihigo, L. and Demeyer, D., 2000. Optimizing rumen function as a contribution to pollution control. *Med. Fac. Landbouw. Univ. Gent*, 65/4,2000, 3-8.
4. Fievez, V., Mbanzamihigo, L., Demeyer, D. and Carlier, L., 2001. Effecten van stikstofbemesting van weiden en van bijvoeding op methanemissie en stikstofbenutting door herkauwers. Wetenschappelijke ondersteuning van het beleid in België inzake klimaatsverandering en troposferische ozon. Lessen uit de onderzoeksprojecten voor de beleidsondersteuning, 5 maart 2001, Brussel.
5. Fievez, V., Parera, Mbanzamihigo, L., Carlier, L. and Demeyer, D., 2000. Beoordeling van de efficiëntie van het N-gebruik door grazende herkauwers op grass-klaverantsoenen met verschillende bemestingsniveaus. *Proceedings of the 25th Studiedag Nederlandstalige Voedingsonderzoekers*, 28 April 2000, University of Wageningen, Netherlands, 8-9.
6. Fievez, V., Parera, J., Mbanzamihigo, L. and Demeyer, D., 2000. Effet de la composition botanique et du niveau de fertilisation sur l'efficacité de l'utilisation de l'azote par du bétail sur pâturage. *Les actes du 5<sup>me</sup> Carrefour des Productions Animales "Quels systèmes de Productions Animales pour le 21<sup>me</sup> Siècle ?"*, 26 Janvier 2000, Gembloux, Belgique, 40-42.
7. Mbanzamihigo, L., Da Costa Gomez, C., Fievez, V., Piattoni, F., Carlier, L. and Demeyer, D., 2000. Effects of N fertilisation on sward composition and CH<sub>4</sub> production: importance of animal effects. *Reproduction. Nutrition. Développement.*, 40 (2), 210.
8. Mbanzamihigo, L., Da Costa Gomez, C., Fievez, V., Piattoni, F., Carlier, L. and Demeyer, D., 2000. Nitrogen fertilisation effects on sward composition and CH<sub>4</sub> production: importance of season and animal effects. *Proceedings of the 25th Studiedag Nederlandstalige Voedingsonderzoekers*, University of Wageningen, Netherlands, 38-39.

**9. Mbanzamihigo, L., Da Costa Gomez, C., Fievez, V., Piattoni, F., Carlier, L. and Demeyer, D., 2001.** Effects of nitrogen fertilisation on sward composition methane production and rumen fermentation patterns : importance season and animal effects. *Canadian Journal of Animal Sciences*, (envoyé pour publication).

**10. Vlaeminck, B., Vandeweghe, A., Fievez, V., Mbanzamihigo, L. Carlier, L. and Demeyer, D., 2001.** Effect van N-bemestingsniveau op methaanuitstoot en efficiëntie van N-benutting bij *ad libitum* voeding van grass aan schapen. *Proceedings of the 26th Studiedag Nederlandstalige Voedingsonderzoekers*, 06 April 2001, Centre de Recherche Agricole de Gand, Belgique, 6-7.

**11. Vandeweghe, A., Vlaeminck, B., Fievez, V., Mbanzamihigo, L. Carlier, L. and Demeyer, D., 2001.** Invloed van synchronisatie van energie- en N-aanbod in de pens op methaanemissie en efficiëntie van N-benutting door schapen. *Proceedings of the 26th Studiedag Nederlandstalige Voedingsonderzoekers*, 06 April 2001 Centre de Recherche Agricole de Gand, Belgique, 8-9.

### **5.3. Mémoires découlant du projet et présentés pour l' obtention du diplôme de bio-ingenieur en Agriculture**

**1. Parera i Pous, J. (2000):** Effect of nitrogen fertilisation and season effect on sward composition of the pasture and efficiency of nitrogen utilisation by sheep. Ingeneer thesis, University of Lleida, Spain and Univesity of Ghent, Belgium, pp 93.

**2. Vandeweghe, A. (2001):** Invloed van N-bemestingsniveau en synchronisatie van energie- en N-aanbod in de pens op efficiëntie van N-benutting door schapen.

**3. Vlaeminck, B. (2001):** Effect van N-bemestingsniveau en bijvoeding op methaanemissie bij gras gevoederde schapen. Bio-Ingeneer thesis, Univesity of Ghent, Belgium.

### **5.4. Autres communications**

**1. CD-rom (2000).** Présenté lors des journées portes ouvertes de la Faculté des Sciences Agricoles et Biologiques Appliquées, Université de Gand (Edition 2000).

## **5.5. Participation à des colloques ou séminaires**

- 1. Le 26 Janvier 2000:** Participation au Cinquième Carrefour des Productions Animales : Quels systèmes de Productions Animales pour le 21ème Siècle ?. Ce carrefour a été organisé conjointement par la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques et le Centre de Recherche Agronomique de Gembloux - Belgique (1 communication).
- 2. Le 28 Avril 2000:** Participation à la 25ème journée d'étude des chercheurs d'expression Néerlandophone organisée par l'Université de Wageningen en Hollande (2 communications)
- 3. Du 25 au 26 Mai 2000:** Participation au 2ème symposium conjoint l'INRA-France et l'RRI-Angleterre : Challenges For Microbial Digestive Ecology at the Beginning of the Third Millennium” organisé conjointement à Clermont-Ferrand en France (1 communication).
- 4. Le 24 Octobre 2000:** Participation à un séminaire organisé conjointement par le SSTC et les Universités de Gand et de Leuven : Non-CO2 trace gas emissions from Belgian soils, where research and policy meet.
- 5. Le 5 Mars 2001:** Participation à un séminaire organisé par le SSTC sur l'appui scientifique à la politique belge en matière de changement climatique et d'ozone troposphérique : les enseignement des projets de recherche pour l'aide à la prise de décision (1 communication).
- 6. Le 06 Avril 2001:** Participation à la 26ème journée d'étude des chercheurs en nutrition animale d'expression Néerlandophone organisée par le Centre de Recherche Agricole de Gand, Belgique (3 communications).
- 7. Le 10-12 Juillet 2001:** Participation prévue à un congrès international intitulé: “EGF (European Grassland Federation) 2001 - Organic Grassland Farming”, Witzenhausen, Germany (1 communication).

## 5.6. Résultats détaillés

### Expérience préliminaire: composition des gaz avant et après l'incubation *in vitro*

Traitement*	Avant l'incubation ( $\mu\text{mole}$ / flacon)			Après l'incubation ( $\mu\text{mole}$ / flacon)					
	O <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>	N <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>	N <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	H <sub>2</sub>
<b>T1</b>	0	0	6764.6	0	0	3830.6	638.2	520.7	0.9
	0	0	6157.3	0	0	4367.1	756.8	486.4	1.7
	0	0	5822.5	3.8	0	5977.4	611.8	446.9	1.0
	0	0	6138.4	16.4	0	6339.0	679.5	450.0	1.1
moyenne ds	0	0	6220.7	5.1	0	5128.5	671.6	476.0	1.8
	0	0	393.8	7.8	0	1218.0	63.3	34.8	0.4
<b>T2</b>	219.9	0	7545.4	0	0	6804.0	1163.0	411.8	1.6
	202.2	0	6598.3	0	0	6728.9	1085.8	420.2	1.4
	237.1	0	5943.4	3.9	0	5955.5	778.4	340.3	1.3
	209.2	0	5786.3	3.9	0	5882.1	774.3	344.6	1.3
moyenne ds	217.1	0	6468.4	2.0	0	6342.6	950.4	379.2	1.4
	15.2	0	799.5	2.3	0	491.3	203.4	42.6	0.2
<b>T3</b>	253.4	502.2	9394.3	6.0	505.0	9130.0	1096.8	394.1	2.4
	251.3	498.7	7159.5	4.6	478.4	6769.4	882.3	366.8	1.7
	202.7	413.9	6984.8	0	444.2	7197.6	807.7	352.5	1.3
	189.5	371.0	5975.0	12.4	421.4	6212.7	739.6	341.4	1.2
moyenne ds	224.2	446.5	7378.4	5.8	462.3	7329.4	881.6	363.7	1.7
	32.9	64.8	1441.8	5.1	36.9	1267.6	154.9	22.8	0.5
<b>T4</b>	51.1	437.4	5518.3	57.0	310.6	4055.1	791.0	411.9	1.2
	7.7	518.9	6171.5	4.0	498.4	5776.2	820.3	477.0	1.4
	19.5	392.3	6815.4	13.9	392.0	6705.9	879.4	409.3	1.5
	5.6	364.1	5611.6	1.9	395.9	5368.9	832.6	407.5	1.4
moyenne ds	21.0	428.2	6029.2	19.2	399.2	5476.5	830.8	426.4	1.4
	21.0	67.6	598.3	25.7	76.9	1100.5	36.8	33.8	0.1

\* :T1, T2, T3, T4: incubations *in vitro* faites respectivement sous N<sub>2</sub> ; N<sub>2</sub> + 5 ml O<sub>2</sub> ; N<sub>2</sub> + 5 ml O<sub>2</sub> + 10 ml C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> et N<sub>2</sub> + 10 ml C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> ; ds: déviation standard.

**Expérience préliminaire: Recouvrement de l'éthane et son effet sur la production des gaz *in vitro***

Traitement*	$\mu\text{mole C}_2\text{H}_6 / \text{mmole N}_2$		$\text{CO}_2$ $\mu\text{mole} /$ flacon	$\text{CH}_4$ $\mu\text{mole} /$ flacon	$\text{H}_2$ $\mu\text{mole} /$ flacon
	Avant l'incubation	Après l'incubation			
T1	0	0	638.2	520.7	0.9
	0	0	756.8	486.4	1.7
	0	0	611.8	446.9	1.0
	0	0	679.5	450.0	1.1
moyenne ds	0	0	671.6	476.0	1.8
	0	0	63.3	34.8	0.4
T2	0	0	1163.0	411.8	1.6
	0	0	1085.8	420.2	1.4
	0	0	778.4	340.3	1.3
	0	0	774.3	344.6	1.3
moyenne ds	0	0	950.4	379.2	1.4
	0	0	203.4	42.6	0.2
T3	53.5	55.3	1096.8	394.1	2.4
	69.7	70.7	882.3	366.8	1.7
	59.3	61.7	807.7	352.5	1.3
	62.1	67.8	739.6	341.4	1.2
moyenne ds	61.2	63.9	881.6	363.7	1.7
	6.7	6.8	154.9	22.8	0.5
T4	79.3	76.6	791.0	411.9	1.2
	84.1	86.3	820.3	477.0	1.4
	57.6	58.5	879.4	409.3	1.5
	64.9	73.7	832.6	407.5	1.4
moyenne sd	71.5	73.8	830.8	426.4	1.4
	12.3	11.5	36.8	33.8	0.1

\*: T1, T2, T3, T4: incubations *in vitro* faites respectivement sous  $\text{N}_2$  ;  $\text{N}_2 + 5 \text{ ml O}_2$  ;  $\text{N}_2 + 5 \text{ ml O}_2 + 10 \text{ ml C}_2\text{H}_6$  et  $\text{N}_2 + 10 \text{ ml C}_2\text{H}_6$  ; ds: déviation standard.

**Expérience préliminaire: comparaison entre le CH<sub>4</sub> mesuré et le CH<sub>4</sub> calculée en utilisant C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> infusé**

Traitement <sup>*</sup>	% CH <sub>4</sub>	% C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> infusé μmole/flacon	CH <sub>4</sub> <sup>**</sup> calculé μmole/flacon	CH <sub>4</sub> mesuré μmole/flacon
T3	3.5	4.5	502.2	390.6	394.1
	4.3	5.6	498.7	382.9	366.8
	4.0	5.0	413.9	331.1	352.5
	4.4	5.5	371.0	296.8	341.4
moyenne	4.1	5.2	446.5	350.4	363.7
ds	0.4	0.5	64.8	44.4	22.8
T4	7.3	5.5	437.4	580.5	412.0
	6.3	6.6	518.9	495.3	477.0
	4.9	4.7	392.3	409.0	409.3
	5.8	5.6	364.1	377.1	407.5
moyenne	6.1	5.6	428.2	465.5	426.5
ds	1.0	0.8	67.6	91.5	33.8

<sup>\*</sup>: T3, T4: Incubations *in vitro* faites sous N<sub>2</sub> + 5 ml O<sub>2</sub> + 10 ml C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> et N<sub>2</sub> + 10 ml C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> respectivement ; <sup>\*\*</sup>: CH<sub>4</sub> produit = (%CH<sub>4</sub> après incubation x C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> infusé avant l'incubation) / (% C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> après l'incubation) ; ds: déviation standard.

**Expérience Préliminaire : effet de l'éthane sur les fermentations *in vitro* des contenus du rumen**

Traitement *	AA	AP	AB	AGV totaux production nette	CH <sub>4</sub>	H <sub>2</sub>	2Hr
	μmole / flacon						(%)
T1	924.2	332.5	192.3	1467.0	520.7	0.9	106.2
	953.3	344.5	204.2	1502.0	486.4	1.7	99.2
	805.4	283.5	204.8	1293.7	446.9	1.0	101.9
	799.4	272.0	200.5	1271.9	450.0	1.1	102.7
moyenne	870.6	308.1	200.5	1383.7	476.0	1.2	102.5
ds	79.7	35.7	5.8	117.7	34.8	0.4	2.9
T2	986.4	311.3	207.4	1505.1	411.8	1.6	86.2
	1007.3	314.1	210.4	1531.8	420.2	1.4	86.1
	838.6	249.2	200.9	1288.7	340.3	1.3	82.8
	845.2	248.5	191.7	1285.4	344.6	1.3	83.5
moyenne	919.4	280.8	202.6	1402.8	379.6	1.4	84.7
ds	89.9	36.9	8.3	134.0	42.6	0.1	1.8
T3	1007.9	294.2	190.8	1492.9	394.1	2.4	82.9
	1006.5	296.3	194.6	1497.4	366.8	1.7	79.3
	884.1	276.5	160.8	1321.4	352.5	1.3	85.0
	859.2	279.4	165.8	1304.4	341.4	1.2	84.8
moyenne	939.4	286.6	178.0	1404.0	363.7	1.7	83.0
ds	78.9	10.1	17.2	105.5	22.8	0.5	2.4
T4	-	-	-	-	411.9	1.2	-
	924.8	324.7	191.6	1441.1	477.0	1.4	100.0
	788.7	291.8	161.4	1242.0	409.3	1.5	101.1
	784.4	306.1	150.6	1241.1	407.5	1.4	102.7
moyenne	832.6	307.5	167.9	1308.1	426.5	1.4	101.3
ds	79.8	16.5	21.3	115.2	33.8	0.1	1.4

\*: T1, T2, T3, T4: : incubations *In vitro* faites respectivement sous N<sub>2</sub> ; N<sub>2</sub> + 5 ml O<sub>2</sub> ; N<sub>2</sub> + 5 ml O<sub>2</sub> + 10 ml C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> et N<sub>2</sub> + 10 ml C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> ; ds: déviation standard ; -: non mesuré.

**Effet de la fertilisation azotée sur la composition botanique : première année (1999), première saison, première période**

semaines après fertilisation	trèfle N0 (kg MS)	ray grass N0 (kg MS)	clover N150 (kg MS)	ray grass N150 (kg MS)	production totale N150 (kg MS)
1	205,152	222,248	191,1262	254,6878	441,4
2	302,4684	428,1316	351,8618	656,3382	1008,2
3	478,9428	542,2572	705,208	721,0392	1439,2
4	1620,212	1901,988	1663,78	2394,22	4058
5	1049,792	1958,208	765,8774	4112,3226	4878,2
6	1255,0824	2767,6176	1067,9232	4494,1768	5562,1

**Effet de la fertilisation azotée sur la composition botanique : première année (1999), première saison, deuxième période**

semaines après fertilisation	trèfle N0 (%MS)	ray grass N0 (%MS)	clover N150 (%)	ray grass N150 (%)	production totale N0 (kg MS)	production totale N150 (kg MS)
1	29,7	70,3	27,4	72,6	1034,9	931,2
2	32,9	67,1	33,9	66,1	1615,3	1865,6
3	26,8	73,2	24,6	75,4	2500,4	3107,8
4	21,1	78,9	20,4	79,6	4249,8	5147,9
5	39,3	60,7	13,4	86,6	4466,2	5414,3
6	34,7	65,3	15,1	84,9	6932,4	7865,1

**Effet de la fertilisation azotée sur la composition botanique : deuxième année (1999), première saison, première période**

semaine après fertilisation	trèfle N0 (%MS)	ray grass N150 (%MS)	trèfle N150 (%MS)	ray grass N150 (%MS)	production totale N0 (kg MS)	production totale N150 (kg MS)
1	61,5	38,5	42	58	470,4	704,9
2	46,4	53,6	44,8	55,2	608,2	949,9
3	48,9	51,1	46,6	53,4	834,8	1202,5
4	69,1	30,9	48,1	51,9	1191,2	1746,4
5	50,3	49,7	32,5	67,5	1046,1	1627,5
6	49,9	50,1	40,3	59,7	1679,1	2424,4
7	51,5	48,5	52	48	1716,6	3046,8



**Effet de la fertilisation azotée sur la composition botanique : première année (1999), deuxième saison, deuxième période**

semaines après fertilisation	trèfle N0 (%MS)	ray grass N0 (%MS)	trèfle N150 (%MS)	ray grass N150 (%MS)	production totale N0 (kg MS)	production totale N150 (kg MS)
1	39,2	60,8	43	57	536	380,7
2	45,1	54,9	41,2	58,8	595,2	725,4
3	49,8	50,2	35,3	64,7	1047	1290,3
4	50,9	49,1	26,8	73,2	1410,8	1486,5
5	49,7	50,3	48,1	51,9	1437,8	1910,2
6	53,7	46,3	27,3	72,7	1614,6	1906,1
7	50,6	49,4	38	62	1574,4	2212,1

**Effet de la fertilisation azotée sur les émissions de méthane (ml/6h) : première année (1999), première saison**

date/mouton	A	B	C	D
fertilisation	N150	N150	N0	N0
14/06/1999	4805,9	7233,6	5866,7	7554,2
16/06/1999	3242,8	6312,9	6102,1	6532,9
21/06/1999	4894,5	7711,7	8254,6	8528,2
23/06/1999	5061,9	9341,7	6501,9	9925,4
fertilisation	N0	N0	N150	N150
05/07/1999	4874,3	6985,8	6758,4	8366,6
07/07/1999	6145,4	7985,4	5366,8	5949,9
12/07/1999	6296	7171,4	8168,7	9236,7
14/07/1900	5906,1	6161,3	6485,7	6605,7

**Effet de la fertilisation azotée sur l'ingestion volontaire (g MS/jour) : première année (1999), première saison**

date/mouton	A	B	C	D
fertilisation	N150	N150	N0	N0
14/06/1999	997	1222	919	1149
16/06/1999	1054	1213	971	1213
21/06/1999	1016	1251	952	1190
23/06/1999	1005	1159	1038	1226
fertilisation	N0	N0	N150	N150
05/07/1999	872	942	893	1041
07/07/1999	1225	1249	1084	1085
12/07/1999	1433	1371	1037	1272
14/07/1900	1139	942	1202	787

**Effet de la fertilisation azotée sur les paramètres de la digestion de la MS dans le rumen : première année (1999), première saison**

date	a (%MS)	b (%MS)	c (%MS/h)	k (%/h)	DE (%MS)
<u>mouton A</u>					
14+16 /06/99	42,1	50,7	5,3	6,1	65,7
21+23/06/99	42	43,3	4,6	6,1	60,6
05+07/07/99	41,6	49,7	2,4	4,5	58,9
12+14/07/99	35,2	48,9	2,3	4,5	51,7
<u>mouton B</u>					
14+16 /06/99	41	51,5	13,5	6,3	76,1
21+23/06/99	41,9	47,7	9,3	6,3	70,3
05+07/07/99	37,9	50,7	5,2	4,2	65,9
12+14/07/99	38,3	44,8	4,8	4,2	62,2
<u>mouton C</u>					
14+16 /06/99	43,5	49,3	9,1	4,6	76,2
21+23/06/99	37	52	7,9	4,6	69,9
05+07/07/99	38,6	50,2	4,9	4,7	64,2
12+14/07/99	34,7	46,5	4,4	4,7	57,2
<u>mouton D</u>					
14+16 /06/99	45,7	46	7,9	3,5	77,6
21+23/06/99	44,1	41,6	7,5	3,5	72,5
05+07/07/99	38,8	49,2	5,4	2,8	71,2
12+14/07/99	36,5	44,5	3,3	2,8	60,6

a : fraction soluble dans l'eau ; b : fraction non soluble soluble dans l'eau mais dégradable ; k : taux de passage de particules solides ; DE : dégradabilité effective =  $a+(b*c)/(c+k)$  (%)

**Effet de la fertilisation azotée sur la proportion des AGV: première année (1999), première saison**

date/mouton fertilisation	acetate (%)	propionate (%)	butyrate (%)
<b>sheep A</b>			
	N150		
14/06/1999	67,9	20,6	10,1
16/06/1999	71,5	20	7,6
21/06/1999	67,5	22,5	8,7
23/06/1999	69,9	20,8	8,1
	N0		
05/07/1999	70,6	20	8,1
07/07/1999	69,5	21,6	8,4
12/07/1999	69,4	20,4	9,2
14/07/1900	68	20,2	10,1
<b>sheep B</b>			
	N150		
14/06/1999	67,2	18,1	12,3
16/06/1999	66,1	19,4	11,7
21/06/1999	65,8	18,4	13,2
23/06/1999	65,9	18,8	13,1
	N0		
05/07/1999	69,3	17,1	11,8
07/07/1999	68,1	18	12,2
12/07/1999	71,8	16,5	10
14/07/1900	73	16	9,5
<b>sheep C</b>			
	N0		
14/06/1999	63,6	21,1	12,5
16/06/1999	63,8	22,9	11,5
21/06/1999	61,4	21,2	14,7
23/06/1999	60,5	20,8	16,5
	N150		
05/07/1999	61	22,6	13,9
07/07/1999	62,1	24,1	11,7
12/07/1999	62,1	23,6	11,9
14/07/1900	62,5	22,2	12,8
<b>sheep D</b>			
	N0		
14/06/1999	66,5	18,9	12,9
16/06/1999	67,6	18,3	12,1
21/06/1999	69,7	16,4	11,8
23/06/1999	69,4	17,1	11,9
	N150		
05/07/1999	68,5	17,4	11,7
07/07/1999	69,2	17,9	11,2
12/07/1999	68,6	17,7	11,5
14/07/1900	68,5	17,5	11,7

**Effet de la fertilisation azotée sur les émissions de méthane (ml/6h) : première année (1999), deuxième saison**

date / mouton	Sheep A	Sheep B	Sheep C	Sheep D
fertilisation	N150	N150	N0	N0
30/08/1999	5151,6	4981,6	8141,6	8317,6
01/09/1999	5635,1	7119,5	7698,8	7975,7
06/09/1999	6260,8	9070,6	9160,8	8935,7
08/09/1999	4914,1	7190,7	7315,5	8863,1
fertilisation	N0	N0	N150	N150
20/09/1999	4683	7147	7443	9170
22/09/1999	4461	8093	5529	10328
27/09/1999	5318	7947	7841	8398
29/09/1999	4164	6952	6314	7426

**Effet de la fertilisation azotée sur l'ingestion volontaire (g MS/jour) : première année (1999), deuxième saison**

date/mouton	Sheep A	Sheep B	Sheep C	Sheep D
fertilisation	N150	N150	N0	N0
30/08/1999	1077,5	837,6	1231,2	1236,6
01/09/1999	1090,4	872,1	1038,2	1218,3
06/09/1999	1105,4	1065,2	1235,9	1256,8
08/09/1999	1041,2	1110,2	1208,8	1354,7
fertilisation	N0	N0	N150	N150
20/09/1999	902,6	1078,6	1020,2	1170
22/09/1999	730	1032,9	895,8	1210
27/09/1999	807,2	880,1	1148,4	1156,7
29/09/1999	835,5	940,5	1036,3	1175,2

**Effet de la fertilisation azotée sur les paramètres de la digestion de la MS dans le rumen : première année (1999), deuxième saison**

Date/mouton	a (%MS)	b (%MS)	c (%MS/h)	k (%/h)	DE (%MS)
<u>mouton A</u>					
30+01/08/99	38,7	52,2	4,5	4,1	66,0
06+08/09/99	35,2	51,3	4	4,1	60,5
20+22/09/99	38,2	46,5	5,4	3,5	66,4
27+29/09/99	36,5	48,1	4,7	3,5	64,1
<u>mouton B</u>					
30+01/08/99	39,2	51,1	12	4,6	76,1
06+08/09/99	36,3	50,7	8,7	4,6	69,5
20+22/09/99	35,1	54,8	8,3	5,7	67,6
27+29/09/99	37,2	47,7	5,9	5,7	61,5
<u>mouton C</u>					
30+01/08/99	36,6	48,5	10	5,1	68,7
06+08/09/99	38,5	47,9	6,2	5,1	64,8
20+22/09/99	39,5	46,9	7,4	3,8	70,5
27+29/09/99	33,8	50,3	5,4	3,8	63,3
<u>mouton D</u>					
30+01/08/99	41,8	44,5	7,3	3,2	72,7
06+08/09/99	35,7	52,2	5,9	3,2	69,5
20+22/09/99	40,2	47,5	7,2	4,2	70,2
27+29/09/99	33,4	49,4	6,2	4,2	62,9

a : fraction soluble dans l'eau ; b : fraction non soluble soluble dans l'eau mais dégradable ; k : taux de passage de particules solides ; DE : dégradabilité effective =  $a+(b*c)/(c+k)$  (%)

**Effet de la fertilisation azotée sur la proportion des AGV: première année (1999), deuxième saison**

date/mouton	acetate (%)	propionate (%)	butyrate (%)
<hr/>			
<u>sheep A</u>	N150		
30/08/1999	66,7	20,9	10,2
01/09/1999	64,2	21,3	12,2
06/09/1999	66,2	20,4	10,6
08/09/1999	65,3	21,4	11
	N0		
20/09/1999	67	18,1	11,9
22/09/1999	66,9	16,7	12,9
27/09/1999	67,3	16,5	12,8
29/09/1999	66,4	16,8	13,1
<hr/>			
<u>sheep B</u>	N150		
30/08/1999	68,7	17,9	10,3
01/09/1999	67,6	18,4	10,6
06/09/1999	68,4	17,4	11,3
08/09/1999	68,5	17,8	10,7
	N0		
20/09/1999	70,8	16	10
22/09/1999	70,5	16,2	9,7
27/09/1999	66,7	19,6	9,9
29/09/1999	69,5	16,5	10,3
<hr/>			
<u>sheep C</u>	N0		
30/08/1999	66,6	18,2	11,8
01/09/1999	63,9	18	14,4
06/09/1999	65	19	12,1
08/09/1999	64,3	18,9	13,5
	N150		
20/09/1999	65,6	18,4	12,7
22/09/1999	63,8	20,2	12,2
27/09/1999	62,7	18,9	13,7
29/09/1999	64,7	17,6	13,2
<hr/>			
<u>sheep D</u>	N0		
30/08/1999	69,1	15,3	12,1
01/09/1999	67	16,5	12,9
06/09/1999	69	15,6	11,7
08/09/1999	67,1	16,7	12,7
	N150		
20/09/1999	68,1	15,8	12,7
22/09/1999	67,6	16,7	12,1
27/09/1999	69,4	15,3	11,8
29/09/1999	67,2	17,2	11,3
<hr/>			

**Effet de la fertilisation azotée sur la production de méthane, la production et les proportions des AGV après des incubations *in vitro* (première année:1999, première saison)**

mouton	traitement	acétate	propionate	butyrate	iVFA	CH <sub>4</sub>	totVFA	2Hr
		mmoles / mole d'AGV				μmoles/flac		(%)
A	N150	546	224	123	37	295	2376	105
B	N150	600	285	79	17	90	3365	63
A	N150	607	260	102	20	172	2604	75
B	N150	616	212	110	23	193	2805	77
A	N150	592	246	122	13	158	2540	73
B	N150	545	316	95	13	201	2573	93
A	N150	538	313	98	19	160	2664	84
B	N150	609	210	133	16	232	2645	84
A	N0	426	401	122	25	202	1993	108
B	N0	593	236	133	22	210	2669	82
A	N0	530	333	99	18	107	2438	74
B	N0	578	251	137	16	219	2500	86
A	N0	530	329	106	18	146	2272	82
B	N0	631	213	149	8	245	2045	82
A	N0	533	319	111	17	157	2126	83
B	N0	596	226	132	13	204	2154	81
C	N0	569	273	100	32	186	2841	84
D	N0	616	213	116	31	225	2763	83
C	N0	574	258	110	34	191	2637	83
D	N0	601	219	121	31	223	2652	85
C	N0	528	316	110	20	153	2590	83
D	N0	623	218	114	21	238	2570	86
C	N0	538	273	137	23	202	2406	88
D	N0	628	203	118	25	250	2655	80
C	N150	515	300	129	28	172	2632	86
D	N150	629	207	124	15	253	2529	87
C	N150	569	304	90	11	140	2471	77
D	N150	628	229	111	12	236	2267	86
C	N150	578	293	98	10	181	2107	84
D	N150	642	223	109	11	221	2031	81
C	N150	557	300	107	19	252	1980	100
D	N150	640	224	105	14	240	1938	85

**Effet de la fertilisation azotée sur la production de méthane, la production et les proportions des AGV après des incubations *in vitro* (première année:1999, deuxième saison)**

mouton	traitement	acétate	propionate	butyrat	iVFA	CH <sub>4</sub>	VFA <sub>tot</sub>	2Hr
			mmoles/mole d'AGV <sub>tot</sub>					
1	2	546	224	123	37	295	2376	105
1	2	568	275	101	28	156	2481	78
2	2	636	231	84	30	214	2434	82
1	2	597	252	98	28	165	2470	79
2	2	643	190	117	25	234	2475	88
1	2	592	232	131	25	237	2356	80
2	2	633	199	112	28	205	2450	84
1	2	615	231	97	28	171	2461	80
2	2	646	202	99	32	245	2437	72
1	1	569	281	97	33	169	2471	81
2	1	645	217	102	30	237	2518	85
1	1	611	241	92	27	160	2470	74
2	1	627	223	95	30	216	2465	83
1	1	556	206	82	23	176	2180	79
2	1	584	211	77	26	202	2271	84
1	1	512	205	86	23	169	2096	82
2	1	660	202	78	23	194	2432	75
3	1	568	240	93	27	165	2358	76
4	1	630	186	115	24	234	2431	82
3	1	550	215	121	23	237	2306	88
4	1	641	202	114	29	205	2513	78
3	1	581	219	92	26	171	2345	75
4	1	635	198	97	32	245	2439	85
3	1	621	217	105	29	177	2461	74
4	1	632	209	100	29	177	2465	73
3	2	614	232	106	27	191	2454	78
4	2	636	192	106	27	217	2429	80
3	2	597	232	92	28	116	2398	65
4	2	639	188	95	29	216	2397	80
3	2	583	213	83	20	186	2274	81
4	2	608	187	78	22	214	2251	83
3	2	592	223	81	19	159	2315	75
4	2	613	193	77	18	174	2272	74



**Effet du niveau de fertilisation azotée sur les émissions de méthane (l/24h) : deuxième année (2000), première saison**

répétitions/ mouton	E	F	G	H
fertilisation	N400	N400	N200	N200
1	44.58	39.84	55.06	51.24
2	33.32	41.68	39.22	42.50
3	3175	36.18	46.44	38.91
4	1808	34.42	36.23	48.76
fertilisation	N200	N200	N400	N400
1	28.09	40.80	49.00	44.61
2	25.92	36.14	28.35	42.32
3	29.05	35.54	34.44	44.74
4	27.34	39.69	47.55	43.84

**Effet du niveau de fertilisation azotée sur l'ingestion volontaire (g/24h) : deuxième année (2000), première saison**

répétitions /mouton	E	F	G	H
fertilisation	N400	N400	N200	N200
1	1547	1480	1924	1940
2	1403	1550	1723	1870
3	1183	1764	1867	1890
4	849	1606	1816	1960
fertilisation	N200	N200	N400	N400
1	632	1281	1587	1770
2	794	1391	1635	1900
3	709	1193	1751	1891
4	734	1223	1725	1659

**Paramètres de la digestion de la MS dans le rumen : deuxième année (2000), première saison (niveau de fertilisation 400kg N/ha/an)**

répétition/ mouton	a (%MS)	b (%MS)	c (%MS/h)	k (%/h)	DE (%MS)
<u>mouton E</u>					
1	29.3	49.8	4.2	3.2	57.8
2	29.3	49.8	4.2	3.2	57.8
3	27.3	58.2	5.2	3.2	63.5
4	27.3	58.2	5.2	3.2	63.5
<u>mouton F</u>					
1	29.3	59.6	4.8	3.3	64.6
2	29.3	59.6	4.8	3.3	64.6
3	31.8	57.0	3.9	3.3	63.0
4	31.8	57.0	3.9	3.3	63.0
<u>mouton G</u>					
1	31.2	55.1	5.4	4.2	62.2
2	31.2	55.1	5.4	4.2	62.2
3	31.2	55.1	5.4	4.2	62.2
4	29.2	57.7	4.9	4.2	60.5
<u>mouton H</u>					
1	34.0	52.6	3.5	6.4	52.5
2	34.0	52.6	3.5	6.4	52.5
3	34.0	52.6	3.5	6.4	52.5
4	30.4	56.9	5.2	6.4	55.8

a : fraction soluble dans l'eau ; b : fraction non soluble soluble dans l'eau mais dégradable ; k : taux de passage de particules solides ; DE : dégradabilité effective =  $a+(b*c)/(c+k)$  (%)

**Paramètres de la digestion de la MS dans le rumen : deuxième année (2000), première saison (niveau de fertilisation 200kg N/ha/an)**

répétition/ mouton	a (%MS)	b (%MS)	c (%MS/h)	k (%/h)	DE (%MS)
<u>mouton E</u>					
1	34.4	53.8	3.8	2.0	69.2
2	34.4	53.8	3.8	2.0	69.2
3	34.4	53.8	3.8	2.0	69.2
4	31.4	49.4	3.8	2.0	62.6
<u>mouton F</u>					
1	32.0	54.2	4.5	4.0	60.8
2	32.0	54.2	4.5	4.0	60.8
3	32.0	54.2	4.5	4.0	60.8
4	31.9	50.0	6.0	4.0	61.8
<u>mouton G</u>					
1	29.8	63.8	2.7	4.2	54.8
2	29.8	63.8	2.7	4.2	54.8
3	28.2	60.3	4.5	4.2	59.5
4	28.2	60.3	4.5	4.2	59.5
<u>mouton H</u>					
1	29.1	58.4	5.4	64.4	55.8
2	29.1	58.4	5.4	64.4	55.8
3	25.7	60.2	6.9	64.4	57.0
4	25.7	60.2	6.9	64.4	57.0

a : fraction soluble dans l'eau ; b : fraction non soluble soluble dans l'eau mais dégradable ; k : taux de passage de particules solides ; DE : dégradabilité effective =  $a + (b \cdot c) / (c + k)$  (%)

**La concentration en AGV totaux, les proportions d'AGV et le pH dans le jus du rumen :  
deuxième année (2000), première saison (niveau de fertilisation 400kg N/ha/an)**

répétition/ mouton	AGV totaux mmoles/l	acétate (%)	propionate (%)	butyrate (%)	pH	iVFA (%)
<u>mouton E</u>						
1	111.6	66.9	23.6	5.2	6.4	2.1
2	106.1	68.8	23.2	4.7	6.2	1.6
3	106.3	68.7	20.7	6.5	6.5	2.2
4	68.2	64.6	22.4	6.6	6.7	3.6
<u>mouton F</u>						
1	90.7	67.0	18.7	8.6	6.8	3.4
2	126.3	66.6	20.6	8.7	6.0	2.1
3	133.6	67.5	20.4	7.6	6.1	2.3
4	136.3	67.4	20.6	7.5	6.1	2.6
<u>mouton G</u>						
1	104.0	70.7	17.8	7.1	6.4	2.5
2	110.6	68.4	19.0	7.5	6.4	2.7
3	99.3	69.3	18.4	7.5	6.4	2.5
4	94.9	70.7	17.6	7.6	6.5	2.2
<u>mouton H</u>						
1	105.7	69.9	18.0	8.2	6.4	2.2
2	110.2	68.0	18.7	8.5	6.4	2.6
3	113.9	68.0	18.3	8.8	6.4	2.8
4	96.3	67.5	18.8	9.5	6.4	2.2

**La centration en AGV totaux, les proportions d'AGV et le pH dans le jus du rumen : deuxième année (2000), première saison (niveau de fertilisation 200kg N/ha/an)**

répétition/ mouton	AGV totaux mmoles/l	acétate (%)	propionate (%)	butyrate (%)	pH	iVFA (%)
<b>mouton E</b>						
1	101.3	67.4	20.8	8.1	6.4	2.4
2	98.0	66.8	21.1	7.9	6.4	2.5
3	103.3	66.2	22.3	7.7	6.2	2.1
4	93.7	68.5	19.9	7.6	6.5	2.5
<b>mouton F</b>						
1	122.9	65.3	21.2	9.5	5.9	2.2
2	117.1	65.8	20.5	9.8	6.1	1.8
3	108.8	66.0	20.5	9.9	6.1	1.9
4	110.9	66.4	20.3	9.0	6.2	2.3
<b>mouton G</b>						
1	93.3	70.8	19.0	6.9	6.5	1.5
2	85.7	71.0	18.7	7.5	6.4	1.1
3	102.7	71.6	17.6	7.9	6.3	1.1
4	98.3	71.5	17.7	7.9	6.4	1.2
<b>mouton H</b>						
1	94.3	67.6	19.7	9.5	6.5	1.6
2	98.3	68.6	19.0	9.0	6.4	1.4
3	107.2	68.5	18.8	9.3	6.4	1.4
4	127.3	68.4	18.7	9.7	5.9	1.4

**Effet du niveau de fertilisation azotée sur les émissions de méthane (l/24h) : deuxième année (2000), deuxième saison**

répétitions/ mouton	E	F	G	H
fertilisation	N400	N400	N200	N200
1	33.26	33.73	45.68	52.07
2	30.71	33.59	36.52	50.82
3	38.29	32.91	46.81	50.22
4	29.26	16.84	40.23	49.21
fertilisation	N200	N200	N400	N400
1	30.02	28.05	37.80	44.16
2	28.50	23.95	30.78	42.48
3	27.88	27.77	39.36	45.73
4	30.40	27.32	42.82	42.88

**Effet du niveau de fertilisation azotée sur l'ingestion volontaire (g/24h) : deuxième année (2000), première saison**

répétitions /mouton	E	F	G	H
fertilisation	N400	N400	N200	N200
1	1018	1095	1450	1487
2	992	1151	1478	1549
3	1011	1131	1510	1434
4	1122	649	1473	1521
fertilisation	N200	N200	N400	N400
1	898	973	1178	1324
2	923	974	1336	1480
3	823	977	1374	1431
4	855	1052	1562	1531

**La concentration en AGV totaux, les proportions d'AGV et le pH dans le jus du rumen : deuxième année (2000), deuxième saison (niveau de fertilisation 400kg N/ha/an)**

répétition/ mouton	AGV totaux mmoles/l	acétate (%)	propionate (%)	butyrate (%)	iVFA (%)	pH
<u>mouton E</u>						
1	120.2	64.0	21.6	9.9	2.6	6.4
2	138.0	64.3	22.2	9.1	2.4	6.0
3	118.9	63.2	21.4	10.3	3.0	6.4
4	139.6	63.4	21.8	10.2	2.4	6.2
<u>mouton F</u>						
1	118.5	67.5	18.7	9.7	2.3	6.3
2	131.9	67.0	20.1	9.2	2.0	6.1
3	127.6	66.1	20.3	9.5	2.2	6.2
4	168.8	63.8	20.4	10.5	3.5	6.6
<u>mouton G</u>						
1	107.5	66.0	18.4	10.5	3.0	6.5
2	107.3	64.5	19.7	11.2	2.6	6.5
3	88.0	63.2	19.6	11.9	3.1	6.6
4	90.2	63.4	19.4	12.1	3.0	6.5
<u>mouton H</u>						
1	107.1	62.7	20.0	11.7	2.1	6.4
2	107.2	62.0	20.9	11.9	2.1	6.5
3	94.2	62.3	20.5	12.0	2.2	6.5
4	95.7	61.7	21.1	11.5	2.2	6.5

**La concentration en AGV totaux, les proportions d'AGV et le pH dans le jus du rumen : deuxième année (2000), deuxième saison (niveau de fertilisation 200kg N/ha/an)**

répétition/ mouton	AGV totaux mmoles/l	acétate (%)	propionate (%)	butyrate (%)	iVFA (%)	pH
<b>mouton E</b>						
1	114.7	61.1	22.1	12.8	2.5	6.3
2	118.3	60.9	21.5	13.0	3.0	6.4
3	99.8	58.6	23.8	12.5	3.1	6.5
4	102.6	59.4	23.8	12.2	2.8	6.2
<b>mouton F</b>						
1	115.4	64.4	22.3	10.6	1.5	6.0
2	124.4	62.9	22.7	11.3	1.8	5.9
3	110.1	63.3	23.9	10.1	1.4	6.0
4	104.5	65.2	21.5	10.6	1.1	6.1
<b>mouton G</b>						
1	93.5	67.2	19.3	10.2	1.9	6.3
2	120.6	67.8	20.0	9.3	1.6	6.1
3	104.6	65.3	20.8	10.9	1.8	6.3
4	11.1	65.9	20.6	10.4	1.6	6.3
<b>mouton H</b>						
1	113.5	64.1	21.4	11.0	3.4	6.3
2	114.8	62.9	22.8	11.1	3.1	6.3
3	104.5	61.8	22.1	12.5	3.0	6.3
4	108.6	60.9	23.1	12.3	3.4	6.3

**Effet de la méthode de supplémentation sur les émissions de méthane (l/24h) : deuxième année (2000), première saison, niveau de fertilisation (400kg/ha/an)**

répétitions/ mouton	E	F	G	H
supplémentation	synchrone	synchrone	asynchrone	asynchrone
1	23.54	37.02	34.48	38.14
2	29.76	34.66	33.85	40.90
3	30.02	39.18	38.18	46.71
4	31.26	38.77	34.17	45.40
supplémentation	asynchrone	asynchrone	synchrone	synchrone
1	30.56	33.25	27.48	45.01
2	24.15	28.95	29.10	41.12
3	37.45	39.64	50.83	60.05
4	37.82	41.64	45.98	46.14

**Effet de la méthode de supplémentation sur l'ingestion volontaire (g MS/24h) : deuxième année (2000), première saison, niveau de fertilisation (400kg/ha/an)**

répétitions/ mouton	E	F	G	H
supplémentation	synchrone	synchrone	asynchrone	asynchrone
1	925	1320	1610	1636
2	998	1340	1598	1645
3	992	1337	1578	1621
4	986	1343	1590	1651
supplémentation	asynchrone	asynchrone	synchrone	synchrone
1	1009	1346	1609	1664
2	989	1342	1604	1665
3	986	1327	1581	1627
4	1002	1339	1601	1659

**La concentration en AGV totaux, les proportions d'AGV et le pH dans le jus du rumen : deuxième année (2000), deuxième saison (niveau de fertilisation 400kg N/ha/an) (supplémentation synchrone)**

répétition/ mouton	AGV totaux mmoles/l	acétate (%)	propionate (%)	butyrate (%)	iVFA (%)	ph
<u>mouton E</u>						
1	100.1	67.2	18.9	9.6	2.7	6.3
2	105.2	67.0	18.6	9.9	2.7	5.9
3	109.3	66.3	19.0	10.1	2.6	6.1
4	105.8	65.5	19.0	10.4	2.9	6.1
<u>mouton F</u>						
1	116.6	67.5	16.6	11.9	2.4	5.9
2	114.7	65.7	18.9	11.6	2.2	5.8
3	129.7	65.4	17.7	12.5	2.4	5.8
4	131.8	63.9	17.3	14.2	2.6	5.6
<u>mouton G</u>						
1	80.9	65.8	17.5	12.3	2.7	6.5
2	97.4	63.6	18.9	12.9	2.6	6.2
3	103.5	68.4	18.3	10.2	2.3	6.2
4	106.6	66.0	18.3	11.0	2.7	6.2
<u>mouton H</u>						
1	118.6	65.2	17.4	12.8	2.7	6.1
2	107.6	62.2	20.4	12.9	2.6	6.1
3	127.7	65.3	18.9	11.4	2.5	5.9
4	124.2	63.2	19.4	13.0	2.5	5.8



**La concentration en AGV totaux, les proportions d'AGV et le pH dans le jus du rumen : deuxième année (2000), deuxième saison (niveau de fertilisation 400kg N/ha/an) (supplémentation asynchrone)**

répétition/ mouton	AGV totaux mmoles/l	acétate (%)	propionate (%)	butyrate (%)	iVFA (%)	pH
<u>mouton E</u>						
1	97.1	65.6	19.4	10.9	2.6	6.3
2	91.4	66.3	16.9	12.4	2.6	6.4
3	104.2	65.8	17.5	12.3	2.6	6.3
4	107.7	64.4	19.0	12.0	2.6	6.2
<u>mouton F</u>						
1	128.2	65.6	18.4	11.6	2.3	5.8
2	124.0	63.4	18.8	13.3	2.5	5.8
3	148.5	65.9	18.6	11.2	2.3	5.7
4	137.0	64.3	19.4	12.0	2.4	5.6
<u>mouton G</u>						
1	97.3	67.6	17.5	11.2	2.2	6.3
2	99.1	66.4	17.7	12.2	2.1	6.2
3	99.3	64.5	18.6	12.4	2.6	6.2
4	103.6	65.1	18.4	11.8	2.7	6.0
<u>mouton H</u>						
1	105.0	66.0	18.2	11.8	2.3	6.1
2	106.2	64.0	18.7	13.5	2.2	6.0
3	106.5	64.1	18.3	13.3	2.4	6.0
4	121.1	63.7	18.2	12.8	2.6	5.6