



**HAL**  
open science

# Digestive use of treated proteaginous seeds, and their valuation by dairy cows

Solveig Mendowski

► **To cite this version:**

Solveig Mendowski. Digestive use of treated proteaginous seeds, and their valuation by dairy cows. Food and Nutrition. Université Clermont Auvergne, 2019. English. NNT : . tel-03120260v1

**HAL Id: tel-03120260**

**<https://hal.inrae.fr/tel-03120260v1>**

Submitted on 25 Jan 2021 (v1), last revised 25 Jun 2021 (v2)

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

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

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE  
LA SANTÉ – AGRONOMIE – ENVIRONNEMENT

## THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR D'UNIVERSITÉ**

*Spécialité : Génétique, Physiologie, Pathologie, Nutrition, Microbiologie, Santé, Innovation*

Par **Solveig MENDOWSKI**

Soutenue publiquement le 6 Décembre 2019

# Utilisation digestive des graines protéagineuses traitées, et leur valorisation par les vaches laitières

<b>Rapporteurs</b>	<b>Pr Corine BAYOURTHE</b>	Professeur, ENSAT, Toulouse
	<b>Pr Philippe SCHMIDELY</b>	Professeur, AgroParisTech, Paris ( <i>président du jury</i> )
<b>Examineurs</b>	<b>Pr Veerle FIEVEZ</b>	Professeur, Université de Gent, Gent
	<b>Dr Sophie LEMOSQUET</b>	Chargée de Recherche, INRA, Rennes
<b>Directeurs de Thèse</b>	<b>Dr Pierre NOZIÈRE</b>	Directeur de Recherches, INRA, Clermont-Ferrand
	<b>Pr Patrick CHAPOUTOT</b>	Maître de conférences, AgroParisTech, Paris
<b>Membres invités</b>	<b>Corinne PEYRONNET</b>	Ingénieur d'études, Terres Univia, Paris
	<b>Fabrice PUTIER</b>	Directeur, Tecaliman, Nantes
	<b>Guillaume CHESNEAU</b>	Directeur Recherche, Innovations et Sourcing, Valorex, Combournillé

Préparée dans l'Unité Mixte de Recherche sur les Herbivores  
INRA Centre Auvergne Rhône-Alpes



**VALOREX**  
*Cultivons vos différences*



# Remerciements

---

Nous y voilà. C'est déjà la fin de l'aventure, on m'avait dit « tu vas voir 3 ans de thèse ça passe vite ». On avait raison. Ceux qui me connaissent savent que le thème « poney » arrivera tôt ou tard dans ces remerciements, alors autant que ce soit tôt. La thèse c'est comme en équitation, c'est un sport individuel dans lequel un très grand nombre de personnes sont impliquées. Et si l'échec résulte de notre fait, le succès est grâce à toutes les personnes qui nous entourent, qui nous aident au quotidien et qui œuvrent pour notre réussite. Je voudrais donc remercier chaleureusement toutes ces personnes, qui ont fait que cette thèse a été à mon sens une réussite, tant sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Je remercie en premier lieu les membres de mon jury de thèse, pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci à **Corine Bayourthe** et **Philippe Schmidely** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit de thèse. Je remercie également **Sophie Lemosquet** et **Veerle Fievez** pour leur fonction d'examinatrices. Enfin, merci aux membres invités pour leur implications **Corinne Peyronnet**, **Fabrice Putier** et **Guillaume Chesneau**.

Mes remerciements vont ensuite à mon directeur de thèse, **Pierre Nozière**, pour ta disponibilité, ta grande pédagogie (même quand je te fais répéter 14 fois l'explication du calcul de la production de MP potentielle des vaches), ta réactivité et ton éternel optimisme ; mais aussi pour ne jamais m'avoir mis la pression et pour m'avoir laissée avancer à mon rythme, et surtout pour avoir supporté mon caractère et mes moments d'obstination.

Je remercie également mon co-directeur de thèse, **Patrick Chapoutot**, pour ta très grande pédagogie qui fait que tout paraît simple quand tu l'expliques, ta patience, ta disponibilité et pour tous les bons conseils que tu as pu me prodiguer durant ma thèse.

Je remercie aussi **Anne Ferlay**, co-encadrante de ma thèse, pour ta disponibilité, ta bienveillance, tes explications sur la vie et l'œuvre des acides gras, tes relectures, ton aide pour dompter SAS, et pour nos discussions poney.

Merci également à **Guillaume Chesneau**, pour m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet de thèse, pour m'avoir consacré du temps quand j'en avais besoin, pour les relectures ou lors de mes visites à Combourtillé, malgré ton emploi du temps très chargé.

Un grand merci aussi à **Antoine Germain**, pour ton aide depuis la découverte jusqu'à la maîtrise des procédés d'extrusion mis en place pour cette thèse, pour tes explications, tes visites à l'usine, tes réponses à mes (très nombreuses) questions ; mais aussi pour tes relectures, les infos dont j'avais besoin que tu m'as toujours trouvées...

J'en profite également pour remercier les chercheurs impliqués dans le projet PROLEVAL, notamment **Francis Enjalbert**, pour ton aide précieuse lors de la

construction des protocoles et du choix des traitements d'extrusion, ainsi que les relectures ; mais aussi **Hervé Juin**, pour nos discussions, à propos de PROLEVAL, de la thèse et de la suite ; et tous les autres chercheurs, post-docs, techniciens et partenaires du projet PROLEVAL, pour les échanges constructifs, en particulier lors des réunions annuelles du mois de novembre.

Je remercie tous les membres de mon comité de thèse, en particulier **Corinne Peyronnet**, **Fabrice Putier**, **Didier Rémond** et **Lucile Montagne**, pour votre regard critique et votre contribution au bon déroulement de la thèse. Merci en particulier à Lucile Montagne, pour avoir accepté de me suivre une nouvelle fois, pendant ma thèse, après m'avoir déjà suivie en master 1 puis en master 2.

Je remercie **Maguy Eugène**, pour avoir accepté d'être ma tutrice pendant cette thèse : merci à toi pour toutes nos discussions, nos échanges (à propos de la thèse ou pas du tout), pour les soirées, et pour ce match de rugby au stade Marcel-Michelin, où je n'ai pas compris grand-chose et où il a fallu que tu me mettes les sous-titres tout du long, mais c'était super chouette !

Un merci tout particulier à **Vincent Largeau**. Sans toi cette thèse n'aurait pas été possible. Tu as été là à toutes les étapes : à la préparation des manips, à la prise et à la gestion des échantillons à l'étable (« Houstooooooooon !!! »), aux analyses d'une grande partie de ces fameux échantillons, aux traitements de certains résultats, le tout avec une efficacité incroyable et une rigueur dont on ne peut que s'inspirer. Même pendant la rédaction, j'ai pu compter sur toi pendant ces pauses qui vident la tête. Merci de m'avoir fait rire avec ton caractère encore plus râleur que le mien (c'est dire !), de m'avoir écouté pester quand je perdais patience, pour tes blagues nulles, toujours sur les mêmes thèmes. Merci aussi pour les soirées et les excursions.

De même, un immense merci à **Lucette Genestoux**. Comme Vincent, sans toi les manips, les échantillonnages et les analyses n'auraient pas été possibles. Merci d'avoir été toujours avec moi pour « chercher la source » auprès des vaches (on l'a toujours trouvée !), pour avoir supporté avec moi Vincent et son humour douteux, pour ton énorme contribution à la gestion des manips, et pour ta bonne humeur constante.

Je remercie également **Donato Andueza** (même si je n'ai toujours pas eu de gâteau !), pour tes coups de main, ta bonne humeur, et pour ta contribution au protocole de Proleval 2, *gracias Señor* ; et **Fabienne Picard**, pour avoir mis la main à la « pâte » pour les prélèvements sur Proleval 2, ces dimanches matin notamment, à ramasser du caca et pousser ce chariot. Merci aussi pour tous tes coups de main, nos échanges, ton précieux soutien quand j'en ai eu besoin, et pour avoir pris ma défense quand Donato était d'humeur blagueuse.

Je remercie **Didier Bany**, **Emilie Tixier** et **Isabelle Constant** pour vos contributions aux deux manips Proleval, de la préparation jusqu'aux dosages en passant par la prise et la gestion des échantillons.

Un immense merci à **Ophélie Dhumez**, pour avoir géré toute la partie « sachets » de la thèse, pour avoir répondu à mes innombrables questions méthodo, pour ta disponibilité et ton entrain.

Je remercie également les membres de **l'UMR MoSAR**, pour nos échanges toujours enrichissants et les bons conseils lors de mes brefs passages rue Claude Bernard et lors des JSPD-barbecue à Grignon.

J'en arrive à **l'équipe DINAMIC**, en particulier **Michel Doreau** pour toutes tes astuces d'écriture, **Gonzalo Cantalapiedra** pour tes explications à propos du  $^{15}\text{N}$  et tes relectures et **Isabelle Ortigues-Marty**, merci pour vos conseils, vos explications, votre aide précieuse pour rédiger un article scientifique. Merci à **Cécile Martin**, pour tes conseils et ton soutien ; **Sophie Laverroux**, pour ton aide logistique et nos discussions ; **Marine Gauthier** pour ta gestion des dosages DBP de Proleval 1 ; **Céline Chantelauze** pour ton aide aux dosages  $^{15}\text{N}$  ; **Julianne Pourrat**, pour ta contribution à l'aliquotage Proleval et pour nos discussions ; l'atelier fourrage **Aline Le Morvan**, **Angélique Torrent**, **Lorène Salis** et **Frédéric Anglard** pour votre contribution aux dosages Proleval 1 et 2 ; **Mathieu Silberberg** pour ton aide à la gestion du déménagement ; **Agnès Cornu** et **Josiane Portelli** pour nos discussions et votre soutien, **Jean Vernet** et **Christelle Philippeau** pour nos discussions au café. Et de manière générale, merci à toute l'équipe DINAMIC pour ces 3 ans parmi vous. J'en profite pour remercier chaleureusement **Anne-Marie Chanel**, pour ton énorme soutien logistique tout au long de ces 3 ans.

Je remercie les « Zizas », **Isabelle Veissier** puis **Isabelle Cassar-Malek** pour l'accueil au sein de l'UMRH pour ces 3 ans de thèse. J'en profite pour remercier aussi **Nathalie Gocel** et **Annie Royet** pour votre soutien administratif, toujours avec le sourire.

Je remercie particulièrement toute l'équipe des Cèdres, à commencer par **Sylvie Rudel**, pour ta disponibilité, ta bienveillance et ton aide, tant dans l'organisation des essais que dans le traitement des données zootechniques, merci pour tout ce que tu as fait. **Dominique Roux** ensuite, pour l'excellent accueil dont j'ai bénéficié dans ton équipe, ton aide, nos différents échanges et la gestion des essais. Je remercie ensuite **Lionel Mouly**, pour toute ton aide, ton efficacité, ton dévouement au bon déroulement des essais, à la gestion des animaux et à la prise d'échantillons (malgré ces vacutainers récalcitrants), merci aussi pour toutes nos discussions et ton soutien. Merci à **Gaël de Falvard**, pour ta bonne humeur, ton implication dans les essais, et pour m'avoir fait passer mon permis chariots. Merci aussi à **Viviane Tate**, pour ta bonne humeur, ton efficacité et nos discussions. Merci enfin à **François Rosa**, **Julien Bourdassol**, et **Jean-Noël Beaufile**, pour votre implication dans les essais Proleval, la gestion des animaux et des échantillons. Si tout s'est bien déroulé c'est grâce à vous tous ! Merci aussi aux différents CDD **Eva**, **Nicolas** et **Jeremy** pour vos coups de main.

J'en profite pour remercier les vaches du troupeau des Cèdres qui ont participé à Proleval 1 et 2, après tout les filles si vous n'aviez pas mangé la féverole et le lupin, on aurait été bien embêtés ! Merci pour vos drôles de grimaces, vos caractères parfois de cochons, et surtout pour votre bonne composition lors des manips.

Je remercie également le personnel de l'annexe élevage, **Denis Roux** et **Mickaël Bernard** pour votre aide pour la mise en place des essais sur moutons, ainsi que **Sébastien Alcouffe**, **Loïc Gaillard** et « **Dédé** » **André Guittard** pour la conduite des moutons et votre aide à la gestion des échantillons (merci spécial à Dédé, pour ta bonne humeur, ton efficacité et pour m'avoir fait découvrir la brioche à la tome de Cantal).

Je voudrais également remercier toute l'équipe du bloc, **Denys Durand**, **Juliette Cognié**, **Simon Collange** et **Julien Mongiat**, ainsi qu'une nouvelle fois l'équipe des Cèdres, en particulier **Dominique Roux** et **Lionel Mouly**. Malheureusement la plupart des moments que nous aurons partagés n'auront pas été heureux, mais je vous remercie tous pour votre soutien et la cohésion dans la recherche de solutions.

Je remercie également le personnel de la station expérimentale d'Arvalis, en particulier **Emily Meslier**, pour le très bon accueil dont j'ai bénéficié lors de ma courte visite à La Jaillère, et pour l'accueil des séries d'incubation de sachets rumen. De même, je remercie **Philippe Lambert** et toute l'équipe de Méjusse pour la prise en charge des incubations rumen et duodénum des aliments PROLEVAL.

Un merci chaleureux à toute l'équipe de **Valorex**, et en particulier à **Guillaume Chesneau**, **Guillaume Mairesse**, **Antoine Germain**, **Emmanuelle Certenais**, **Mathieu Guillevic**, **Benoît-Pierre Mourot**, **Élodie Besnier**, **Vincent Chatellier**, et **Bérénice Challe** pour votre accueil, nos échanges et discussions, que ce soit sur la thèse, PROLEVAL ou bien la vie dans l'entreprise ; ainsi qu'à **Gwendoline Provost**, pour ton aide lors de mes venues à Combourtillé.

J'en arrive maintenant à la fine équipe de l'Arche, la Dream Team (attention il y a du monde) : **Anne Ferlay**, « **Bichon** » **Julien Soulat** pour ces histoires que tu racontes si bien et tous tes suspenses « à la Julien », **Bruno Martin**, **Céline Boby**, « **Crousti** » **David Chadeyron**, **Cyril Labonne**, **Daoud Ounaissi**, **Didier Bany** pour tes conseils « voiture », **Emilie Tixier** pour les discussions poney, **Hélène Fougère**, **Jeanne Bazile**, **Jordann Domagalski** pour les dépannages informatiques rapides et efficaces parce que bien sûr les pannes arrivent toujours au meilleur moment, **José Pires** pour les conseils stats entre deux histoires plus ou moins douteuses (mais n'oublions pas qu'« on est ici pour *poublier* et emmerder ses collègues »), **Lucas Aguiar Prado**, **Luciano Barreto-Mendes** pour tes gâteaux hors du commun, **Lucille Rey**, **Laurence Bernard** pour ta bienveillance et toujours les mots qui rassurent et encouragent, **Madeline Koczura** pour ton coaching SAS et nos discussions poney, **Martine Turret** pour le fauteuil des confidences pour vider son sac ou lancer des fausses rumeurs, « **Mel Gibson** » **Mélissa Vauris**, **Mylène Delosière**, **Pascale Béraud** pour tes coups de main (et au fait « tu l'as vu ? »), **Pauline Denis**, « **les Piou-Piou** » **Thomas Léonardon & Benjamin Ribeiro**, **Sébastien Bes**, **Sylvain Emery** pour ta technique de séchage des chaussettes, **Sylvie Bardou-Valette**, **Thais Devincenzi** c'était super cool de bosser avec toi sur Proleval, **Vincent Largeau**, **Yannick Faulconnier**, **Yoan Gaudron**, et j'y associe aussi **Nicolas Gérard**. Merci de m'avoir « adoptée » pour mes 2 dernières années de thèse, pour cette si belle ambiance,

pour les fous rires le midi, pour toutes les anecdotes drôles que vous racontez si bien, pour m'avoir appris à jouer à la belotte et à la coinche, pour les discussions plus ou moins philosophiques, et merci à tous pour les repas, les sorties, les pique-niques ou les restos, les bowlings et les mölkkky... j'ai passé des moments inoubliables avec vous.

Merci également à tous les thésards, post-docs, stagiaires et CDD que j'ai croisé pendant ces 3 ans, lors des cafés non-tit ou autres. Merci notamment aux « vieux » thésards et aux post-docs pour leur précieux conseils scientifiques, techniques, organisationnels mais surtout administratifs, heureusement que vous étiez là **Clothilde Villot, Morgane Costes-Thiré, Bénédicte Yanibada, « Taty Hélène » Hélène Fougère, Adeline Bougouin, Thais Devincenzi, Mohammed Ben Aouda, Julien Soulat, Madeline Koczura**. Merci aussi aux plus « jeunes » thésards pour tous ces bons moments passés ensemble dans la même galère, **Bertrand Deroche, Louise Bacher, Pierre-Alexis Billa, Pablo Guarnido, Lucille Rey, Pauline Denis** et j'y associe aussi **Marjorie Cellier**. Et surtout surtout, merci à mes deux jumelles de thèse, notre trio de choc, **Louise Forteau et Jeanne Bazile**, heureusement que vous étiez là les filles, du début à la fin depuis cette fameuse organisation de la JDD UMRH 2017, pour tous ces moments à l'INRA et à l'extérieur, du fond du cœur merci (et mention spéciale à Jeanne pour l'instauration du concours du Meilleur Pâtissier de l'Arche et Amis, qu'est-ce qu'on aura mangé comme gâteaux pendant ces 3 ans !).

J'en arrive à remercier « mes » stagiaires, **Noémie Rollet et Pauline Denis**. Noémie on s'est un peu moins côtoyées mais je retiens ton fantastique dynamisme, ta bonne humeur et ton enthousiasme. Ça a été un réel plaisir de travailler avec toi. Quant à Pauline, merci infiniment pour tout le travail que tu as fourni, avec rigueur, enthousiasme et curiosité, pour m'avoir aidée dans cette gigantesque tâche qu'a été la construction-homogénéisation-codage des bases de données, et pour ton excellente compagnie, au bureau, à l'étable, en pause ou même en dehors de l'INRA.

À mes co-bureaux de l'ambiance, dans la cave du bloc I, « **Mel Gibson** » **Mélissa Vauris** et « **Paul de Vannes** » **Paul Montoir**, merci pour tous ces fous rires dans le bureau, nos discussions, nos chansons, les soupirs inimitables de Mel Gibson (« c'est la maladie ! »), les expressions de Paul de Vannes, presque aussi bien que les miennes, les pétages de câble plus ou moins justifiés, et tout votre soutien. Merci les copains, grâce à vous Gandalf (pour le cerveau) et Baby Groot (pour le fun) ont veillé sur mes 2 dernières années de thèse... Merci aussi à mes co-bureaux du 4<sup>ème</sup> étage du bloc II, **Bertrand Deroche** et **Louise Bacher**, on aura bien rigolé nous aussi, bien papoté, appris à parler Wookie, fait des pauses-sketches, philosophé...

Une pensée pour **Rémy Delagarde** et **Alexia Charpentier**, si mon stage de M2 n'avait pas été aussi génial je ne me serais peut-être pas lancée dans l'aventure de la thèse. Merci à vous.

Réussir la thèse a nécessité des coupures, des moments où le boulot n'existait plus : *mens sana in corpore sano*, dit-on. *Corpore sano* je ne sais pas (surtout après tous ces

apéros !) mais *mens sana*, c'est grâce aux fantastiques moments passés au **Haras de Prat**. Je voudrais donc remercier toute la Team Prat du fond du cœur, et attention là aussi il y a du monde !

Tout le staff du Prat : **Julie Brioude, Alexia Peyrard, Marie Chaussade, Jean-Marc Aunac**, et « **Papé** » **Milou Brioude**, pour tout ce que vous faites pour nous et pour nos Poneys. Mention spéciale à Marie et Alex, vous êtes des monitrices extras ; et Julie, meilleure coach de tous les temps.

Toute la Team Prat : **Jenn' & Urtigão, Rémi & Urtigão, Margaux & Surcouf & Kyron & Bollywood, Ptite Margaux & Sultan & Bollywood, Lou-Ann & Balji, Perrine & Vennerie, Solenn & Seigneur** (« FlanFlan la Tulipe »), **Minouche & Sparky & Chewbakka**, « **Tic et Tac** » **Elodie & Bjorck** et **Audrey & Alkane, Domitille & Anémone & Quopin, Lucie & Néfertiti, Romane & Régisse « de Nice** » (« la n'Amoureuse »), **Quentin & Orian** (« Chonchon »), pour tous ces longs moments au camion dans le froid glacial ou en pleine cagne, sur les tours, pour votre présence lors des podiums et des défaites ; et pour avoir partagé l'expérience de Lamotte avec certains d'entre vous. Même si elles ne sont pas vraiment du Prat j'associe à ces moments **Katty Mercier** et **Charlotte Chandèze & Azalliah** (« Zouille »), en souvenir de la Team des Prat'sque Parfaits et de tous les autres concours où on s'est croisées.

Tous les proprios : **Alexia & Sky, Régis** (« de la Police ») & **Tempo, Mélina & Urtis, Béatrice & Farouk, Clémence & Venise, Laet' & Coco & Fifi, Nana & Cacharel** (on se souviendra longtemps de cette fameuse tempête, à patauger dans la boue avec Alex et toi pour vérifier les clôtures), **Sylvia & Neptune, Marion & Come On, Marion & Doma, Lesslie & Echo, Manon & Fly, Camille & Anatole** (« La Tuile ») + tous ceux déjà cités juste au-dessus et tous les autres, merci pour toutes les balades, les cours, les échanges, les conseils, les astuces, et surtout les apéros, les soirées, et les Diners Presque Parfaits !

Tous les cavaliers du club : merci **Lara, Léa, Karine, Lilou, Erine, Cédric, Pauline, Louise, Chachou, Lilly, Mylène, Clémence, Véro, Anne, Clara, Emma, Loïc, Mandar, Céline, Cécile, Sandrine, Marie, Marijan** et les autres pour tous ces bons moments dans les écuries.

Et enfin la Team des Papas et des Mamans : **Alexandrine, Jean-Mi** (un immense merci pour toutes tes magnifiques photos) & **Agnès, Dimitri & Josiane, Sylvain & Céline** (merci aussi pour tes super photos), **Franck, Aurélie, Delphine, Laurent**, pour tous vos coups de main, toutes nos discussions et tous ces moments partagés à la maison ou en concours.

Un immense merci à vous tous pour tout ce que vous avez fait pour Un Bord et moi pendant ces 38 mois.

Un petit mot pour **Un Bord**, merci mon Poney de me porter sur ton dos, pour les séances de dressage jusqu'à avoir mal partout, les séances d'obstacles où on s'envole, les prom'-prom' gastronomiques pour ne rien faire, les balades au galop « vent-du-cul-la-plaine » pour s'aérer les neurones, les séances à pieds et tous les moments du quotidien, sans oublier les performances en concours et ces trois Championnats de France... Et rien de tout ça n'aurait été possible sans la **famille Lemoine**, grosse pensée pour **Jean-Claude**,

**Josseline**, « **Paulo** » **Paul-Emmanuel** et **Samuel**, merci de m'avoir fait confiance et pour tout ce que vous avez fait pour lui et moi. Et merci **Maman**, sans lui ça n'aurait pas été pareil...

Je n'oublie pas mes amis, Les Agros **Anne**, **Laetitia**, **Emilie**, **Leslie**, **Alice & Alex**, « **Bichou** » **Sébastien**, « **Chouise** » **Coralline**, **Diane**, **Yoze**, **Marine**, **Guillaume**, **Thomas**, **Claire**, **Pi-Axe** bien sûr ; ainsi que toutes les valeurs ajoutées qu'on a adoptées : **Henri**, **Nicolas**, **Sylvain**, **Florence** et **Vincent**. Et les Léodégariens & Rambolitains, **Laure**, **Domitille** et **Pierrick**. Merci d'avoir toujours été là.

**Pierre-Alexis**, merci de m'avoir suivie jusqu'en Auvergne, merci pour ton soutien, nos escapades, pour nous supporter au quotidien mon caractère et moi, pour partager ma vie (et celle d'Un Bord) et pour tout le reste.

À mes frangines les **Germaine**, **Euryale** et **Tiphaine**. À mon **Papa Marc**. À ma **Maman Françoise**, qui après avoir été enchantée de voir sa fille aînée en stage de fin d'études ingénieur « ramassage et triage de crottes de chèvres » s'est émerveillée de la voir faire une thèse « ramassage et touillage de bouses de vaches ». À ma **p'tite Mamie Danielle** et à mon **Mon'Onk' Jean Michel**. À ma **Mamie Lucie** et à mon **Pépé Henri**. À ma **Tante Édith**, et à **Michel**. Merci pour votre soutien indéfectible, et ce depuis toujours, merci d'avoir toujours fait en sorte que tout se passe pour le mieux pour moi, et merci d'avoir géré, à tour de rôle ou tous en même temps, les doutes et les inquiétudes. Si j'en suis là aujourd'hui c'est grâce à vous.



# Résumé

## Utilisation digestive des graines protéagineuses traitées, et leur valorisation par les vaches laitières

Dans un contexte où le tourteau de soja importé d'Amérique (le plus souvent OGM et cause d'une importante déforestation) pour l'alimentation des animaux d'élevage est pointé du doigt, des alternatives à son utilisation dans l'alimentation des vaches laitières sont étudiées. Par exemple, l'utilisation des graines protéagineuses (féverole, lupin, pois) produites en France, du fait de leur teneur en protéines intéressante, pourrait être un moyen. Mais, distribuées crues aux animaux, leurs protéines sont très dégradables dans le rumen, ce qui pénalise leur valeur azotée pour le ruminant. Une possibilité est d'appliquer à ces graines des traitements thermiques pour protéger leurs protéines d'une trop forte dégradabilité dans le rumen.

L'objectif de cette thèse, conduite dans le cadre du projet PROLEVAL, était de tester des combinaisons « matière première × traitement technologique » pour optimiser la dégradation des protéines de graines protéagineuses dans le rumen, sans altérer leur digestibilité dans l'intestin. Suite à des essais préalables *in vitro* et *in situ*, des régimes à base de féverole et de lupin, distribués crus ou extrudés selon différentes conditions, ont été testés lors de deux essais *in vivo* sur vaches laitières, dans lesquels les rations étaient iso-protéiques et la méthionine non limitante. Le 1<sup>er</sup> essai comparait l'utilisation du tourteau de soja à la féverole ou au lupin, distribués crus, extrudés à 140°C et extrudés à 160°C. Les différents résultats ont montré que le tourteau de soja peut être remplacé par de la féverole ou du lupin sans altérer significativement les performances laitières des vaches. À 140°C, des réactions de Maillard ont permis la protection des protéines d'une trop grande dégradabilité ruminale par rapport aux graines crues, sans altérer l'absorption des acides aminés dans l'intestin grêle, entraînant une meilleure production laitière avec la féverole. En revanche, à 160°C, ces réactions ont semblé trop protéger les protéines, qui ont été moins bien absorbées dans l'intestin. Dans le 2<sup>ème</sup> essai, de la féverole a été distribuée crue, extrudée à 140°C comme dans le 1<sup>er</sup> essai, et extrudée à 140°C après une maturation spécifique visant à améliorer la complexation des protéines avec des sucres exogènes (maturation avec des sucres réducteurs) ou endogènes (libérés par maturation avec un cocktail enzymatique). Les différents résultats ont confirmé que l'extrusion à 140°C de la féverole protège les protéines de la dégradation ruminale. L'ajout de sucres réducteurs a conduit à une surprotection des protéines, dont les acides aminés ont été moins bien absorbés dans l'intestin grêle. L'addition du cocktail enzymatique a en revanche conduit à un niveau d'absorption des acides aminés dans l'intestin grêle similaire à celui obtenu avec la féverole extrudée à 140°C sans condition de maturation spécifique.

En parallèle de ces essais, une synthèse bibliographique quantitative a été réalisée sur l'utilisation des graines protéagineuses, crues et traitées technologiquement, dans l'alimentation des vaches laitières. Les résultats confirment ceux obtenus *in situ* et *in vivo* dans le cadre de cette thèse : les traitements technologiques protègent les protéines de la dégradation dans le rumen mais les bénéfices de cette protection sur les performances zootechniques des animaux nécessitent une bonne maîtrise du traitement appliqué.

En conclusion, les graines protéagineuses peuvent remplacer le tourteau de soja dans l'alimentation des vaches laitières, sous réserve d'un traitement technologique adapté.

**Mots-clés :** graines protéagineuses, féverole, lupin, extrusion, protéines, vaches laitières

# Abstract

---

## Digestive use of treated proteaginous seeds, and their valuation by dairy COWS

Importation of soybean meal from America, which are most often GMO and cause of significant deforestation, is nowadays increasingly questioned in animal feeding. For dairy cows, alternatives such as French produced proteaginous seeds (faba bean, lupin, pea) are investigated, because of their interesting protein content. However, when distributed raw to animals, their proteins are very degradable in the rumen, which penalizes their nitrogen value for ruminants. One possibility is to apply heat treatments to these seeds to protect their proteins from too high degradability in the rumen.

The objective of this thesis, conducted as part of the PROLEVAL project, was to test combinations of "raw material × technological treatment" to optimize the degradation of proteaginous seeds' proteins in the rumen, without altering their digestibility in the intestine. Following *in vitro* and *in situ* experiments, diets containing faba bean and lupin distributed raw or extruded under different conditions were tested in two *in vivo* experiments on dairy cows. Diets were iso-crude protein and non-limiting methionine. The first experiment compared soybean meal with faba bean or lupin, distributed raw, extruded at 140°C and extruded at 160°C. The different results showed that soybean meal could be replaced by faba bean or lupin without significantly altering the dairy performance of cows. On one hand, at 140°C, Maillard reactions led to protection of proteins from ruminal degradability compared with raw seeds, without altering the absorption of amino acids in the small intestine, leading to better milk production with faba bean. On the other hand, at 160°C, these reactions seemed to overprotect the proteins, which were less absorbed in the intestine. In the 2<sup>nd</sup> experiment, faba bean was distributed raw, extruded at 140°C in the same way as in the 1<sup>st</sup> experiment, and extruded at 140°C after a specific maturation, which aimed at improving the complexation of proteins with exogenous sugars (maturation with reducing sugars) or endogenous (released during maturation with an enzymatic cocktail). The different results confirmed that extrusion at 140°C of faba bean protects proteins from ruminal degradation. On one hand, addition of reducing sugars led to overprotection of the proteins, whose amino acids were less absorbed in the small intestine. On the other hand, addition of the enzymatic cocktail led to a level of absorption of amino acids in the small intestine similar to the one obtained with faba bean extruded at 140°C without specific maturation conditions.

In addition to these experiments, a quantitative bibliographic synthesis was carried out on the use of proteaginous seeds, raw and technologically treated, in dairy cow diets. The results confirm those obtained *in situ* and *in vivo* in the context of this thesis: technological treatments protect proteins from degradation in the rumen, but the benefits of this protection on the zootechnical performance of animals require good control of the applied treatment.

In conclusion, proteaginous seeds can replace soybean meal in dairy cow diets, when subjected to the appropriate technological treatment.

**Key words:** proteaginous seeds, faba bean, lupin, extrusion, proteins, dairy cows

# Liste des travaux

---

## I. Articles rédigés

**Mendowski, S.**, P. Chapoutot, G. Chesneau, A. Ferlay, F. Enjalbert, G. Cantalapiedra-Hijar, A. Germain, and P. Nozière. 2019. Effects of replacing soybean meal with raw or extruded blends containing faba bean or lupin seeds on nitrogen metabolism and performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 102:5130-5147

**Mendowski, S.**, P. Chapoutot, G. Chesneau, A. Ferlay, F. Enjalbert, G. Cantalapiedra-Hijar, A. Germain, and P. Nozière. 2019. Effects of maturation with reducing sugars or an enzymatic cocktail before extrusion of faba bean on nitrogen metabolism and performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 103:396-409

**Mendowski, S.**, P. Nozière, A. Ferlay, P. Denis, G. Chesneau, and P. Chapoutot. Raw or technologically treated proteaginous seeds as alternatives to soybean meal for dairy cows: comparative evaluation by meta-analysis of in situ and in vivo digestive parameters, nitrogen partition and dairy performance. *En préparation pour Animal Feed Science and Technology*

## II. Communications lors de congrès

### 1. Communications orales « flash »

**Mendowski, S.**, P. Chapoutot, A. Ferlay, G. Chesneau, F. Enjalbert, V. Largeau, L. Genestoux, and P. Nozière. 2018. Influence of extruded faba bean-linseed or lupin-linseed blends on nitrogen partitioning in dairy cows. 10<sup>th</sup> International Symposium on the Nutrition of Herbivores. 2-6 septembre 2018. Clermont-Ferrand, France. p198.

**Mendowski, S.**, P. Chapoutot, A. Ferlay, G. Chesneau, F. Enjalbert, A. Germain, V. Largeau, L. Genestoux, S. Rudel, et P. Nozière. 2018. Utilisation digestive des graines protéagineuses traitées et leur valorisation par les vaches laitières. 2<sup>ème</sup> Rencontres Francophones sur les Légumineuses. 17-18 octobre 2018. Toulouse, France. p60.

### 2. Posters

**Mendowski, S.**, P. Chapoutot, A. Ferlay, G. Chesneau, F. Enjalbert, V. Largeau, L. Genestoux, and P. Nozière. 2018. Influence of extruded faba bean-linseed or lupin-linseed blends on nitrogen partitioning in dairy cows. 10<sup>th</sup> International Symposium on the Nutrition of Herbivores. 2-6 septembre 2018. Clermont-Ferrand, France. p198.

Nozière, P., **S. Mendowski**, P. Chapoutot, D. Sauvant, and G. Cantalapiedra-Hijar. 2018. A model of urinary nitrogen excretion: a way to assess diet protein value at individual level? 10<sup>th</sup> International Symposium on the Nutrition of Herbivores. 2-6 septembre 2018. Clermont-Ferrand, France. p139.

Chapoutot, P., O. Dhumez, G. Chesneau, A. Germain, **S. Mendowski**, and P. Nozière. 2018. Influence de l'extrusion sur la dégradabilité de l'azote de mélanges à base de féverole ou de lupin et effet de la distribution granulométrique des produits. 24<sup>ème</sup> Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants. 5-6 décembre 2018. Paris, France. 24:196.

### **III. Autres communications**

Chesneau, G., **S. Mendowski**. 2019. Les graines protéagineuses peuvent-elles remplacer le tourteau de soja dans l'alimentation des animaux ? Projet PROLEVAL. L'efficacité des protéagineux chez les ruminants. In Les oléo-protéagineux ont des atouts ! Performances, autonomie protéique et durabilité des élevages. Les rendez-vous de l'INRA au SPACE. 10 septembre 2019. Rennes, France.

# Table des matières

---

Introduction générale.....	1
<b>I. Contexte .....</b>	<b>1</b>
<b>II. Présentation du projet PROLEVAL .....</b>	<b>2</b>
<b>III. Présentation du travail de thèse .....</b>	<b>3</b>
Étude bibliographique.....	5
<b>I. La digestion des protéines chez les ruminants .....</b>	<b>5</b>
<b>1. Physiologie digestive .....</b>	<b>6</b>
<i>a. Anatomie du système digestif des ruminants .....</i>	<i>6</i>
<i>b. Transit des particules et dégradation des constituants alimentaires .....</i>	<i>8</i>
<i>c. Digestion des protéines et devenir des acides aminés digestibles .....</i>	<i>9</i>
<b>2. Mesures de la valeur azotée des aliments et des rations .....</b>	<b>13</b>
<i>a. Mesures in vivo.....</i>	<i>13</i>
<i>b. Mesures in situ .....</i>	<i>16</i>
<i>c. Mesures in vitro .....</i>	<i>18</i>
<b>3. Calcul des valeurs PDI et BalProRu .....</b>	<b>19</b>
<b>II. Les graines protéagineuses.....</b>	<b>20</b>
<b>1. Description des graines protéagineuses .....</b>	<b>20</b>
<i>a. Aspect et composition chimique.....</i>	<i>20</i>
<i>b. Un peu d'agronomie .....</i>	<i>22</i>
<i>c. Un peu d'histoire.....</i>	<i>25</i>
<b>2. Utilisation des graines protéagineuses en alimentation animale.....</b>	<b>27</b>
<i>a. Chez les monogastriques .....</i>	<i>27</i>
<i>b. Chez les ruminants.....</i>	<i>28</i>
<b>III. Les procédés technologiques .....</b>	<b>30</b>
<b>1. Procédés mécaniques.....</b>	<b>31</b>
<b>2. Procédés thermiques .....</b>	<b>32</b>

3. Procédés thermomécaniques.....	33
<b>Objectifs, hypothèses et stratégies de travail .....</b>	<b>36</b>
<b>I. Objectifs et stratégies du travail de thèse.....</b>	<b>36</b>
<b>II. Axe 1.....</b>	<b>37</b>
<b>III. Axe 2.....</b>	<b>38</b>
<b>IV. Axe 3.....</b>	<b>38</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>39</b>
<b>I. Effets du remplacement du tourteau de soja par des mélanges contenant de la féverole ou du lupin crus ou extrudés sur l'utilisation des protéines et les performances des vaches laitières .....</b>	<b>39</b>
<b>II. Effets de l'ajout de sucres réducteurs ou d'un cocktail enzymatique lors de la phase de maturation avant extrusion de la féverole sur l'utilisation des protéines et les performances des vaches laitières .....</b>	<b>58</b>
<b>III. Mesures complémentaires sur les aliments et les résidus de dégradation <i>in sacco</i> .....</b>	<b>73</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>73</b>
<i>a. Réactions de Maillard.....</i>	<i>73</i>
<i>b. Dégradation ruminale et digestibilité réelle dans l'intestin .....</i>	<i>74</i>
<b>2. Matériels et méthodes .....</b>	<b>75</b>
<i>a. Aliments étudiés.....</i>	<i>75</i>
<i>b. Mesures des composés de Maillard et de la lysine .....</i>	<i>76</i>
<i>c. Incubations in sacco .....</i>	<i>76</i>
<b>3. Résultats et discussion .....</b>	<b>77</b>
<i>a. Caractérisation visuelle des aliments testés.....</i>	<i>77</i>
<i>b. Composés de Maillard et lysine dans les aliments .....</i>	<i>78</i>
<i>c. Disparition in sacco dans le rumen et l'intestin.....</i>	<i>80</i>
<b>4. Conclusion .....</b>	<b>83</b>

<b>IV. Analyse quantitative des données issues de la bibliographie ....</b>	<b>85</b>
Discussion générale.....	146
<b>I. Les principales conclusions .....</b>	<b>146</b>
1. Effets de la substitution du tourteau de soja par de la féverole et du lupin, crus ou extrudés .....	146
2. Effets des procédés technologiques sur la valorisation de la féverole et du lupin .....	148
3. Limitation en méthionine .....	150
<b>II. Les aspects innovants de la thèse .....</b>	<b>151</b>
1. L'analyse des composés de Maillard.....	151
a. L'extrusion conduit à des réactions de Maillard dont la nature et la quantité des produits sont difficiles à prévoir .....	151
b. Les CML sont peu dégradables dans le rumen mais très digestibles dans l'intestin.....	152
c. La lysine est un indicateur de la protection des protéines dans le rumen .....	154
2. Analyse des conditions d'extrusion .....	156
<b>III. Les limites des approches utilisées .....</b>	<b>157</b>
1. Les mesures <i>in vivo</i> .....	157
2. Les méthodes d'estimation de la valeur azotée des protéagineux.....	159
a. Mesure de la dégradabilité théorique de l'azote dans le rumen .....	159
b. Mesure de la digestibilité réelle intestinale de l'azote.....	163
c. Synthèse protéique microbienne.....	164
<b>IV. Perspectives .....</b>	<b>165</b>
1. Influence des traitements technologiques .....	166
2. Évaluation de la valeur PDI des protéagineux .....	167
3. Aspects économiques .....	169
Conclusion .....	171
Références bibliographiques .....	173

Annexe(s).....	182
<b>I. Annexe 1 : Matériels et méthodes détaillés des incubations <i>in sacco</i> .....</b>	<b>182</b>
<b>II. Annexe 2 : structure des bases de données <i>in vivo</i> et <i>in situ</i> .....</b>	<b>184</b>

# Liste des figures

---

Figure 1 : les 8 volets du projet PROLEVAL .....	3
Figure 2 : acides aminés et liaison peptidique.....	5
Figure 3 : schéma du tube digestif d'une vache laitière (image © Pearson Education, Inc. Publishing as Benjamin Cummings) .....	6
Figure 4 : les 3 phases du contenu ruminal, d'après Nozière (2017) .....	7
Figure 5 : Photos (de gauche à droite) des parois internes du rumen (sac dorsal et sac ventral) et du réseau (photos INRA), et du feuillet et de la caillette avec ouverture sur le duodénum (Montagne, 2013) .....	8
Figure 6 : contribution respectives calculées des acides aminés microbien (PDIM) et alimentaires (PDIA) aux protéines métabolisables chez la vache laitière (d'après Hristov et al., 2019).....	11
Figure 7 : les grands mécanismes de la digestion chez le ruminants, adapté de Cuvelier et al. (2015) .....	12
Figure 8 : vaches laitières dans des stalles de digestibilité (photo INRA).....	13
Figure 9 : sachets rumen et sachets mobiles .....	17
Figure 10 : plant fleuri et graines de féverole (de gauche à droite ; images Terres Univia, 2019a et Meyer, 2019) .....	21
Figure 11 : plants fleuris de lupin blanc, lupin à feuilles étroites, lupin jaune, et graines de lupin blanc (de gauche à droite ; images Terres Inovia, 2019 et Weber, 2017).....	21
Figure 12 : plant fleuri et graines de pois protéagineux (de gauche à droite ; images Terres Univia, 2019c et Agri semences, 2014) .....	22
Figure 13 : surfaces cultivées de féverole en 2017 en France (Terres Univia, 2018a) .....	23
Figure 14 : surfaces cultivées de lupin en 2017 en France (Terres Univia, 2018a) .....	24
Figure 15 : surfaces cultivées de pois en 2017 en France (Terres Univia, 2018a).....	25
Figure 16 : schéma général d'un procédé technologique (d'après Kaysi et Melcion, 1992)....	31
Figure 17 : schéma d'un extrudeur monovis (d'après Kaysi et Melcion, 1992 et Berger et al., 1992).....	34
Figure 18 : schémas d'un sachet de nylon cylindrique SEFAR soudé à ultrason et fermé par thermo-soudure (sachet rumen, à gauche), et d'un sachet de nylon SEFAR plié en deux et cousu sur trois côtés (sachet duodénum, à droite).....	77
Figure 19 : Effet de l'extrusion sur la couleur des mélanges féverole + lin ou lupin + lin.....	78
Figure 20 : les différentes fractions azotées dans le lait.....	147
Figure 21 : estimation de la digestibilité apparente de la CML des aliments expérimentaux à partir de la proportion de CML apportée par l'aliment expérimental dans la ration, et la digestibilité apparente de la CML totale dans la ration.....	153
Figure 22 : comparaison méthodologique : DT <sub>6N</sub> issue des mesures <i>in sacco</i> en fonction de la DT <sub>6N</sub> estimée par la DE1 .....	160
Figure 23 : dr <sub>N</sub> en fonction des PIA <sub>6</sub> calculée à partir des mesures <i>in sacco</i> .....	163

# Liste des tableaux

---

Tableau 1 : composition chimique des graines de lupin, féverole et pois.....	22
Tableau 2 : efficacité d'utilisation et valeur azotée de différentes graines protéagineuses .....	29
Tableau 3 : rappel des aliments testés et de leurs procédés technologiques .....	75
Tableau 4 : composés de Maillard des différents aliments expérimentaux.....	79
Tableau 5 : dégradabilité et disparition <i>in sacco</i> de l'azote dans le rumen, l'intestin et l'ensemble du tube digestif .....	80
Tableau 6 : disparition <i>in sacco</i> de la lysine dans le rumen, l'intestin et l'ensemble du tube digestif.....	82
Tableau 7 : disparition <i>in sacco</i> de la CML dans le rumen, l'intestin et l'ensemble du tube digestif.....	83
Tableau 8 : Valeurs de méthionine digestible des régimes expérimentaux avant et après supplémentation en méthionine protégée .....	151
Tableau 9 : comparaison des différentes méthodes d'évaluation de la DT <sub>6N</sub> .....	159
Tableau 10 : effets de l'extrusion sur les dérivés des bases puriques .....	165

# Liste des abréviations

---

<b>a</b> : fraction soluble.....	p17
<b>AA</b> : acides aminés.....	p8
<b>AADI</b> : acides aminés digestibles dans l'intestin.....	p162
<b>AGV</b> : acides gras volatils.....	p8
<b>AmiD_int</b> : amidon digestible dans l'intestin.....	p19
<b>b</b> : fraction potentiellement dégradable.....	p17
<b>BalProRu</b> : balance protéique du rumen.....	p10
<b>c</b> : vitesse de dégradation de la fraction dégradable.....	p17
<b>CH<sub>4</sub></b> : méthane.....	p8
<b>CML</b> : Nε-carboxyméthyl-lysine.....	p 74
<b>CO<sub>2</sub></b> : dioxyde de carbone.....	8
<b>DE1</b> : dégradabilité enzymatique 1 h.....	p18
<b>digApp</b> : digestibilité apparente.....	p13
<b>dr</b> : digestibilité réelle.....	p9
<b>dr<sub>N</sub></b> : digestibilité réelle de l'azote.....	p18
<b>DT</b> : dégradabilité théorique.....	p9
<b>DT<sub>6N</sub></b> : dégradabilité théorique de l'azote calculée pour un taux de sortie des particules du rumen constant de 6%/h.....	p17
<b>DT<sub>N</sub></b> : dégradabilité théorique de l'azote.....	p9
<b>FAN</b> : facteurs antinutritionnels.....	p27
<b>HMF</b> : 5-hydroxyméthylfurfural.....	p74
<b>INRA</b> : institut national de la recherche agronomique.....	p2
<b>kct</b> : taux de transit du concentré.....	p17
<b>kft</b> : taux de transit du fourrage.....	p17
<b>klt</b> : taux de transit de la phase liquide.....	p17
<b>kp</b> : taux de transit des particules.....	p 17
<b>LysDI</b> : lysine digestible dans l'intestin.....	p162
<b>MAT</b> : matière azotée totale.....	p10
<b>MetDI</b> : méthionine digestible dans l'intestin.....	p150
<b>MG</b> : matière grasse.....	p21
<b>MO</b> : matière organique.....	p19
<b>MOF</b> : matière organique fermentescible.....	p19
<b>MP</b> : matière protéique.....	p168
<b>MS</b> : matière sèche.....	p21
<b>N</b> : azote.....	p13
<b>NDF</b> : neutral detergent fiber (fibre insoluble dans le détergent neutre).....	p19
<b>NDFD_int</b> : NDF digestible dans l'intestin.....	p19
<b>NH<sub>3</sub></b> : ammoniac.....	p8
<b>OGM</b> : organisme génétiquement modifié.....	p1
<b>ORO</b> : orifice réticulo-omasal.....	p8
<b>PAC</b> : politique agricole commune.....	p25
<b>PANDI</b> : protéines alimentaires non digestibles dans l'intestin.....	p14
<b>PCO</b> : pourcentage de concentré dans la ration.....	p18
<b>PDI</b> : protéines digestibles dans l'intestin.....	p10
<b>PDIA</b> : protéines digestibles dans l'intestin d'origine alimentaire.....	p10
<b>PDIM</b> : protéines digestibles dans l'intestin d'origine microbienne.....	p10
<b>pH</b> : potentiel hydrogène.....	p6
<b>PROLEVAL</b> : protéagineux, oléagineux, valorisation animale.....	p2
<b>TB</b> : taux butyreux.....	p29
<b>TD</b> : tube digestif.....	p6
<b>TP</b> : taux protéique.....	p147
<b>VL</b> : vache laitière.....	p 6

# Introduction générale

---

## I. Contexte

Chaque année, la France importe plus de 3 millions de tonnes de tourteau de soja, principalement pour l'alimentation des animaux d'élevage (Terres Univia, 2017a) ; Terres Univia, 2018a). Ce soja est principalement produit en Amérique, en particulier aux États-Unis d'Amérique, au Brésil et en Argentine (Terres Univia, 2017a). En effet, seulement 414 000 tonnes de soja ont été produites en France sur la campagne 2017 (Terres Univia, 2018a), ce qui est largement insuffisant pour couvrir les besoins français pour cette matière première. En effet, très riche en protéines, le tourteau de soja est un aliment largement utilisé en élevage, à la fois pour les monogastriques et les ruminants, et constitue la principale source de protéines végétales pour l'alimentation animale. Cependant, le tourteau de soja est désormais pointé du doigt par les consommateurs des produits issus de l'élevage. En effet, les attentes sociétales évoluent, et les consommateurs sont de plus en plus sensibles au fait de se procurer des denrées produites localement, sans utilisation d'organismes génétiquement modifiés (OGM), et avec une bonne traçabilité (Duc et al., 2010). Or, le tourteau de soja cultivé en Amérique est le plus souvent OGM, et son importation depuis ces pays ne permet pas une traçabilité parfaite (Froidmont et Bartiaux-Thill, 2004). De plus, les grandes cultures de soja en Amérique du Sud sont émettrices de gaz à effet de serre, du fait de l'importante déforestation pour permettre l'implantation des champs de soja (Karstensen et al., 2013). Enfin, le transport de ces graines depuis l'outre Atlantique jusqu'en France n'est pas sans impact écologique.

Une alternative à l'utilisation du tourteau de soja dans l'alimentation des animaux d'élevage est étudiée depuis une quarantaine d'années via l'utilisation des graines protéagineuses, telles que le pois, la féverole, ou le lupin, comme en témoignent divers travaux (Guillaume et al., 1987 ; Khorasani et al., 2001 ; Cherif et al., 2018). En effet, ces graines contiennent une quantité de protéines importante (bien que toutefois inférieure à celle du tourteau de soja), mais leur valeur alimentaire est moindre par rapport à celle du tourteau de soja, du moins lorsque ces graines sont distribuées crues aux animaux. De plus, les cultures de protéagineux (pois, soja, féverole et lupin) tendent à se développer en France depuis 2013, notamment la culture du soja (Terres Univia, 2017b). La France est l'actuel premier producteur européen de féverole et de pois. L'utilisation de ces graines produites en France à la place du tourteau de soja importé permettrait de réduire la dépendance française vis-à-vis des pays américains en matière de protéines végétales, et ainsi d'améliorer l'autonomie alimentaire. D'un point de vue économique, la tonne de pois est moins chère que la tonne de tourteau de soja (185 et environ 300 euros la tonne, respectivement, pour le mois de mai 2019, Terre-net, 2019 ; Web-agri, 2019). Cependant, si on ramène ces prix à la tonne de matière azotée, le pois devient plus cher

que le tourteau de soja (794 € contre 570 € la tonne de matière azotée du pois et du tourteau de soja, respectivement).

## II. Présentation du projet PROLEVAL

C'est dans ce contexte de développement d'alternatives au tourteau de soja en alimentation animale que le projet PROLEVAL a été créé. Le projet PROLEVAL, pour « PROtéagineux, oLEagineux, VALorisation animale », est porté par l'entreprise Valorex, et est conduit en partenariat avec l'institut de recherches public INRA (Institut National de Recherches Agronomiques) et les coopératives agricoles Terrena et Dijon Céréales. Ce projet était programmé initialement sur une durée de 5 ans (2015-2020), puis prolongé de 12 mois (mars 2020 – mars 2021), pour un budget total de 17 millions d'euros. Son objectif est la mise en place d'une filière française de production et de transformation de graines oléo-protéagineux (féverole, lupin, pois et lin) pour alimenter les monogastriques et les ruminants. En effet, la filière des graines oléo-protéagineuses, oubliée en France depuis la seconde Guerre Mondiale, est aujourd'hui freinée par le manque de connaissances sur les itinéraires culturaux à mettre en œuvre pour optimiser la production de ces graines. De plus, la sélection des graines protéagineuses s'effectue actuellement principalement sur le critère « teneur en facteurs antinutritionnels faible ». Pour le volet production des graines, dans le cadre du projet PROLEVAL, la sélection s'effectue sur le critère « haute teneur en protéines » des graines. Pour le volet transformation, des procédés technologiques sont développés afin de diminuer au maximum les facteurs antinutritionnels pour l'alimentation des monogastriques d'une part, et la dégradation ruminale des protéines pour l'alimentation des ruminants d'autre part.

Les défis du projet PROLEVAL sont multiples. Le premier défi est la création de nouvelles sources de protéines végétales pour l'alimentation animale et le développement des itinéraires culturaux adaptés à ces productions. L'objectif est double : répondre au déficit européen en matières premières riches en protéines pour réduire les importations de soja, et répondre à plusieurs défis environnementaux, tels que la diversification des cultures grâce à l'utilisation des graines oléo-protéagineuses comme nouvelles têtes de rotation des cultures, la réduction de l'utilisation d'engrais azotés, etc. Le deuxième défi est l'amélioration de la nutrition animale grâce à la qualité nutritionnelle des graines distribuées, ainsi qu'à la traçabilité de ces matières premières. Le troisième défi est l'amélioration de la qualité des produits animaux pour l'alimentation humaine via l'alimentation animale. Il s'agit notamment d'améliorer la qualité diététique de ces produits en apportant des lipides de qualité (oméga-3) notamment avec la graine de lin. Des méthodes d'analyse de la qualité des produits animaux (viande, lait et œufs) sont développées.

Le projet PROLEVAL est découpé en 8 volets de travail ([Figure 1](#)). Le volet 1 concerne le management du projet. Les volets 2 et 3 portent sur la production des graines oléo-protéagineuses en elles-mêmes, à savoir l'optimisation des itinéraires culturaux et les choix variétaux. Le volet 4 porte sur le développement des procédés technologiques (à l'échelle

laboratoire et pilote) ainsi que l'évaluation de la digestion *in vitro* des produits développés. Le volet 5 regroupe les expérimentations animales (volailles de chair, coqs, poules pondeuses, porcs en croissance, vaches laitières, poissons d'élevage) dans lesquelles les produits les plus prometteurs issus du volet 4 sont testés. Le volet 6 porte sur le développement de méthodes d'évaluation de la qualité des produits fabriqués. Le volet 7 porte sur les attentes sociétales ainsi que sur aspects réglementaires, environnementaux et économiques. Enfin, le volet 8 consiste à valider tout au long de la filière les résultats obtenus au cours des volets précédents.

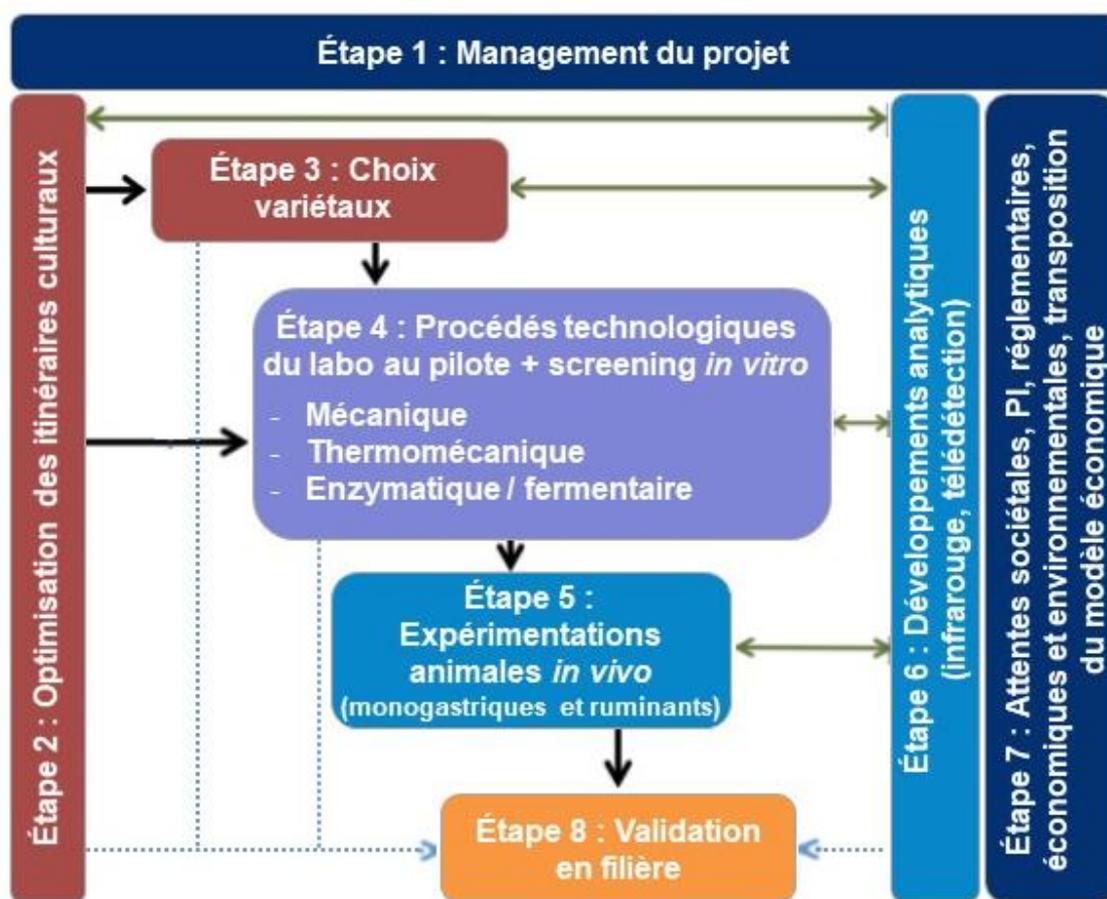


Figure 1 : les 8 volets du projet PROLEVAL

### III. Présentation du travail de thèse

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cinquième volet du projet PROLEVAL. En effet, la partie « ruminants » du volet « expérimentation animale » a fait l'objet d'une thèse CIFRE portée par Valorex et l'Unité Mixte de Recherches sur les Herbivores (basée au centre INRA de Theix).

L'objectif est d'évaluer la digestion et l'utilisation par les vaches laitières des protéines de graines de féverole et de lupin extrudées selon des méthodes innovantes. Auparavant, dans un travail débuté en amont de la thèse, des phases de screening se sont succédées pour tester des combinaisons « matières premières × traitements technologiques ». Les combinaisons conduisant à la meilleure protection des protéines, c'est-à-dire à la plus faible dégradabilité

enzymatique, ont été sélectionnées pour être testées *in vivo*. Deux essais *in vivo* sur vaches laitières ont été conduits pour mesurer la partition de l'azote ingéré entre le lait, les urines et les fèces, et des indicateurs de la digestion ruminale (ammoniac) et intestinale (acides aminés plasmatiques) des protéines. Dans le premier essai *in vivo*, deux mélanges composés respectivement de 90 % de féverole ou 90 % de lupin associés à 10 % de lin, ont été testés dans un schéma expérimental composé de 2 carrés latins  $4 \times 4$  sur 8 vaches laitières. Ces mélanges étaient distribués crus, extrudés à 140°C ou extrudés à 160°C, et comparés à du tourteau de soja. Dans le second essai *in vivo*, seul le mélange composé de 90 % de féverole et de 10 % de lin a été utilisé. L'objectif était de tester l'ajout de sucres réducteurs ou d'un cocktail enzymatique lors de la phase de maturation du mélange avant extrusion à 140°C. Ces conditions innovantes d'extrusion étaient comparées à l'absence de traitement technologique (mélange distribué cru) et à l'extrusion de ce mélange sans maturation. Le schéma expérimental était un carré latin  $4 \times 4$  sur 16 vaches laitières. Dans les deux essais, les aliments ont été caractérisés de façon précise : composition chimique classique, composés de Maillard (mesure inédite à notre connaissance chez les ruminants), critères d'efficacité d'utilisation de l'azote, à savoir dégradabilité enzymatique 1 h (au laboratoire), dégradabilité théorique (incubations ruminales), et digestibilité réelle (sachets mobiles intestinaux). De plus, les paramètres des procédés technologiques d'extrusion mis en œuvre ont été précisément décrits, contrairement à l'usage dans la littérature scientifique.

En complément de ce volet expérimental, un travail de construction et d'interprétation quantitative de bases de données publiées, obtenues *in vivo* ou *in situ*, a été mené afin de mieux comprendre les effets de traitements technologiques sur la digestion des protéines des graines de féverole, lupin et pois, et leur utilisation par les vaches laitières.

Le premier chapitre de ce travail présente une **synthèse bibliographique** portant sur les grands principes de la digestion chez les ruminants dans une première partie, avec un focus sur la digestion des protéines, ainsi qu'une description générale de la production et de l'utilisation des graines protéagineuses dans une seconde partie. Le deuxième chapitre introduit **les objectifs de la thèse** ainsi que la **stratégie scientifique** et les méthodes mises en place pour y répondre. Le troisième chapitre de ce travail présente les **résultats** obtenus au cours de la thèse. Il est découpé en quatre parties. Les deux premières parties contiennent **les résultats des deux essais *in vivo*** sous forme d'articles scientifiques publiés, complétés dans la troisième partie par certains **des résultats des phases de screening sur les aliments expérimentaux**. La dernière partie des résultats porte sur **l'analyse quantitative des bases de données constituées**, rédigée sous forme d'une publication à soumettre. Enfin, le quatrième chapitre présente la **discussion générale** et les perspectives de ce travail de thèse, avant **la conclusion générale** présentée dans le dernier chapitre.

# Étude bibliographique

## I. La digestion des protéines chez les ruminants

La digestion peut être définie comme une « fonction chimique des cellules vivantes des animaux et de leur microbiote consistant à fragmenter les grosses molécules des aliments en petites molécules solubles dans l'eau, transportables dans le sang et à partir desquelles seront édifiées par assimilation les structures organiques ou accumulées dans des réserves » (d'après Larousse, 2019). Les protéines peuvent quant à elles être définies comme des « macromolécules constituées par l'association d'acides aminés unis entre eux par une liaison peptidique » (Larousse, 2019) (Figure 2).

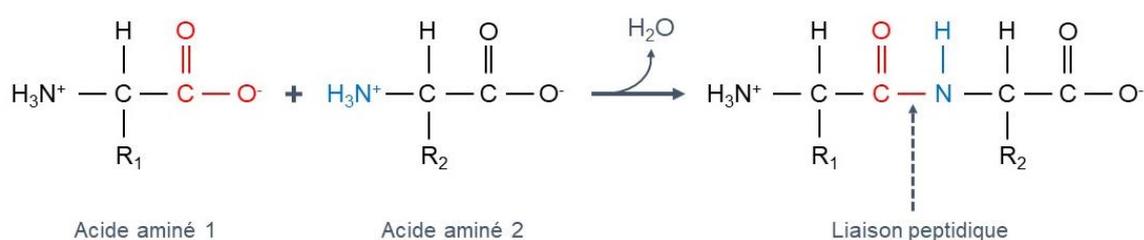


Figure 2 : acides aminés et liaison peptidique

La digestion est une succession d'actions de natures mécanique et chimique (Drogoul et al., 2004). Les actions mécaniques commencent par la préhension de l'aliment par l'animal, suivie de la mastication et de la déglutition. Les contractions du tube digestif tout au long du processus de digestion comptent également parmi ces actions mécaniques. Les actions chimiques regroupent les hydrolyses dues aux sucs digestifs sécrétés par l'animal, et les hydrolyses et les fermentations dues aux enzymes microbiennes.

## 1. Physiologie digestive

### a. Anatomie du système digestif des ruminants

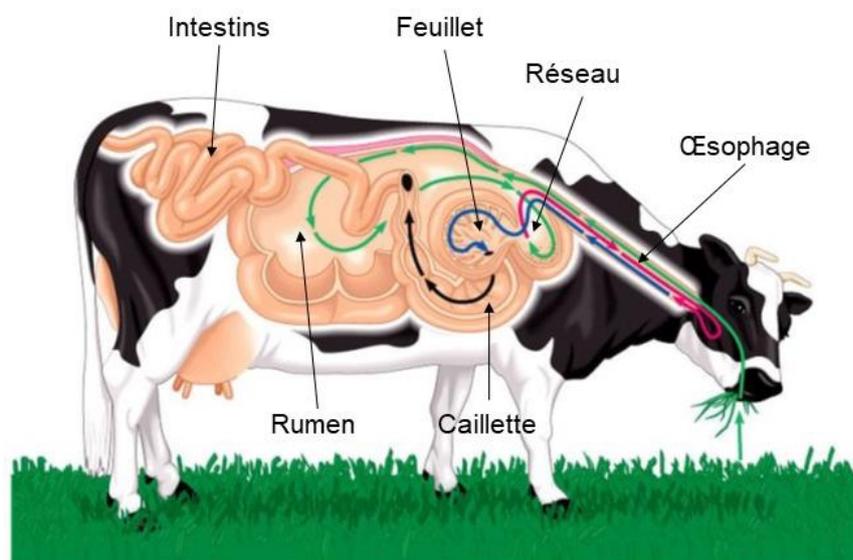


Figure 3 : schéma du tube digestif d'une vache laitière (image © Pearson Education, Inc. Publishing as Benjamin Cummings)

Le tube digestif (TD) d'un ruminant est constitué, après la cavité buccale, de l'œsophage, des quatre réservoirs gastriques (rumen, réseau, feuillet et caillette qui représentent 70 % du volume du TD), et enfin de l'intestin grêle puis du gros intestin (Figure 3). Le tout représente un volume d'environ 330 L chez la vache laitière (VL). Le rumen est le plus grand des réservoirs gastriques puisqu'il occupe à lui seul environ 150 L. C'est un organe non sécréteur qui contient du gaz, des particules de tailles diverses (plus ces particules sont fines, plus elles sont denses, et plus elles se situent au fond du rumen, Figure 4), et entre 85 et 90 % d'eau provenant de l'eau bue, de l'eau contenue dans les aliments et de la salive. En effet, les ruminants produisent de grandes quantités de salive (entre 100 et 190 L/j pour une VL et 10 L/j pour un ovin), au pH fixe de 8,2, ce qui permet de tamponner le liquide ruminal et donc de limiter l'acidification de ce milieu suite aux fermentations (pH moyen de 6,4 et qui varie entre 5,5 et 7,0). Le rumen est un environnement anaérobie dont la température est maintenue en moyenne à 39-40°C, niveau propice au développement de nombreuses populations microbiennes. On compte ainsi  $10^{11}$  bactéries par mL de jus de rumen (Newbold et Ramos-Morales, 2019). Les bactéries sont la population la plus importante du rumen, avec au minimum 400 espèces, qui vivent en symbiose avec l'animal-hôte. Ce sont également les plus actives, avec notamment les populations cellulolytiques qui dégradent les glucides pariétaux et les populations amylolytiques qui dégradent l'amidon, et dont l'équilibre entre les populations est modifié selon le pH du milieu : un pH proche de 6,5 favorise les populations cellulolytiques et un pH inférieur à 6,0 favorise les populations amylolytiques. On y trouve également plus de 250 espèces de protozoaires ciliés, de l'ordre de  $5 \cdot 10^6$  par mL de contenu de rumen (Newbold et Ramos-Morales, 2019), qui dégradent surtout les glucides solubles. Ils sont en compétition avec les bactéries, qu'ils phagocytent, contribuant ainsi à l'équilibre des populations, les bactéries se

multipliant rapidement (Drogoul et al., 2004). Bien qu'en nombre plus faible que les autres populations, les protozoaires peuvent représenter jusqu'à 50 % de la biomasse du rumen, du fait de leur grande taille (Newbold et Ramos-Morales, 2019). La troisième population est celle des champignons anaérobies ( $10^5$ /mL de contenu), qui contribuent en particulier par leur action mécanique à la dégradation des parois lignifiées. Enfin, le rumen contient également des archées méthanogènes (jusqu'à  $10^8$ /mL de contenu, Newbold et Ramos-Morales, 2019). La paroi du rumen est le siège de l'absorption des produits de la fermentation des constituants alimentaires par ces microorganismes (acides gras volatils et ammoniac) grâce aux nombreuses papilles qui tapissent l'intérieur de la paroi ruminale (Figure 5). Le contenu du rumen subit un brassage permanent du fait des contractions cycliques de la paroi du rumen, favorisant ainsi le contact entre les particules alimentaires et les micro-organismes. Le réseau est le deuxième des réservoirs gastriques du ruminant (15 L chez les bovins, environ 1 L chez les ovins et caprins) et est une sorte de diverticule du rumen. La paroi alvéolée du réseau, non sécrétrice, permet également l'absorption des acides gras volatils et de l'ammoniac (Figure 5). Entre le réseau et le feuillet se trouve l'orifice réticulo-omasal (ORO), orifice étroit et contractile essentiel au tri des particules qui sortent du rumen (Drogoul et al., 2004). Le feuillet est le troisième réservoir gastrique, dans lequel une partie de l'eau et des sels minéraux sont absorbés grâce aux lames disposées en séries qui constituent la paroi non sécrétrice (Figure 5). La caillette, dernier réservoir gastrique, aussi appelé estomac (en opposition aux trois réservoirs précédents appelés les pré-estomacs) est, de façon similaire aux monogastriques, constituée d'une paroi lisse (Figure 5) et sécrétrice de sucs gastriques constitués d'eau, d'acide chlorhydrique et de pepsine qui permettent l'hydrolyse acide des composants alimentaires (essentiellement les protéines) qui ont échappé à la dégradation dans le rumen. L'intestin grêle est composé de trois parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléum. Les sucs digestifs sécrétés grâce aux glandes annexes<sup>1</sup> conduisent à l'absorption des nutriments grâce aux hydrolyses permises par des enzymes protéolytiques et amylases. Dans le gros intestin, composé aussi de trois parties (cæcum, colon et rectum), a lieu une dernière fermentation microbienne, ainsi qu'une nouvelle absorption d'eau et d'acides gras volatils.

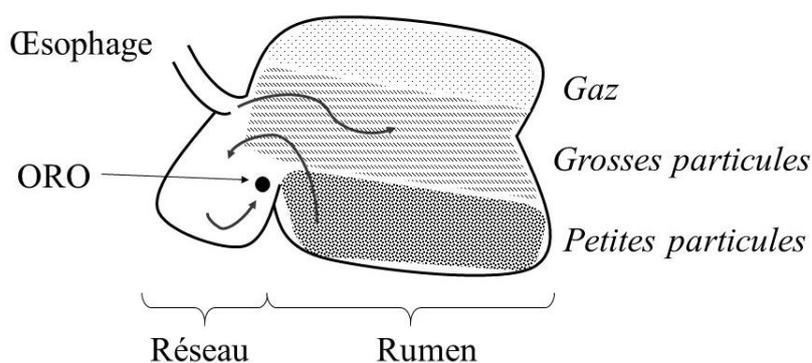


Figure 4 : les 3 phases du contenu ruminal, d'après Nozière (2017)

<sup>1</sup>Glandes intestinales qui sécrètent entre autres des enzymes protéolytiques et des amylases, foie qui sécrète de la bile et pancréas qui sécrète des sucs pancréatiques



**Figure 5 :** Photos (de gauche à droite) des parois internes du rumen (sac dorsal et sac ventral) et du réseau (photos INRA), et du feuillet et de la caillette avec ouverture sur le duodénum (Montagne, 2013)

### *b. Transit des particules et dégradation des constituants alimentaires*

Dans la cavité buccale, les aliments sont pris puis mastiqués avant d'être avalés. La mastication permet la diminution de la taille des particules des aliments, ainsi que leur hydratation par la salive. Les aliments transitent ensuite par le pharynx puis l'œsophage, et arrivent au rumen via le cardia (orifice à la jonction de l'œsophage et du rumen) (voir les flèches vertes sur la [Figure 3](#)). Ils sont alors en partie fermentés, grâce aux différentes actions des populations de micro-organismes contenues dans le rumen. Dans un premier temps, les glucides cytoplasmiques (sucres, amidon) et les glucides pariétaux sont hydrolysés en oses. L'azote non protéique est dégradé en ammoniac ( $\text{NH}_3$ ), et les protéines sont clivées en acides aminés (AA) puis en ammoniac et en chaînes carbonées. Les matières grasses sont dégradées en acides gras et glycérol. Ensuite, les oses issus de l'hydrolyse des glucides, les substrats carbonés issus des désaminations, ainsi que le glycérol issu de l'hydrolyse des triglycérides, sont fermentés par les micro-organismes, qui tirent leur énergie de cette fermentation. Les produits terminaux de ces fermentations sont les acides gras volatils (AGV), principalement de l'acétate ainsi que du propionate et du butyrate, et des gaz (300 à 400 g/j), notamment du  $\text{CO}_2$  et du  $\text{CH}_4$ . Les gaz sont éliminés du rumen par éructation. Les AGV sont absorbés par la paroi du rumen et constituent la principale source d'énergie pour les ruminants (jusqu'à 80 % de l'énergie totale). Les acides gras ne sont pas fermentés dans le rumen, mais leurs liaisons insaturées sont en partie hydrogénées par les micro-organismes. Toutes ces réactions sont illustrées sur la [Figure 7](#).

Les particules alimentaires et microbiennes transitent ensuite dans le réseau. Lorsque les particules alimentaires atteignent une taille suffisamment réduite (de l'ordre de quelques millimètres) et une densité suffisante (pour tomber au fond du rumen), elles passent à travers l'ORO ([Figure 4](#), voir les flèches bleues sur la [Figure 3](#)). Si les particules sont trop grosses pour

franchir l'ORO, elles seront mastiquées à nouveau lors du phénomène de rumination (voir les flèches roses sur la [Figure 3](#)). Il s'agit d'un réflexe complexe induit par le frottement des aliments fibreux sur des tensorécepteurs situés au niveau du cardia, de la gouttière œsophagienne et du réseau. Ce phénomène cyclique comprend quatre phases : la régurgitation du bol alimentaire, la déglutition de la phase liquide, la mastication lente de la phase solide, puis l'ingurgitation à nouveau du bol suivi d'un temps de repos. Ce cycle dure en moyenne 1 minute. Les ruminants ont plusieurs phases de rumination par jour, après les repas, qui durent en moyenne entre 25 et 45 minutes, la durée augmentant avec la proportion de fourrage dans la ration (Drogoul et al., 2004). Une même particule peut être ruminée plusieurs fois, jusqu'à avoir une taille suffisamment petite pour passer à travers l'ORO. Une fois cette petite taille atteinte, les particules atteignent le feuillet, puis la caillette (voir les flèches noires sur la [Figure 3](#)) où elles subissent une hydrolyse acide (la caillette contient de l'acide chlorhydrique, ce qui lui confère un pH compris entre 2 et 2,5). Elles franchissent ensuite le pyllore et passent dans l'intestin grêle. L'amidon qui a échappé à la dégradation dans le rumen y est en partie hydrolysé par les enzymes pancréatiques et intestinales puis absorbé sous forme de glucose. Les acides gras y sont également absorbés et les protéines alimentaires et microbiennes y sont absorbées sous formes d'acides aminés selon leur digestibilité réelle (dr). Une fraction des constituants alimentaires et microbiens parvient au gros intestin, où il existe des phénomènes fermentaires dans le côlon dus à une activité microbienne qui conduit également à une production d'AGV, mais les effets sur les protéines et les acides aminés sont négligeables dans cette partie du tube digestif. Pour les protéines et les acides aminés, ces phénomènes fermentaires sont analogues à ce qu'il se passe dans le rumen, mais en intensité plus faible : il y a absorption d'AGV et de  $\text{NH}_3$ , mais les protéines microbiennes qui y sont synthétisées ne sont pas valorisées par l'animal car rejetées dans les fèces. Enfin, les fractions non digestibles des constituants alimentaires (parois et protéines essentiellement), microbiens (matières azotées), ainsi qu'une fraction endogène (matières azotées) sont excrétées dans les fèces.

### *c. Digestion des protéines et devenir des acides aminés digestibles*

Une partie des protéines contenues dans les aliments (protéines alimentaires) est dégradée par les micro-organismes selon une proportion qui peut être estimée par la dégradabilité théorique (DT) de l'azote ( $\text{DT}_N$ ) propre à l'aliment ingéré. La DT des protéines alimentaires varie entre 40 et 90 % selon les aliments. Ces protéines sont hydrolysées par les enzymes microbiennes en acides aminés, qui sont à leur tour lysés en  $\text{NH}_3$  et en chaînes carbonées. Les micro-organismes synthétisent alors de nouvelles protéines, appelées protéines microbiennes, à partir de l'ammoniac, de chaînes carbonées et d'énergie fournies par la fermentation de la matière organique contenue dans les aliments. Cette synthèse protéique dépend donc de la disponibilité en  $\text{NH}_3$  et en énergie, l'élément en plus faible quantité des deux étant limitant pour cette protéosynthèse. L'ammoniac est absorbé à travers la paroi du rumen et ce flux est d'autant plus important quand l'énergie est le facteur limitant de la protéosynthèse microbienne. Cet ammoniac est métabolisé en urée par le foie, dirigé vers les reins puis essentiellement éliminé dans les urines, et également en partie dans le lait chez les femelles laitières. Il y a en

permanence recyclage de l'urée via la salive, et son impact est particulièrement important quand l'ammoniac est facteur limitant. Ces différentes étapes sont résumées sur la [Figure 7](#). Il existe un critère représentatif du solde net entre l'absorption de  $\text{NH}_3$  par la paroi du rumen et le recyclage de l'urée à travers la paroi du TD ou par la salive. Ce critère, appelé balance protéique du rumen (BalProRu) est défini comme la différence entre les flux de matières azotées totales (MAT) à l'entrée du rumen (MAT ingérées) et les flux de MAT non ammoniacales à l'entrée du duodénum (permettant d'estimer le flux de MAT sortant du rumen), soit la somme des MAT alimentaires non dégradées, des MAT microbiennes et des MAT endogènes (Sauvant et al., 2018c).

Les protéines alimentaires « by-pass<sup>2</sup> », donc entre 10 et 60 % des protéines alimentaires selon les aliments) et les protéines microbiennes passent dans la caillette avec le transit des digestats et y sont hydrolysées en AA grâce à la pepsine et à l'acide chlorhydrique. Ces AA et les autres matières azotées parviennent ensuite au duodénum. Il faut distinguer trois fractions dans le flux d'azote total non ammoniacal au duodénum. La première fraction correspond aux matières azotées microbiennes synthétisées dans le rumen : leur teneur en AA est considérée comme étant de 80 %, et leur digestibilité réelle dans l'intestin est considérée comme fixe, à 80 %. Le flux d'AA microbiens réellement digérés dans l'intestin correspond aux PDIM. La deuxième fraction correspond aux matières azotées alimentaires « by-pass » : leur teneur en AA est considérée comme étant de 100 %, et leur digestibilité réelle varie entre 50 et 90 % selon les aliments. Le flux d'AA alimentaires réellement digérés dans l'intestin correspond aux PDIA. La troisième fraction correspond aux matières azotées endogènes (non alimentaires, non ammoniacales et non microbiennes) et est de l'ordre de 14,2 g de MAT/kg MSI, dont 50 % sous forme d'AA (Sauvant et al., 2015). Cette fraction endogène n'est pas comptabilisée dans le flux des protéines digestibles dans l'intestin (PDI), qui correspond à la somme PDIM + PDIA.

En raison des contraintes propres à l'équilibre de l'écosystème microbien du rumen, le flux de PDIM est relativement peu modulable chez un animal donné et dépend essentiellement de la quantité ingérée de matière organique fermentescible ingérée par l'animal, et l'apport de PDIA constitue le principal moyen d'augmenter l'apport PDI chez des animaux à forts besoins en PDI ([Figure 6](#)).

---

<sup>2</sup>c'est-à-dire non dégradées par les microorganismes du rumen, estimées par  $MAT \times \frac{1-DT}{100}$

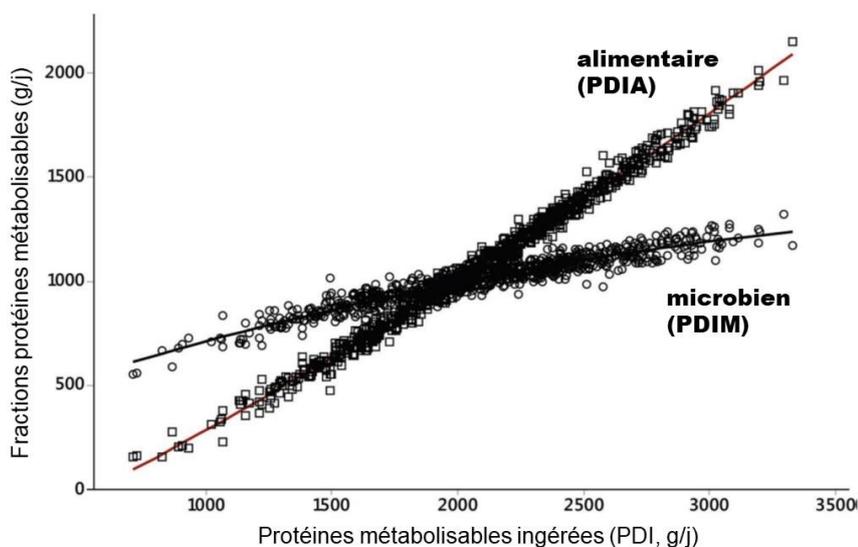


Figure 6 : contribution respectives calculées des acides aminés microbien (PDIM) et alimentaires (PDIA) aux protéines métabolisables chez la vache laitière (d'après Hristov et al., 2019)

Les AA digestibles, ou PDI donc, traversent la paroi intestinale et passent dans le sang. Ils seront ensuite utilisés par les fonctions métaboliques des animaux : renouvellement des protéines de l'organisme et synthèses protéiques, sous forme de réserves corporelles ou bien exportées dans le lait pour les femelles laitières en production. Les AA non digestibles sont évacués dans les fèces, avec la fraction non digestible de l'azote microbien et l'azote endogène fécal, qui est constitué d'azote issu des sécrétions digestives et de la desquamation des parois du tube digestif. L'azote excrété dans les urines provient principalement de BalProRu (N dégradable en excès dans le rumen) et de l'inefficacité de l'utilisation des PDI (moindre excrétion d'azote avec une meilleure efficacité), mais a aussi une origine endogène (environ 20 % de l'azote urinaire) et microbienne non protéique (environ 10 %). L'azote total excrété dans les fèces et dans les urines représentent environ les deux tiers de l'azote ingéré (Sauvant et al., 2018b).

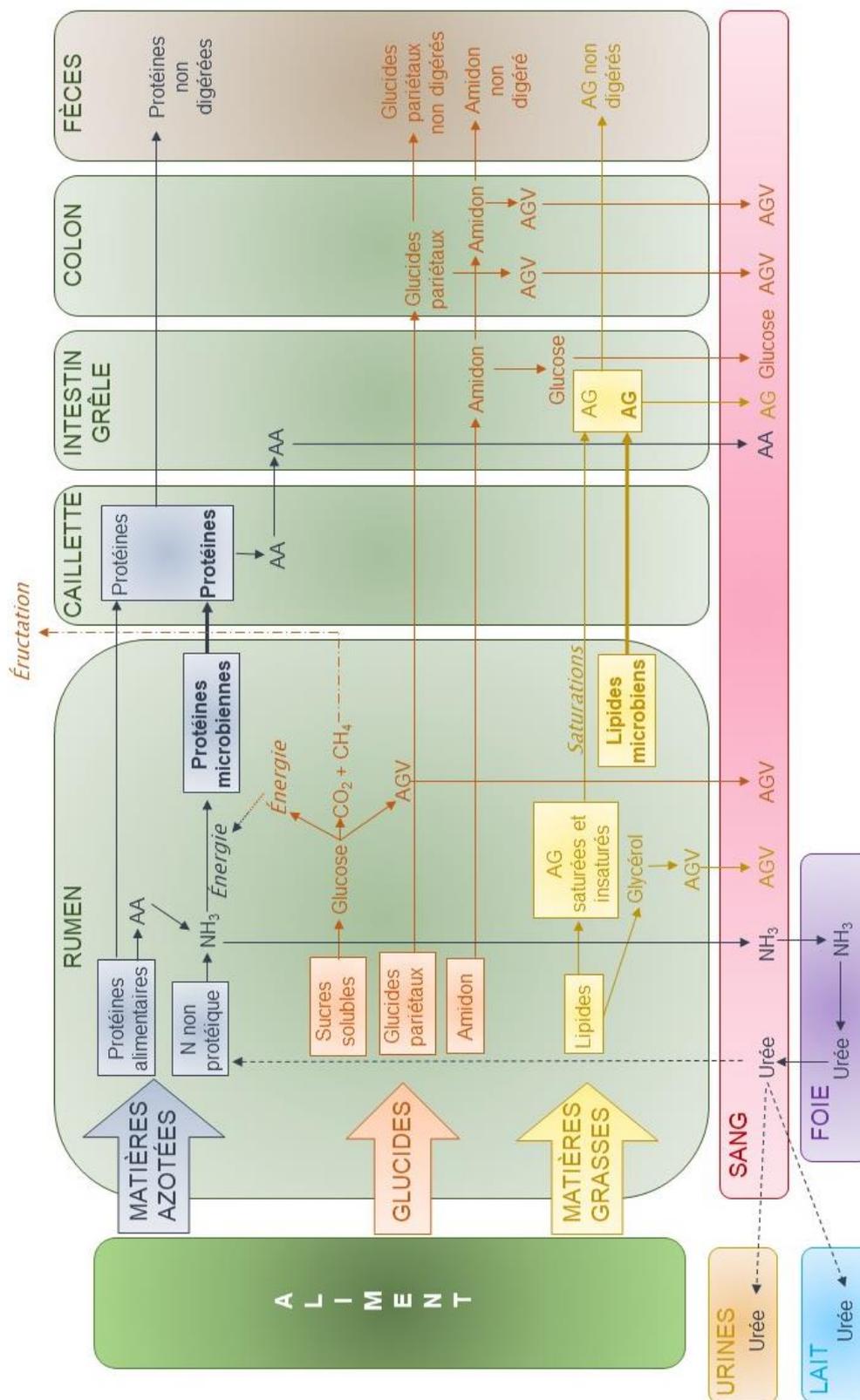


Figure 7 : les grands mécanismes de la digestion chez le ruminants, adapté de Cuvelier et al. (2015)

AA : Acides Aminés, AG : Acides Gras, AGV : Acides Gras Volatils (acide acétique, acide propionique, acide butyrique, iso-acides). L'azote non protéique issu des aliments comprend des peptides, des AA libres, de l'urée et de l'ammoniac. Les flux de matières azotées endogènes ne sont pas représentés.

## 2. Mesures de la valeur azotée des aliments et des rations

Pour connaître la valeur azotée (PDI) d'un aliment, il est nécessaire de pouvoir déterminer (ou estimer) d'une part la proportion de protéines qui échappe à la dégradation dans le rumen et leur digestibilité réelle dans l'intestin (calcul des PDIA), et d'autre part l'apport de matières azotées microbiennes permises par l'équilibre entre l'azote dégradable et l'énergie disponible (calcul des PDIM). Pour ce faire, différentes techniques de mesure *in vivo*, *in situ* et *in vitro* ont été mises au point et standardisées. Outre la valeur PDI de l'aliment, d'autres variables associées à l'utilisation de l'N peuvent être intéressantes à déterminer, comme par exemple la digestibilité apparente dans l'ensemble du TD (digApp), ou encore la partition de l'azote entre urines, fèces et produits, afin de mieux comprendre l'utilisation de l'azote ingéré par les animaux.

### a. Mesures *in vivo*

Les mesures *in vivo* ont l'avantage d'être les plus réalistes, puisqu'elles ont lieu dans les conditions physiologiques d'organismes vivants. Cependant, ce sont bien souvent les plus lourdes en termes de coûts et de contraintes (coût important de l'utilisation des animaux, autorisations éthiques à obtenir pour expérimenter sur les animaux, contraintes de conduites d'animaux vivants...). En effet, les mesures de valeur alimentaire et de digestibilité impliquent de déterminer l'ingestion et l'excrétion de plusieurs animaux de façon individuelle et d'effectuer de nombreux prélèvements. Classiquement, des stalles de digestibilité sont utilisées, dans lesquelles les animaux, logés de façon individuelle, ont accès à l'auge et à l'abreuvoir. Des dispositifs de collectes des urines et des fèces sont installés, le plus souvent pour permettre une collecte totale et séparée (Figure 8).



Figure 8 : vaches laitières dans des stalles de digestibilité (photo INRA)

### α. Flux des différentes fractions azotées au duodénum

Comme vu plus haut, l'azote (N) qui parvient au duodénum en provenance du rumen a plusieurs origines : ammoniacale, microbienne, alimentaire et endogène. Il existe des méthodes de mesures directes pour évaluer la part de ces différents flux, à partir d'échantillons

représentatifs du flux duodéal total prélevés grâce à une canule duodénale. L’N total, l’N ammoniacal, et l’N microbien sont mesurables dans le contenu duodéal. L’N endogène peut également être mesuré, mais les techniques sont complexes, aussi cette fraction est le plus souvent estimée. Enfin l’N alimentaire est calculé comme suit :

$$N \text{ alimentaire} = N \text{ total} - (N \text{ ammoniacal} + N \text{ microbien} + N \text{ endogène})$$

Cette technique nécessite l’utilisation de marqueurs indigestibles pour évaluer le flux duodéal, autrement dit le flux de sortie des différentes phases (solide et liquide) du rumen. Ces marqueurs sont soit internes (directement contenus dans les aliments, comme par exemple les fibres indigestibles) soit externes (administrés aux animaux en plus de l’alimentation, comme par exemple des terres rares telles que l’ytterbium ou le chrome). Ces marqueurs peuvent être utilisés seuls ou de façon combinée, selon qu’ils s’associent plutôt à la phase solide ou à la phase liquide des flux digestifs. La mesure du flux microbien nécessite également d’isoler un échantillon microbien de référence pour y mesurer le ratio entre sa teneur en N et sa teneur en un marqueur microbien interne (par exemple des bases nucléiques). Cette approche, lourde et complexe à mettre en place, est pourtant la méthode de référence pour déterminer le flux d’N et de ses différentes fractions au duodénum. Il y a cependant deux inconvénients à cette approche. Le premier est, outre la difficulté à réaliser un échantillonnage représentatif du flux duodéal, les incertitudes d’estimation des différentes fractions, qui se cumulent et induisent un risque d’erreur non négligeable lors du calcul de la fraction alimentaire. Le deuxième inconvénient est que cette méthode permet d’estimer la dégradation dans le rumen des protéines de l’ensemble de la ration ingérée par un animal, mais pas celle d’un aliment isolé. Pour estimer la dégradation dans le rumen des protéines d’un aliment isolé, cet aliment est ajouté à une ration témoin dont la dégradation des protéines dans le rumen est connue, et les variations de flux protéiques par rapport aux flux avec la ration de base sont attribuées à l’aliment isolé testé (Hristov et al., 2019).

### *β. Digestibilité réelle des protéines dans l’intestin grêle*

Cette mesure est difficilement réalisable *in vivo*, en raison du flux important d’N endogène dans la caillette (pepsine et mucus) et entre le duodénum et l’iléon. La mesure repose donc sur une approche *in situ* (sachets mobiles dans l’intestin, cf. ci-dessous), qui a été validée à partir de mesures simultanées de digestibilité apparente des protéines et de la matière organique dans l’ensemble du tube digestif (méthode des protéines alimentaires non digestibles dans l’intestin grêle (PANDI), Vérité et al., 1987 ; Sauvante et Nozière, 2013).

### *γ. Digestibilité apparente dans l’ensemble du tube digestif*

La digApp d’un composant chimique est la part de ce composant qui disparaît entre l’ingestion de l’aliment et son excrétion fécale. La mesure de la digApp d’un composant d’un aliment *in vivo* ne distingue pas les phénomènes de digestion du rumen de ceux de l’intestin, c’est une mesure apparente à l’échelle du TD entier. Pour estimer la digApp d’un fourrage, la méthode française (INRA) prévoit de distribuer le fourrage à volonté aux animaux (Baumont et al., 2018a) en tant qu’aliment unique de la ration. Classiquement, la digestibilité est mesurée

sur un groupe d'animaux conduits en parallèle. Les mesures sont effectuées sur 6 jours consécutifs à la suite d'une période d'adaptation à la ration d'au moins une semaine (Baumont et al., 2018a), le temps d'adapter la flore ruminale. La digApp d'un composant chimique est ensuite déterminée grâce aux mesures de la teneur de ce composant dans les offerts et les refus pour connaître la composition de l'ingéré (ce qui nécessite de mesurer l'offert et les refus afin de déterminer précisément l'ingestion) et dans l'excrété (ce qui nécessite une collecte des fèces des animaux), selon la formule suivante (exemple de l'azote) :

$$digApp_N = \frac{N_{ingéré} - N_{excrété}}{N_{ingéré}}$$

Pour estimer la digApp d'un concentré, il faut ajouter ce concentré à une ration de foin, le concentré ne pouvant pas être distribué seul à un ruminant (Baumont et al., 2018a). La digestibilité du concentré est estimée à partir de la digestibilité de la ration foin + concentré et la digestibilité de la ration foin seul. Cela suppose d'apporter suffisamment de concentré pour écarter au maximum la digestibilité de la ration foin seul et la digestibilité de la ration foin plus concentré, autrement dit d'apporter par le concentré la part la plus importante possible du constituant pour lequel la digApp est mesurée. Cependant, cet apport reste limité du fait de l'apparition d'interactions digestives entre le foin et le concentré, ces interactions augmentant avec la proportion de concentré. Il faut donc trouver le meilleur compromis pour maximiser la différence de digestibilité des deux rations et réduire les interactions digestives. Ce compromis est classiquement établi selon le type de concentré : un concentré riche en amidon est apporté à hauteur de 60 %, un concentré rapidement fermentescible est apporté à hauteur de 40 % et un concentré riche en lipide est apporté à hauteur de 30 % dans la ration de foin (Baumont et al., 2018a). La ration, quel que soit le type de concentré, est distribuée à un niveau d'apport proche de celui des besoins de l'animal.

### *δ. Partition de l'N*

Une autre approche utilisée *in vivo* chez la vache laitière pour évaluer le devenir de l'N ingéré (aussi appelée la partition de l'N) consiste à quantifier simultanément (et sur plusieurs jours consécutifs) l'N ingéré, l'N excrété dans les urines, l'N excrété dans les fèces, et l'N sécrété dans le lait. Il est alors nécessaire de connaître la teneur en azote de la ration distribuée aux animaux et celle des refus, ainsi que l'ingestion de cette ration pour pouvoir calculer l'N ingéré sur la période de mesures. Il faut ensuite évaluer combien d'azote a été exporté dans les différentes matrices. Pour les fèces et les urines, la méthode de référence consiste à collecter et quantifier de manière totale et séparée ces matrices sur une période de plusieurs jours continus, avant de les échantillonner de manière représentative sur la période de collecte et de doser l'azote qu'elles contiennent. La quantité d'azote excrétée respectivement dans les fèces et dans les urines peut alors être calculée à partir de ces informations. Pour l'azote sécrété dans le lait, celui-ci peut être calculé à partir de la production laitière quotidienne et d'un dosage d'azote dans le lait. Chez la vache, ce dosage d'azote peut être remplacé par la mesure du taux protéique, en faisant l'hypothèse d'une proportion de 95 % d'N protéique dans l'N total, et d'un ratio de 6,38 g de protéines/g N protéique (DePeters and Cant, 1992). La part

d'azote excrétée dans les fèces est relativement stable (entre 23 et 43 % de l'azote ingéré), contrairement à l'N excrété dans les urines (entre 17 et 46 % de l'azote ingéré) (Hristov et al., 2019). La résultante de la mesure de partition de l'N est appelée le bilan d'N et est défini comme étant l'N ingéré moins la somme de l'N exporté dans les urines, les fèces, et le lait. Chez la vache adulte il est en théorie très faible, mais est en pratique parfois non négligeable (jusqu'à 10 % de l'N ingéré), en raison de limites méthodologiques liées à la mesure de la partition de l'N. Ces limites ont été décrites par Spanghero et Kowalski (1997), et concernent notamment la difficulté à obtenir une collecte de fèces et d'urines vraiment parfaite, ainsi qu'à éviter la perte d'azote entre la collecte, la conservation, et le dosage des échantillons. Des évaporations d'N dans l'auge sont également envisageables. Pour les urines, un conservateur acide est introduit dans les récipients de collecte afin de limiter l'évaporation d'une partie de l'azote, mais rien de tel n'existe pour le moment pour les fèces.

### *b. Mesures in situ*

Les mesure *in situ* sont moins lourdes et moins contraignantes que les mesures *in vivo* dans la conduite des animaux, mais nécessitent toutefois l'utilisation d'animaux vivants, en particulier d'animaux équipés de canules au niveau du rumen, ou au niveau du rumen et du duodénum (voire de l'iléon). C'est la méthode de référence pour estimer la valeur alimentaire d'un aliment. On distingue les mesures *in situ* au niveau du rumen (méthodes des sachets rumen) et les mesures *in situ* au niveau du duodénum (méthodes des sachets mobiles). L'autre avantage de cette méthode par rapport à la méthode *in vivo*, c'est qu'il est possible de mesurer la dégradabilité d'une ration comme d'un aliment isolé. La méthode des sachets de nylon est la méthode la plus utilisée, car elle permet de s'affranchir de la lourdeur des mesures des flux duodénaux décrite ci-dessus. Cependant, cette méthode des sachets n'est appliquée que parce qu'elle a été validée *in vivo* justement grâce à ces flux digestifs mesurés (Sauvant et al., 2018c).

Le principe de la méthode des sachets rumen (Michalet-Doreau et al., 1987) consiste à enfermer 3 g d'un échantillon d'aliment ou de ration broyé, de composition chimique connue, dans plusieurs sachets poreux (pores de l'ordre de 50  $\mu\text{m}$ ) de nylon thermo-soudés ([Figure 9](#)). Ces sachets sont introduits dans le rumen d'animaux alimentés le plus souvent avec une ration à base de foin et complétés en concentré, et laissés en suspension dans le contenu ruminal pendant différentes durées d'incubation, avant d'être récupérés en cinétique grâce à une attache entre les sachets et le bouchon de la canule. Classiquement, les temps d'incubation des sachets sont de 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 24 h, et 48 h. Les sachets sont lavés à l'eau en machine jusqu'à obtention d'une eau claire, puis séchés à l'étuve, et les résidus d'aliment ou de ration restants à l'intérieur des sachets sont dosés afin de déterminer leur composition chimique. Si l'on prend l'exemple de l'azote, il est possible d'évaluer la dégradabilité de cet azote aux différents points de cinétique par différence entre les quantités d'azote initialement introduit dans le sachet et d'azote restant dans le sachet après séjour dans le rumen. Cependant, la quantification des phénomènes de protéolyse *in situ* des aliments par les micro-organismes du rumen doit tenir compte non seulement des processus de dégradation, estimés par les cinétiques de disparition

*in sacco*, mais aussi des processus dynamiques de transit, et donc du temps de séjour des digestats dans le rumen.



Figure 9 : sachets rumen et sachets mobiles

Les cinétiques de disparition *in sacco* en fonction du temps sont classiquement ajustées par un modèle exponentiel du premier ordre incluant trois paramètres (Ørskov et McDonald, 1979) :

$$D(t) = a + b \times (1 - e^{(-c \times t)}) \quad \text{Ørskov and McDonald, 1979}$$

avec la fraction soluble et immédiatement dégradabile (a, %), la fraction potentiellement dégradabile (b, %), et enfin la vitesse de dégradation de la fraction dégradabile supposée constante (c, %/h).

Jusque dans la version INRA, 2007, 2010 des systèmes d'unités d'alimentation, le temps de séjour dans le rumen est classiquement assimilé à un taux de sortie des particules (kp) fixe. L'intensité de la protéolyse peut alors être estimée par la dégradabilité théorique (DT<sub>N</sub>) calculée avec ces paramètres de dégradation et une vitesse de transit kp de 6%/h (on parle alors de DT<sub>6N</sub>) :

$$DT_{6N} = a + \frac{b \times c}{c + kp}$$

Dans le nouveau système INRA (2018), les taux de sortie des digestats sont considérés variables en fonction du type de fractions (liquide, particules de fourrages, de concentré) et de la nature de la ration (niveau d'ingestion, proportion de concentré) (Sauvant et al., 2018c). La DT<sub>N</sub> peut alors être calculée de façon plus précise en tenant compte du taux de sortie réel du rumen de la fraction liquide (klt) et des particules selon leur nature, fourrages (kft) ou concentrés (kct) :

$$DT_N = a \times \frac{100}{100 + klt} + b \times \frac{c}{c + kp}$$

avec

$$kp = (1 - PCO) \times kft + PCO \times kct$$

PCO étant la proportion de concentré dans la ration.

Lorsque l'on ne connaît pas les paramètres a, b, et c, une approche « pas à pas » permet de calculer la  $DT_{6N}$  (Kristensen et al., 1982) et des équations de passage ente la  $DT_{6N}$  et la  $DT_N$  peuvent être utilisées (Sauvant et Nozière, 2013).

Pour la mesure de la digestibilité réelle ( $dr$ ) de fractions alimentaires ( $dr_N$  pour l'azote) échappant à la dégradation dans le rumen, on utilise la méthode des sachets mobiles (Figure 9). Le principe reste similaire à la méthode *in sacco* utilisée dans le rumen, mais avec des sachets plus petits contenant une centaine de milligrammes d'échantillon. Les sachets mobiles contiennent des résidus d'aliments incubés pendant 16 h dans le contenu ruminal suivant la méthode *in sacco*. Ce temps de 16 h est considéré comme représentatif de la durée moyenne de séjour des aliments dans le rumen (calculé comme étant égal à  $1/kp$ , avec  $kp = 6 \text{ %/h}$ ). Ils sont incubés dans une solution de pepsine-HCl pour mimer la digestion dans la caillette, puis introduits via la canule duodénale et ensuite récupérés soit via la canule iléale si l'animal en est équipé, soit ramassés dans les fèces. De la même manière que pour la méthode *in sacco*, les sachets mobiles sont lavés, séchés puis analysés, ce qui permet de calculer la  $dr_N$  de l'échantillon testé.

$$dr_N = \frac{N \text{ incubé} - N \text{ résidu}}{N \text{ incubé}} \times 100$$

S'il n'est pas possible de réaliser des mesures *in situ* de  $DT_N$  ou de  $dr_N$ , le système INRA 2018 propose une méthode enzymatique pour déterminer la  $DT_N$  et la  $dr_N$  des aliments concentrés (cf. ci-dessous). Des équations de prévision de ces deux paramètres en fonction de la composition chimique des aliments sont également disponibles (Baumont et al., 2018b).

### c. Mesures *in vitro*

Des mesures *in vitro* peuvent être utilisées pour mimer les phénomènes digestifs. Elles sont moins coûteuses et plus faciles à mettre en place que les mesures *in vivo* ou même *in situ*. En effet, ces mesures s'affranchissent totalement des animaux. L'inconvénient est qu'elles sont moins représentatives de la réalité du fonctionnement physiologique d'un organisme entier.

La mesure *in vitro* classiquement utilisée pour déterminer la  $DT_{6N}$  de l'azote de manière indirecte est la méthode dite de dégradabilité enzymatique 1 h (DE1). Cette méthode, décrite par Aufrère et al., (1989, 1991), s'applique aux matières premières et aux aliments concentrés composés. Elle consiste à incuber les échantillons dans un tampon borate-phosphate à pH 8 pendant une heure. Ce tampon contient une protéase issue de la bactérie *Streptomyces griseus*, de la tétracycline (antibiotique) et de la nystatine (antifongique). L'incubation de l'échantillon s'effectue à 40°C. Au bout d'une heure d'incubation, les tubes contenant les échantillons dans la solution tampon sont centrifugés, et le surnageant est récupéré pour le dosage d'azote. Par calcul, la DE1 peut alors être déterminée :

$$DE1 = \frac{\text{Quantité d'azote dégradée en 1 h}}{\text{quantité d'azote initiale}}$$

La  $DT_{6N}$ , c'est-à-dire la  $DT_N$  calculée pour un taux de sortie des particules du rumen constant de 6 %/h, est alors calculée à partir de la DE1 grâce à une équation de passage. Pour les matières premières simples, cette équation est :

$$DT_{6N} = 47,9 + 0,36 \times DE1 + \Delta \quad \text{Baumont et al., 2018b}$$

avec  $\Delta$  une constante propre à chaque groupe d'aliments (par exemple  $\Delta = 15,4$  pour les graines protéagineuses crues ou  $\Delta = 5,7$  pour la féverole et le lupin extrudés). Une autre équation existe pour les aliments concentrés composés.

Il est également possible de calculer la  $dr_N$  d'un concentré composé à partir de sa DE1 grâce à une équation de passage (Baumont et al 2018b).

### 3. Calcul des valeurs PDI et BalProRu

En pratique, la valeur PDI des aliments et des rations, est calculée de la manière suivante :

$$PDI = PDIA + PDIM$$

avec Baumont et al., 2018b

$$PDIA = MAT \times (1 - 0,01 \times DT_N) \times 0,01 \times dr_N$$

$$PDIM = (41,67 + 71,9 \cdot 10^{-3} \times MOF) \times 0,8 \times 0,8$$

avec PDIA les PDI d'origine alimentaire, PDIM les PDI d'origine microbienne et MOF la matière organique fermentescible dans le rumen, en g/kg MS tout comme les MAT ; et  $DT_N$  et  $dr_N$  en %. Brièvement, la MOF est calculée comme la différence entre la MO apparemment digérée dans l'ensemble du tube digestif (MOD) et les fractions digérées dans l'intestin : protéines (PDIA), amidon (AmiD\_int), parois estimées par le NDF (NDFD\_int) et acides gras (AGD\_int), ainsi que les produits de fermentation des ensilages (PF) :

$$MOF = MOD - PDIA - AmiD_{int} - NDFD_{int} - AGD_{int} - PF \quad \text{Sauvant et Nozière, 2013}$$

Ces différents critères sont facilement calculables à partir de la composition chimique des aliments (Baumont et al, 2018b)

L'équilibre entre les protéines dégradées et l'énergie disponible pour la synthèse de matières azotées microbiennes dans le rumen est représenté par le critère BalProRu, calculé comme suit :

$$BalProRu = (MAT \times DT_N \times 0,01) - \frac{(PDIM)}{0,64} - 14,2$$

avec BalProRu, MAT et PDIM en g/kg MS, et  $DT_N$  en %.

Pour optimiser la valeur protéique d'un aliment riche en protéines, un des principaux leviers d'action est de limiter sa dégradation dans le rumen, pour augmenter les PDIA et diminuer la balance protéique du rumen. En effet, une BalProRu élevée entraîne une augmentation des rejets d'N urinaire, ce qui n'est intéressant ni pour l'animal, ni d'un point de vue économique, ni d'un point de vue environnemental. En revanche, réduire la part des protéines alimentaires dégradées dans le rumen pour augmenter le flux de protéines by-pass, tout en maintenant une bonne digestibilité de ces protéines dans les intestins, est un objectif intéressant. Pour cela, un aliment naturellement riche en protéines, et dont les protéines sont protégées de la dégradation ruminale présente un réel atout pour nourrir les VL. C'est pourquoi nous allons nous intéresser, dans la suite de cette étude bibliographique, aux graines protéagineuses, naturellement riches en protéines, et aux procédés pouvant être appliqués pour protéger les protéines dans le rumen.

## II. Les graines protéagineuses

### 1. Description des graines protéagineuses

#### *a. Aspect et composition chimique*

Les graines protéagineuses sont issues de plantes appartenant à la famille des légumineuses (Fabaceae). Cette famille de plantes à fleurs à graines dicotylédones contient environ 765 genres, qui regroupent plus de 19 000 espèces. Parmi les légumineuses les plus cultivées, pour leur intérêt en tant que source de protéines végétales tant pour les animaux que pour l'Homme, sont retrouvées le soja, la féverole, le pois et le lupin, mais également le haricot, la vesce, la gesse, la lentille, le pois chiche, la luzerne, le trèfle, etc. Le grand nombre d'espèces de légumineuses entraîne une large diversité d'aspect de ces plantes, qui peuvent être vivaces ou annuelles, peuvent pousser sous la forme dressée ou en lianes, en arbustes voire même en arbre. Le système racinaire est souvent pivotant. Parmi toutes les légumineuses, l'intérêt est porté ici sur les légumineuses à graines, et en particulier la féverole, le lupin et le pois.

Le plant de la féverole (*Vicia faba*) peut dépasser 1,50 m de hauteur. Le système racinaire peut se développer jusqu'à 90 cm de profondeur. Les fleurs sont souvent blanches à motifs foncés (Figure 10). Les graines sont foncées (brunes ou rouges foncées), cependant les variétés sans tannins peuvent produire des graines grises, plus claires que les variétés contenant des tannins (Terres Univia, 2019a). La féverole est principalement cultivée sous deux types de variétés (Crépon et al., 2010) : la variété *major*, surtout utilisée pour la consommation humaine, et la variété *minor*, principalement consommée par les animaux d'élevage. Ces deux variétés sont différenciées par la taille et la forme des graines. Les graines de la variété *major* sont un peu aplaties et ont un poids variant entre 0,65 et 0,85 g par graine, tandis que les graines de la variété *minor* sont plus petites, rondes, pour un poids variant de 0,25 à 0,35 g par graine (Heuzé

et al., 2018b). Leur composition chimique est répertoriée dans le Tableau 1. La graine de féverole contient principalement des protéines (295 g/kg MS) et de l'amidon (442 g/kg MS).



Figure 10 : plant fleuri et graines de féverole (de gauche à droite ; images Terres Univia, 2019a et Meyer, 2019)

Parmi les 200 espèces de lupin, quatre sont davantage cultivées dans le monde : le lupin blanc (*Lupinus albus*), le lupin à feuilles étroites (*Lupinus angustifolius*, parfois aussi appelé lupin bleu), le lupin jaune (*Lupinus luteus*) et le lupin changeant (*Lupinus mutabilis*). Seules les trois premières sont cultivées en Europe, et seul le lupin blanc est cultivé en France. Le lupin changeant est principalement cultivé dans les Andes, et ne sera pas étudié ici. Le lupin à feuilles étroites est largement cultivé en Australie, mais également en Europe du Nord, notamment en Allemagne (Terres Univia, 2019b). Le lupin jaune, cultivé dans quelques pays d'Europe de l'Est, est plus cultivé comme fourrage que pour ses graines. Selon les espèces, port du plant varie du plant herbacé à l'arbuste de 3 m de haut (Berger et al., 1992), la hauteur moyenne étant d'environ 1 m de haut. Le système racinaire atteint 70 cm de profondeur. Le lupin blanc présente des fleurs blanches ou bleues, et produit de grosses graines plates de forme rectangulaires aux angles arrondis blanc-crème (Terres Univia, 2019b) (Figure 11). Le lupin à feuilles étroites a des fleurs qui peuvent être bleues, blanches ou roses, et produit de petites graines presque rondes, blanches ou mouchetées de brun. Enfin, le lupin jaune fait des fleurs jaune vif et produit de petites graines rondes et mouchetées de brun, similaires à celles du lupin à feuilles étroites. La composition chimique des graines de lupin en fonction des espèces est précisée dans le Tableau 1. La graine de lupin se rapproche de la graine de soja du fait de sa haute teneur en protéines (380 g/kg MS pour le lupin blanc), de sa faible teneur en amidon (81 g/kg MS) et de sa teneur en matière grasse (MG, 98 g/kg MS).



Figure 11 : plants fleuris de lupin blanc, lupin à feuilles étroites, lupin jaune, et graines de lupin blanc (de gauche à droite ; images Terres Inovia, 2019 et Weber, 2017)

Le pois (*Pisum sativum*) se distingue par sa grande diversité de variétés, due à la diversité génétique et à la sélection (Heuzé et al., 2017). Du fait de cette grande diversité, le pois présente des aspects différents. C'est une plante qui mesure entre 0,5 et 2 m de hauteur. Le système racinaire creuse le sol jusqu'à 1 m de profondeur. Les fleurs peuvent être blanches (variétés sans tannins comme pour la féverole), roses ou rouges, et les graines, rondes et lisses ou bien ridées, peuvent être jaunes, vertes, rarement roses, avec ou sans marbrures sur le tégument (Terres Univia, 2019c) (Figure 12). La composition chimique des graines de pois est indiquée dans le Tableau 1. Cette composition est assez similaire à celle de la féverole, avec un peu moins de protéines (60 g/kg MS de moins) mais un peu plus d'amidon (70 g/kg MS en plus).



Figure 12 : plant fleuri et graines de pois protéagineux (de gauche à droite ; images Terres Univia, 2019c et Agri semences, 2014)

Tableau 1 : composition chimique des graines de lupin, féverole et pois

	<i>Lupinus albus</i> <sup>1</sup>	<i>Lupinus angustifolius</i> <sup>1</sup>	<i>Lupinus luteus</i> <sup>2</sup>	<i>Vicia faba</i> <sup>1</sup>	<i>Pisum sativum</i> <sup>1</sup>
MS (%)	88.1	90.2	88.8	86.6	87.2
MO (g/kg MS)	960	965	954	962	965
MAT (g/kg MS)	380	337	422	295	233
NDF (g/kg MS)	219	239	243	155	145
ADF (g/kg MS)	165	191	197	112	72
MG (g/kg MS)	98	60	54	15	13
Amidon (g/kg MS)	81	48	61	442	513
PDI (g/kg MS)	124	126		112	99
UFL (UF/kg MS)	1.43	1.34		1.26	1.25
Lysine (% PDI)	6.54	6.58		7.41	7.78
Méthionine (% PDI)	1.44	1.47		1.48	1.72

<sup>1</sup>INRA, 2018

<sup>2</sup>Heuzé et al., 2018a

### b. Un peu d'agronomie

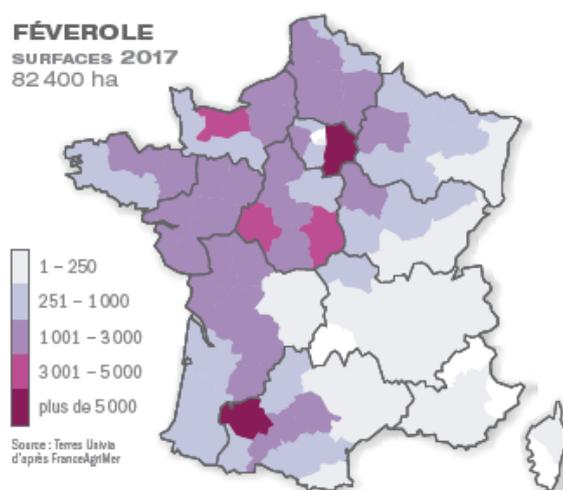
De manière générale, les légumineuses sont appréciées dans les rotations de cultures du fait de leur effet cultural précédent positif, car elles laissent un « reliquat azoté » dans le sol (Duc et al., 2010). En effet, les légumineuses ont la capacité de fixer une partie de l'azote atmosphérique grâce à la présence symbiotique de bactéries du genre *Rhizobium* dans des nodules présents dans leurs racines. Cette symbiose est permise par une hémoprotéine contenue

dans les racines, la légghémoglobine, qui fixe le dioxygène du sol, créant ainsi un environnement anaérobie favorable au développement des bactéries *Rhizobium*. La fixation de l'azote atmosphérique par ces bactéries se fait grâce à leur enzyme nitrogénase, selon la réaction suivante :



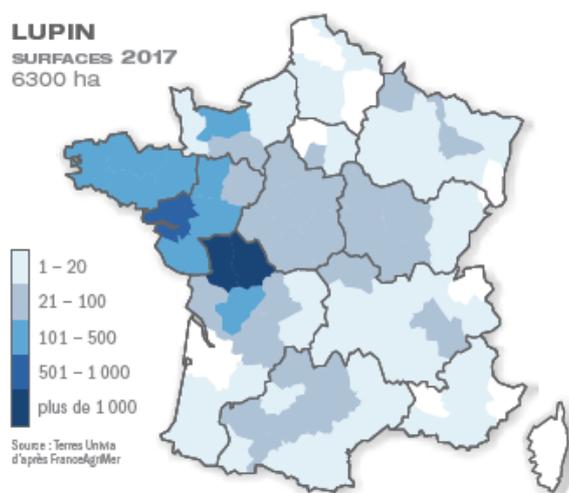
Selon les cas, de 40 à 90 % de l'azote utilisé par les légumineuses provient de cette fixation atmosphérique, le reste étant apporté par le système racinaire qui assimile l'azote minéral du sol (Duc et al., 2010). Cette fixation de l'azote atmosphérique entraîne un besoin nul en engrais azoté pour ces cultures. De plus, il est à noter l'effet précédent positif particulier au lupin blanc sur le phosphore, puisque celui-ci augmente la quantité de phosphore soluble dans le sol pour la culture suivante (Duc et al., 2010). Cette capacité provient de l'excrétion d'une grande quantité d'acide par des petites racines dites « protéides » (Terres Univia, 2019b).

La féverole a besoin de températures clémentes en hiver pour une croissance optimale. Elle peut supporter le gel au stade végétatif, mais plus après. La féverole peut se développer sur tous type de sols (profonds de préférence), sauf les sols trop acides ou trop salins (Heuzé et al., 2018b). Contrairement au lupin, la féverole tolère les sols gorgés d'eau. La féverole est très sensible à un insecte, la bruche, un coléoptère spécifique de cette culture, qui se développe dans les graines, en y laissant un trou parfaitement rond. On distingue en France la féverole d'hiver et la féverole de printemps. La féverole d'hiver se sème entre fin octobre et début novembre pour une récolte au mois de juillet, tandis que la féverole de printemps est semée entre février et mars et est récoltée entre août et septembre. Le rendement de la féverole varie entre 40 et 50 q/ha (Terres Univia, 2019a) (la moyenne était d'environ 42 q/ha sur la période 2010-2014, Terres Univia, 2019a), avec un rendement un peu plus important pour la féverole de printemps que pour la féverole d'hiver (Terres Inovia, 2019b). La répartition géographique des cultures de féveroles en France en 2017 est représentée sur la [Figure 13](#).



[Figure 13](#) : surfaces cultivées de féverole en 2017 en France (Terres Univia, 2018a)

Le lupin est plutôt cultivé dans des sols acides, même s'il peut tolérer diverses natures de sols (Berger et al., 1992), sauf les sols très calcaires (Terres Univia, 2019b). Il faut éviter l'excès d'eau, car le plant ne le supporte pas, mais les profondes racines ont la capacité d'aller absorber l'eau assez loin dans le sol. Concernant l'irrigation, le lupin n'a pas forcément besoin d'être irrigué tout au long de sa culture. Les phases critiques lors desquelles les plants ne doivent pas manquer d'eau sont les phases de floraison et de remplissage des grains, car il est modérément résistant à la sécheresse (Kung et al., 1991). Il faut également le préserver de la concurrence des mauvaises herbes avant la levée (Terres Univia, 2019b). Si le pH du sol est trop élevé, il peut être nécessaire d'inoculer le sol avec *Rhizobium lupini* afin d'assurer le fonctionnement symbiotique des nodules racinaires. Afin de fleurir correctement, le lupin a besoin de vernalisation (c'est-à-dire de subir une période de froid pour passer du stade végétatif au stade de floraison) : le semis doit donc être précoce afin que le plant subisse une période de froid suffisamment longue. Dans le cas contraire, la plante développera davantage de feuilles et de tiges au détriment des graines (Berger et al., 1992). En France, la culture de lupin blanc majoritaire est le lupin d'hiver, semé entre fin septembre et début octobre, pour une récolte fin juillet-mi-août. Le lupin de printemps est également présent sur le sol français, semé entre mi-février et mi-mars et récolté entre fin août et fin septembre (Terres Univia, 2019b). Le rendement oscille généralement entre 20 et 30 q/ha. La répartition géographique des cultures de lupin blanc en France en 2017 est représentée sur la [Figure 14](#).



[Figure 14](#) : surfaces cultivées de lupin en 2017 en France (Terres Univia, 2018a)

Le pois peut être cultivé dans divers environnements, de préférence avec des températures moyennes, cependant les sols trop acides et les zones gorgées d'eau sont à éviter (Heuzé et al., 2017). Un climat trop chaud ou encore la sécheresse sont des éléments dommageables pour sa culture en période de floraison (Heuzé et al., 2017). Tout comme pour le lupin et la féverole, il existe des variétés de pois d'hiver et de pois de printemps. Le pois d'hiver est semé en novembre et récolté entre juin et juillet, tandis que le pois de printemps est semé en février-mars et récolté lui aussi entre juin et juillet. Le rendement est équivalent à celui de la féverole, 42 q/ha en moyenne (Terres Univia, 2019c). La répartition géographique des cultures de pois en France en 2017 est représentée sur la [Figure 15](#).

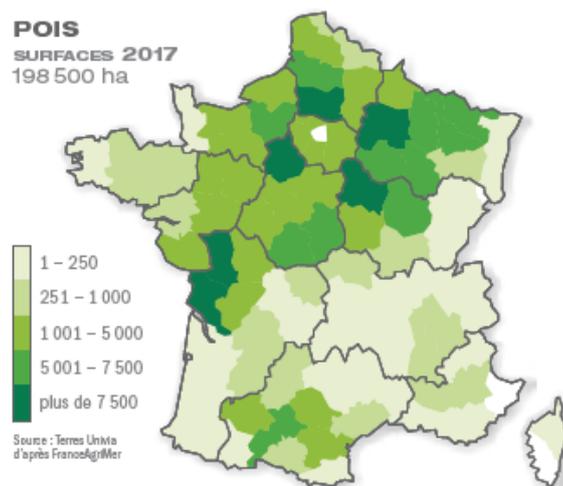


Figure 15 : surfaces cultivées de pois en 2017 en France (Terres Univia, 2018a)

### c. Un peu d'histoire

La féverole provient du Moyen-Orient et a été domestiquée vers 6 000 avant Jésus Christ (Heuzé et al., 2018b). Originaire du bassin méditerranéen, le lupin semble avoir été domestiqué vers 4 000 avant Jésus Christ. Sa sélection est récente (1930), les graines sauvages étant très amères et toxiques à hautes doses (Terres Univia, 2019b). Le pois semble avoir été domestiqué dès 7 000 avant Jésus Christ au Proche Orient, et vers 4 000 avant Jésus Christ en Europe. Des écrits de la Rome antique témoignent de la consommation de graines protéagineuses, parfois après trempage afin de réduire l'amertume et la concentration en alcaloïdes de ces graines (Duc et al., 2010). La sélection empirique a abouti à des espèces annuelles, avec des graines plus grosses et moins de facteurs antinutritionnels (Duc et al., 2010).

Jusqu'au début du XX<sup>ème</sup> siècle, les cultures de protéagineux étaient pratiquées en France, à la fois pour la nutrition humaine et pour l'alimentation animale (animaux de rente - lait et viande - et animaux de trait) (Duc et al., 2010). Cependant, suite à la Seconde Guerre Mondiale, la France intensifie son niveau de production, notamment au niveau de l'élevage. En 1962, avec la mise en place de la Politique Agricole Commune (PAC), la France choisit de favoriser la culture des céréales (Froidmont et Leterme, 2005) à la fois pour la nutrition humaine mais également l'alimentation animale. Les efforts de recherches, d'amélioration des techniques de cultures et de sélection sont concentrés sur la production céréalière. Les matières premières riches en protéines pour l'alimentation animale sont alors importées d'Amérique sous forme de soja, ce qui pose problème en 1973 lorsque les États-Unis d'Amérique déclarent un embargo à l'encontre de l'Europe suite à de mauvaises conditions climatiques entraînant une sécheresse intense et donc une très mauvaise récolte du soja (Duc et al., 2010 ; Terres Univia, 2018b). La France prend alors conscience de sa dépendance vis-à-vis d'autres pays pour la production de matières premières végétales riches en protéines. En réaction, le Ministère de l'Agriculture français lance un Plan Protéines. Les efforts se tournent vers la culture de légumineuses, qui produisent des graines à teneur en protéines élevée, avec l'aide de l'INRA pour développer la culture de ces graines. Ce développement continue notamment à partir de la fin des années 1970, à l'aide de subventions de l'Union Européenne dans le cadre de la PAC pour la culture

de protéagineux tels que le pois et la féverole en 1978, puis pour le lupin en 1979 (Froidmont et Leterme, 2005; Terres Univia, 2018b). Cependant, il a alors fallu faire face aux manques de connaissances sur les itinéraires culturaux à respecter pour ces graines, sur la manière de les récolter, sur la sélection des variétés d'intérêt... Ces cultures se développent malgré tout grâce aux efforts de recherche, et la France atteint 40 % d'autonomie protéique dans les années 1980. Malgré ces efforts, avec les accords de l'Uruguay Round en 1992 et la diminution des aides de l'Union Européenne pour la culture de protéagineux qui rejoignent le niveau des aides à la culture de céréales en 1993, la culture des graines protéagineuses reste limitée pendant les années 1990 (Froidmont et Leterme, 2005). Pourtant, ces cultures vont à nouveau connaître un regain d'intérêt avec la crise de la « vache folle » dans les années 2000. En effet, jusqu'alors les farines animales et de poissons étaient utilisées comme apport d'azote dans les rations des animaux, en particulier des vaches laitières, mais l'apparition de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine entraîne l'interdiction de l'utilisation de ces farines animales. À nouveau, les graines protéagineuses font l'objet d'un regain d'intérêt comme source potentielle d'azote pour les animaux (Froidmont et Leterme, 2005). Entre 2001 et 2003, des aides pour les protéagineux sont alignées, et en 2004 une aide aux protéagineux de 55,57 euros par hectare est mise en place pour maintenir la compétitivité de ces cultures (Terres Univia, 2018b). En 2009, un dispositif de relance des protéagineux est créé, en maintenant pour les campagnes 2010 et 2011 le soutien de 55,57 euros par hectare. En parallèle, en 2010, les Pouvoirs Publics Français mettent en place un plan de relance sur 5 ans pour le soutien à la recherche sur les protéagineux (Terres Univia, 2018b).

Outre ces décisions politiques, qui ont façonné l'agriculture française, de nouvelles attentes sociétales apparaissent, redonnant encore davantage d'intérêt à la production de graines protéagineuses françaises. En effet, l'importation massive de tourteau et de graines de soja pose question sur plusieurs aspects : l'incertitude quant à la disponibilité d'approvisionnement (production suffisante et concurrence de pays demandeur comme la Chine), incertitude également sur la provenance exacte de ces graines importées (l'importation depuis l'outre Atlantique entraîne des problèmes de traçabilité), la méfiance vis-à-vis des produits OGM (une bonne partie de ces produits importés est issue de cultures génétiquement modifiées), etc. Outre ces aspects sociétaux, des aspects environnementaux font également leur apparition, avec la prise de conscience du problème de la déforestation pour les productions de soja brésilien, des souhaits de diminuer les émissions de gaz à effet de serre émis lors des transports des graines importées, de l'intérêt des productions locales, respectueuses de l'environnement (en utilisant moins d'intrants chimiques). La culture française de protéagineux répond en partie à ces attentes : meilleure traçabilité, pas de cultures OGM, réduction des intrants azotés et donc par voie de conséquence diminution de l'émission des gaz à effet de serre (Magrini et al., 2016).

En 2017, la culture des protéagineux en France représentait 429 220 ha (soit 1 347 800 tonnes de graines), répartis en 198 500 ha pour le pois, 82 400 ha pour la féverole, 6 300 ha pour le lupin et 142 000 ha pour le soja (Terres Univia, 2018a). À titre de comparaison, la même année, la culture des oléagineux représentait 2 164 700 ha (1 408 000 ha de colza, 587 000 ha de tournesol, 141 000 ha de soja, et 28 700 ha pour le lin) pour une production de

plus de 7 417 000 tonnes de graines oléagineuses (Terres Univia, 2018a). Si l'on compare par rapport aux surfaces de protéagineux en 2016, seule la surface de féverole a augmenté (+4 400 ha) ; les surfaces de lupin et de pois ayant reculé de respectivement 1 400 ha et 10 200 ha (Terres Univia, 2017 ; Terres Univia, 2018a). Il est également à noter que, outre les surfaces dédiées aux protéagineux réduites, seule une partie des graines récoltées est à destination de l'alimentation animale. Par exemple, sur la campagne 2015-2016, seuls 25 % de la production nationale de pois et 61 % de la production de féverole étaient à destination de l'alimentation animale (Terres Univia, 2017a). Sur la saison 2017, à part pour le lupin (29,2 q/ha), les rendements de protéagineux ont été décevants : 25,7 q/ha pour la féverole et 35,6 q/ha pour le pois (Terres Univia, 2018a).

## **2. Utilisation des graines protéagineuses en alimentation animale**

### *a. Chez les monogastriques*

Les protéagineux contiennent des facteurs antinutritionnels (FAN) auxquels les monogastriques sont sensibles (Grosjean et al., 2000). En effet, la féverole contient des tannins dans le tégument des graines (pour les graines de féverole colorée) et de la vicine et convicine dans ses cotylédons. Les tannins sont des polyphénols qui forment par liaisons des complexes insolubles avec les protéines de la féverole, ce qui diminue leur digestibilité apparente (Kaysi et Melcion, 1992). La vicine et la convicine sont des glucosides (glucose lié à un radical divicine pour la vicine, et glucose lié à un radical iso-uramyl pour la convicine) (Kaysi et Melcion, 1992). Le lupin contient des galactosides (hydrates de carbone indigestibles, qui diminuent la digestibilité des nutriments, (Froidmont et Leterme, 2005) ainsi que des alcaloïdes. Le pois ne contient quant à lui que peu de FAN, seules quelques variétés, notamment de pois d'hiver, contiennent des inhibiteurs protéolytiques qui se lient aux trypsines et chymotrypsines et perturbent donc la digestion des protéines (Froidmont et Leterme, 2005). Cependant, des efforts de sélections variétales sur ces 35 dernières années ont permis de réduire les teneurs en FAN (Recoules et al., 2016 ; Vilariño et al., 2009) et donc de rendre ces graines plus intéressantes pour les monogastriques.

Le pois, du fait de ses teneurs en protéines et en amidon, couvre bien les besoins protéiques et énergétiques du porc (Peyronnet et al., 2014) ce qui en fait un aliment adapté pour cette espèce. De plus, sa richesse en lysine (17 g/kg de MS, INRA-CIRAD-AFZ, 2017) lui confère un intérêt supplémentaire (Peyronnet et al., 2014). Ainsi, le pois peut être incorporé jusqu'à hauteur de 30 % dans une ration équilibrée en acides aminés essentiels pour porcelets sevrés, et sans limite dans des rations croissance et finition de porcs charcutiers ou des rations pour truie gestantes et allaitantes (Peyronnet et al., 2010). Les porcs semblent peu sensibles à la vicine et convicine contenues dans la féverole, mais sont en revanche sensibles aux tannins, qui diminuent la valeur nutritionnelle, tant énergétique que protéique, de la féverole (Crépon et al., 2010). La féverole peut être distribuée à hauteur de 20 % dans une ration porc 2<sup>ème</sup> âge (post sevrage), et jusqu'à hauteur de 35 % en porc charcutier, permettant une forte réduction, voire

même une suppression, du tourteau de soja de l'alimentation du porc charcutier (Royer et al., 2010). Quant au lupin, il n'est pas très utilisé en alimentation du porc du fait d'un profil en acides aminés qui n'est pas idéal pour cette espèce. De plus, les galactosides entraînent une mauvaise valorisation de cette graine et risque d'entraîner des diarrhées du fait de leur fermentation dans le colon (Froidmont et Leterme, 2005). Il est ainsi recommandé de ne pas en distribuer aux porcelets ainsi qu'aux truies, et de ne pas dépasser les 5 % dans la ration des porcs en croissance (Chambres d'Agriculture Auvergne-Rhône-Alpes, 2016).

En revanche, il est plus difficile de remplacer le tourteau de soja par des graines protéagineuses dans les rations pour la volaille. En effet, compte tenu des très forts besoins en protéines de ces animaux dus à leur mode de production (croissance très rapide), les protéagineuses ne contiennent pas assez de protéines par rapport au tourteau de soja (526 g/kg MS de MAT, INRA-CIRAD-AFZ, 2017; INRA, 2018). De plus, ces protéagineux ne sont pas assez disponibles sur le marché, et leur incorporation dans les formules volailles entraînerait un surcoût de la ration trop important (Bouvarel et al., 2014 ; Recoules et al., 2016). Enfin, le déficit en méthionine, en tryptophane et en acides aminés soufrés des protéagineux ne convient pas à la volaille, l'inclusion de ces graines dans leurs aliments nécessiterait une complémentation en AA de synthèse afin de garantir les performances zootechniques des animaux (Bouvarel et al., 2014). Il est de plus admis que, comme les porcs, les volailles sont sensibles aux FAN présents dans la féverole. Les tannins diminuent la digestibilité apparente de l'énergie et des protéines, et la présence de vicine et convicine a également un effet négatif sur la valeur énergétique de la féverole (Vilariño et al., 2009). En outre, la vicine et convicine contenues dans la féverole entraîne une diminution de la taille des œufs chez les poules pondeuses, sans affecter le nombre d'œufs et leur qualité (Crépon et al., 2010). Le lupin est peu utilisé en alimentation des volailles du fait de sa faible teneur en énergie et de son déséquilibre en AA (Bouvarel et al., 2014 ; Recoules et al., 2016). Les protéagineux peuvent toutefois être plus facilement utilisés en volailles label (Label Rouge par exemple), car ces animaux à croissance plus lente ont des besoins moindres en protéines (Bouvarel et al., 2014 ; Peyronnet et al., 2010) que ceux élevés en conditions standard.

Les protéagineux peuvent également être utilisés dans les formules pour poissons d'élevage. Tout comme la volaille, les poissons ont des besoins protéiques élevés, mais la teneur élevée en protéines du lupin lui permet de se substituer au tourteau de soja ou aux farines de poissons. Le pois peut également être utilisé, du fait de sa teneur à la fois en protéines et en amidon, ce qui lui confère en plus de sa valeur azotée une bonne valeur énergétique. Les graines protéagineuses sont souvent dépelliculées, pour diminuer leur teneur en parois et ainsi augmenter leur digestibilité, et extrudées avant distribution afin d'augmenter l'utilisation de leurs composantes par les animaux (Burel et al., 2000).

### *b. Chez les ruminants*

Contrairement aux monogastriques, les ruminants sont peu sensibles à la présence de FAN dans les graines protéagineuses. La présence de tannins dans les pellicules des graines

protéagineuses n'affecte pas la dégradabilité des protéines dans le rumen (Moss et al., 2000 ; Crépon et al., 2010).

Certaines graines protéagineuses ont une valeur énergétique équivalente à celle des céréales du fait de leur bonne teneur en amidon (Crépon et al., 2010). Le pois et la féverole, par exemple, sont des aliments complémentaires d'un régime basé sur le pâturage pour les VL, pour lequel il est nécessaire d'avoir une source d'énergie supplémentaire riche en glucides fermentescibles dans le rumen (Cozzi et al., 2010). Le pois peut être apporté jusqu'à 36 % de la ration des bovins à l'engraissement sans altérer les performances de croissance ni les caractéristiques des carcasses (Lardy et al., 2009). Le lupin, pauvre en amidon mais riche en lipides, est a priori intéressant pour les ruminants car il apporte de l'énergie sans accroître les fermentations ruminales, facteurs de risque d'acidose (Froidmont et Leterme, 2005). Cependant, le lupin distribué aux VL peut entraîner une diminution des protéines sécrétées dans le lait (White et al., 2007). De plus, Froidmont et Leterme (2005) recommandent un apport limité de lupin chez les VL (6 kg/j) pour ne pas risquer une chute de taux butyreux (TB) du fait d'un apport trop important en MG. En revanche, ces auteurs n'indiquent pas de limite d'incorporation du lupin dans les rations pour bovins à l'engraissement. La féverole broyée mélangée à des céréales n'affecte pas les performances des agneaux en croissance (Crépon et al., 2010). De même, l'introduction de pois ou de lupin dans la ration des agneaux avec des céréales peut entraîner une légère surconsommation de protéagineux, mais n'affecte pas les performances des animaux ni la qualité des carcasses (Normand et al., 2003). Tout comme chez les monogastriques, malgré un niveau correct d'apport en lysine, les graines protéagineuses ne permettent qu'un apport limité en méthionine et en acides aminés soufrés (Puhakka et al., 2016 ; Vander Pol et al., 2009).

Contrairement au tourteau de soja, les graines de féverole, lupin et pois ont une dégradabilité ruminale élevée (autour de 80 %, Tableau 2), du fait de la vitesse et de l'amplitude de dégradation élevées des protéines de ces graines dans le rumen, conduisant à une moindre part de protéines alimentaires échappant à la dégradabilité ruminale (Singh et al., 1995). Cela leur confère une moins bonne valeur alimentaire (valeur PDIA plus faible) puisque la valeur protéique d'un aliment dépend en partie de la fraction protéique non dégradée qui entre dans l'intestin (Mogensen et al., 2008). Cependant, les protéines by-pass ont une digestibilité élevée (Froidmont et Leterme, 2005).

Tableau 2 : efficacité d'utilisation et valeur azotée de différentes graines protéagineuses

<b>Graine</b>	<b>Tourteau de soja<sup>1</sup></b>	<b>Lupin blanc<sup>1</sup></b>	<b>Lupin à feuilles étroites<sup>1</sup></b>	<b>Féverole blanche<sup>1</sup></b>	<b>Féverole colorée<sup>1</sup></b>	<b>Pois<sup>1</sup></b>
MAT, g/kg MS	526	380	337	312	295	233
DT <sub>N</sub> , %	65	81	78	79	79	81
dr <sub>N</sub> , %	95	89	89	89	89	91
PDI, g/kg MS	227	124	126	116	112	99
PDIA	172	65	67	58	54	40
PDIM	55	59	59	58	58	59

<sup>1</sup>Baumont et al., 2018c

Il existe différentes solutions pour améliorer la valeur protéique des graines de féverole, lupin et pois. L'application de traitements technologiques à ces graines permet de réduire la dégradabilité ruminale des protéines, et ainsi d'augmenter la part de protéines by-pass. Ces traitements peuvent être d'ordre mécaniques (Froidmont et al., 2008 ; Cherif et al., 2018), thermiques (Mogensen et al., 2010 ; Singh et al., 1995), thermomécaniques (Petit et al., 1997 ; (Benchaar et al., 1992a) ou encore chimiques (Emile et al., 1991). Les principaux procédés utilisés sont décrits dans la partie suivante de cette étude bibliographique. Les réponses digestives et zootechniques des ruminants à l'apport de graines de féverole, pois ou lupin traitées seront développées ultérieurement dans ce manuscrit.

### III. Les procédés technologiques

Selon Kaysi et Melcion (1992), un traitement technologique (ou procédé technologique) peut être défini par « l'application de facteurs physiques et/ou mécaniques, chimiques ou fermentaires à un substrat déterminé ». Les deux objectifs principaux de l'application de tels traitements à des graines sont d'augmenter la disponibilité du contenu cellulaire des graines aux enzymes de la digestion, et ainsi augmenter l'ingestibilité et/ou la digestibilité de ces graines, et d'inactiver ou d'éliminer certaines substances nocives ou anti-nutritives des graines (Kaysi et Melcion, 1992 ; Drogoul et al., 2004). Nous nous intéresserons ici uniquement aux traitements physiques et/ou mécaniques. Il est toutefois à noter qu'un traitement chimique a eu son importance entre les années 1970 et 2000 en nutrition animale : le tannage des protéines au formaldéhyde. Il s'agissait de mélanger du formaldéhyde à un aliment broyé, afin de permettre la création de liaisons entre les fonctions amines (-NH<sub>2</sub>) des acides aminés avec la fonction aldéhyde (-CHO) du formol (Gérard and Jarrin, 2015 ; Zelter et al., 1970). Aux doses de formaldéhyde couramment utilisées (environ 1 %), ces liaisons ne peuvent pas être rompues par les microorganismes du rumen, mais sont réversibles dans les conditions de pH acide de la caillette, et les protéines peuvent ainsi être absorbées au niveau intestinal, augmentant la valeur alimentaire de l'aliment de départ. Par exemple, un tourteau de soja tanné au formaldéhyde possède une valeur PDI plus élevée qu'un tourteau de soja sans traitement (380 contre 227 g PDI/kg MS pour un tourteau non traité, Baumont et al., 2018c). Cependant, le formaldéhyde a été interdit en alimentation animale à partir de 2017 en raison de son caractère cancérogène.

Les effets des traitements appliqués aux graines de féverole, lupin et pois, sur la digestion et la valorisation des protéines, décrits dans cette partie, sont exposés dans la partie IV des Résultats de ce travail de thèse. Seuls les principes des procédés sont décrits ici.

Les traitements technologiques peuvent être distingués selon les procédés mis en œuvre. Ces procédés peuvent être de nature uniquement mécanique, uniquement thermique, ou bien associer des facteurs mécaniques et thermiques. Ces traitements peuvent être effectués à sec, ou bien en présence d'eau ou de vapeur. D'une manière générale, un procédé est défini par des

paramètres d'entrée, faciles à maîtriser, et par des paramètres de sortie, qui dépendent des caractéristiques de la machine utilisée et des caractéristiques du produit traité (Figure 16). Les paramètres d'entrée sont les propriétés physico-chimiques de la matière première traitée (structure, teneur en humidité et composition chimique, viscosité...), les propriétés des matériaux utilisés dans la machine (largeur et longueur des filières ou des vis...) et les réglages de la machine (débit d'alimentation, vitesse de rotation, énergie extérieure apportée...) (Kaysi et Melcion, 1992). Les paramètres de sortie sont le rendement propre de la machine utilisée (débit, énergie spécifique...) et les propriétés physico-chimiques de la matière première en sortie du procédé (nouvelle structure, nouvelle composition chimique, nouvelle valeur nutritionnelle...) (Kaysi et Melcion, 1992). Les paramètres de sorties ne sont pas toujours reliés de façon étroite aux paramètres d'entrée.

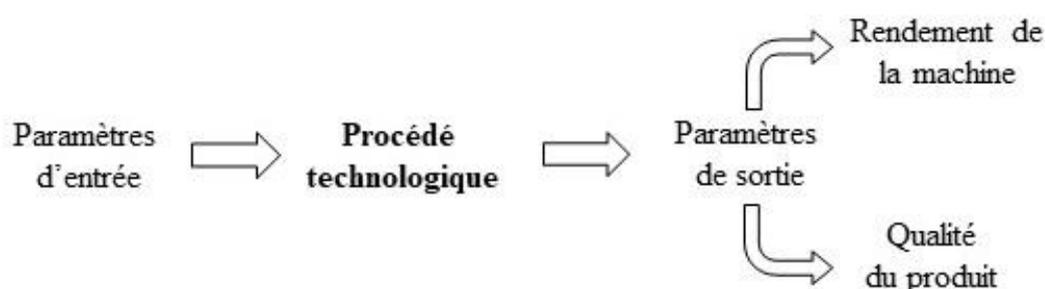


Figure 16 : schéma général d'un procédé technologique (d'après Kaysi et Melcion, 1992)

Les effets des traitements technologiques sur les graines de féverole, lupin et pois seront développés dans l'étude quantitative présentée dans la partie IV des Résultats de cette étude.

### 1. Procédés mécaniques

Les procédés mécaniques ne font intervenir ni température, ni ajout d'humidité, ni pression comme paramètres d'entrée pour la machine.

Le procédé mécanique le plus connu est le broyage. Il s'agit de réduire la granulométrie de la matière première à une taille désirée, afin de faciliter un futur traitement technologique, ou d'accroître la disponibilité des composants cellulaires du fait de la cassure des structures de la graine. En nutrition animale, le type de broyeur le plus utilisé est le broyeur à marteaux (Kaysi et Melcion, 1992), qui broie les graines par impacts. Les caractéristiques d'entrées sont le diamètre des trous de la grille utilisée (de l'ordre de quelques millimètres) ainsi que la vitesse de rotation des marteaux, autrement dit le nombre d'impacts des marteaux sur la graine par unité de temps. Plus les trous sont petits et plus le nombre d'impacts augmente, plus la farine obtenue sera fine. C'est un processus court, le temps de séjour des graines dans le broyeur étant en moyenne de 3 secondes (Kaysi et Melcion, 1992). Hormis, une légère perte d'humidité par échauffement, la composition chimique de la graine n'est pas modifiée par le broyage.

L'aplatissement ou le fendage des graines ne modifient pas non plus la composition chimique de la graine. La structure cellulaire de la matière première est moins altérée que dans

le cas du broyage, mais les composants sont plus accessibles aux enzymes de la digestion que pour les graines entières.

Le décortiquage, ou dépelliculage, consiste à séparer la graine en deux parties : le tégument d'un côté et l'amande de l'autre, par concassage puis tri. Les paramètres d'entrée sont l'écartement (de quelques millimètres) et la vitesse de rotation des cylindres qui composent le décortiqueur. Contrairement au broyage, le décortiquage modifie la composition chimique de la matière première : une petite partie des protéines, une partie des constituants pariétaux, et la majorité des tannins pour les variétés de protéagineux colorés, sont retirés car contenus dans le tégument.

Enfin, la turboséparation permet, après un broyage très fin (taille des particules inférieure à 30  $\mu\text{m}$ , Kaysi et Melcion, 1992), de séparer les constituants principaux d'une graine (comme l'amidon et les protéines par exemple). Le principe repose sur la différence de taille entre les composants au sein d'une cellule. Ces composants subissent une séparation centrifuge par air, le seuil de séparation étant défini par la vitesse de l'air (Kaysi et Melcion, 1992).

## 2. Procédés thermiques

Les procédés thermiques impliquent que la matière première soit chauffée, avec ou sans ajout d'humidité, mais sans faire intervenir de pression extérieure aux graines. La durée de ces traitements est très variable.

La cuisson est le procédé thermique le plus simple à mettre en œuvre. Il s'agit de plonger les graines dans l'eau et de les mettre à chauffer. La durée de traitement est variable (de 30 à 50 minutes de manière générale), de même que l'intensité du chauffage.

L'infrarouge consiste à soumettre pendant environ une minute les graines à un rayonnement infrarouge produit par des tuiles ou des carreaux de céramiques chauffés très fort (entre 750 et 930°C). La température augmente rapidement à l'intérieure des graines (jusqu'à atteindre 120-135°C) et la pression dans la graine augmente également (Drogoul et al., 2004 ; Kaysi et Melcion, 1992). Les paramètres d'entrée de ce procédé sont le temps d'exposition des graines à la chaleur (de 40 à 90 secondes), et l'intensité du procédé thermique (déterminé par la longueur des ondes émises, de l'ordre de quelques microns). L'infrarouge ne doit pas être confondu avec la micro-ondisation, qui consiste à chauffer les graines grâce à un champ électrique dont l'orientation alterne (Drogoul et al., 2004). Les longueurs d'ondes sont beaucoup plus importantes que pour l'infrarouge (de l'ordre de plusieurs centimètres, Kaysi et Melcion, 1992) mais la durée des deux procédés est similaire.

Le toastage et la torréfaction sont deux procédés assez similaires, qui consistent à chauffer les graines pendant un temps plutôt long (de quelques minutes à quelques dizaines de minutes). La différence entre ces deux procédés est que la torréfaction s'effectue à sec, entraînant des températures plus élevées (160-180°C), tandis que le toastage s'effectue en présence de vapeur

induisant des températures en moyenne plus faibles (110-130°C) (Drogoul et al., 2004 ; Cetiom, 2003).

Le jet-sploder utilise de l'air sec très chaud (315°C) qui est injecté dans les graines. Sous l'effet de cette brusque chaleur, l'intérieur des graines atteint 150-180°C, et le contenu cellulaire éclate sous l'effet de la vaporisation de l'eau contenue dans les cellules (Deacon et al., 1988 ; Drogoul et al., 2004). L'objectif est souvent la gélatinisation de l'amidon afin d'augmenter sa sensibilité aux attaques enzymatiques. Ce traitement est court, souvent inférieur à 1 minute (Cetiom, 2003).

### **3. Procédés thermomécaniques**

Les procédés thermomécaniques allient à la fois l'application de chaleur et l'application de pression aux graines traitées. La durée peut être variable selon traitement, de même que l'intensité de la pression exercée ou l'importance de la température subie par la graine. Ces traitements peuvent être effectués à sec ou après ajout d'eau ou de vapeur.

Largement utilisée en nutrition animale, la granulation est la compaction d'un ou plusieurs produits, initialement sous forme de farines. Le produit initial, souvent additionné de vapeur d'eau, passe de manière forcée par des rouleaux à travers une presse à filière. Une lame coupe le produit ainsi aggloméré à la sortie de la filière. La pression engendrée entraîne une augmentation de température du produit, qui dépend de la taille et de la forme de la filière et du comportement rhéologique du produit, mais reste inférieure à 100°C (Cetiom, 2003). Les paramètres d'entrées sont les caractéristiques physico-chimiques de la matière première, le temps de séjour du produit dans la filière, la quantité d'eau ajoutée ainsi que la chaleur apportée par la vapeur.

Le floconnage, largement utilisé pour les céréales, consiste à chauffer les graines entières par de la vapeur, puis les aplatir entre deux cylindres cannelés tournant à même vitesse (Drogoul et al., 2004 ; Kaysi et Melcion, 1992). La température des graines au cours du processus avoisine les 90°C. Les paramètres d'entrée de ce procédé sont la quantité et la température de la vapeur ajoutée, la vitesse de rotation des cylindres, leur écartement et les caractéristiques des cannelures.

L'expansion est un procédé court (de l'ordre de 15 à 30 secondes) lors duquel les graines sont chauffées à l'air chaud sous une pression de l'ordre de 30 à 40 bars (Drogoul et al., 2004 ; Cetiom, 2003) ce qui entraîne leur gonflement.

L'autoclavage consiste à cuire les graines sous pression, de manière similaire à la cuisson dans une cocotte-minute. La température peut atteindre 130°C. L'autoclavage est un procédé long, la cuisson des graines pouvant durer une trentaine de minute, voire 50 minutes (Moss et al., 2000 ; Aguilera et al., 1992).

L'extrusion est un procédé complexe mais très court (inférieur à 30 secondes, Drogoul et al., 2004 ; Kaysi et Melcion, 1992), qui allie cuisson et texturation des produits. Les graines sont

forcées à passer à travers une filière dans laquelle elles sont soumises à des forces de compression et de cisaillement sous l'effet d'une ou deux vis sans fin dans un fourreau. Ces vis sont composées de différents tronçons, séparés par des écluses (sorte de disque qui réduit l'espace que peut occuper le produit, Berger et al., 1992). Dans le cas d'un extrudeur monovis, les frottements sont obtenus entre la vis et le fourreau, et dans le cas d'un extrudeur bi-vis, ils sont obtenus entre les deux vis. Ces frottements entraînent l'échauffement du produit. Selon les caractéristiques physico-chimiques du produit et les contraintes physiques appliquées, la température au sein de l'extrudeur peut atteindre 160-170°C sans apport extérieur de chaleur, ou bien dépasser les 200°C si de la vapeur ou de la chaleur extérieure est apportée au produit. La pression, très élevée à l'intérieur d'un extrudeur, peut atteindre 200 bars (Kaysi et Melcion, 1992). Les paramètres d'entrée sont nombreux et dépendent à la fois du produit extrudé (composition chimique, viscosité, comportement rhéologique), de la configuration du montage de l'extrudeur (diamètre des fûts, nombre de fûts, diamètre des écluses, diamètre de la filière ou de la buse de sortie), de la configuration de la ou des vis (vitesse de rotation, filetage simple ou double) et du choix du processus d'extrusion (chauffage ou non du fourreau, apport ou non d'humidité, débit d'alimentation). Au sein du fourreau, il y a trois étapes distinctes lors de l'extrusion (Figure 17). Tout d'abord le produit, qui arrive de la cuve de prétraitement, est comprimé contre le fourreau par augmentation du diamètre de la vis. Puis il y a fusion du produit par échauffement suite aux forces de compression et de cisaillement. Enfin, il y a expansion lorsque le produit, après avoir été comprimé fortement lors du process, sort de l'extrudeur, soit par une buse (cône de sortie d'extrudeur muni d'un trou unique) soit par une filière (plaque de sortie d'extrudeur munie de plusieurs trous).

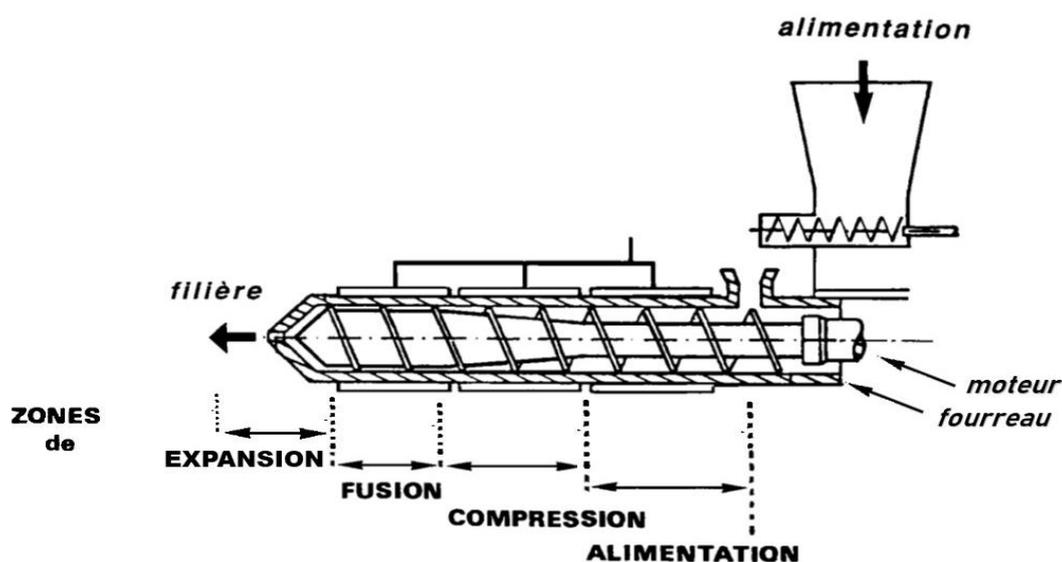


Figure 17 : schéma d'un extrudeur monovis (d'après Kaysi et Melcion, 1992 et Berger et al., 1992)

La diversité de tous ces procédés, et la diversité des réglages possibles des appareils pour un procédé en particulier conduit à une grande diversité de traitements des graines protéagineuses possibles. De plus, selon la composition et les caractéristiques physico-chimiques de la matière première traitée, le comportement de celle-ci lors du procédé va plus ou moins changer, ce qui peut affecter l'efficacité du traitement mis en place. Pourtant, ces procédés sont rarement décrits de façon précise dans les travaux publiés. Les informations les plus souvent trouvées sont la température et la durée du procédé, et parfois quelques caractéristiques de réglage des machines, comme le débit par exemple. Concernant l'extrusion, il est le plus souvent précisé s'il s'agit d'un extrudeur mono- ou bi-vis, et quelques auteurs seulement précisent l'énergie mécanique spécifique (qui est l'estimation de l'intensité du traitement thermomécanique fournie au produit extrudé).

La description fine des procédés mis en œuvre facilite l'interprétation des résultats obtenus suite à l'utilisation des graines traitées lors d'essais *in situ* ou *in vivo* chez les ruminants, et plus encore facilite leur comparaison. C'est pourquoi, dans ce travail de thèse, nous nous sommes attachés à décrire finement les conditions d'extrusion appliquées sur les graines protéagineuses utilisées dans les essais mis en place.

# Objectifs, hypothèses et stratégies de travail

---

## I. Objectifs et stratégies du travail de thèse

Cette thèse fait partie du projet PROLEVAL, décrit dans la partie II de l'introduction. **L'objectif du projet PROLEVAL sur le volet « ruminants » est d'élaborer des combinaisons « matière première × traitement technologique » les plus intéressantes possibles pour l'alimentation des vaches laitières**, c'est-à-dire ayant une dégradabilité des protéines dans le rumen la plus faible possible tout en maintenant la digestibilité intestinale de ces protéines. Pour établir de telles combinaisons, le choix s'est porté sur les graines de féverole et de lupin, apportées à hauteur de 90 % (le reste du mélange étant constitué de 10 % de lin). Ces mélanges ont été extrudés selon différentes conditions, afin de tester les effets de la température, de la pression appliquée et des conditions de maturation des graines avant extrusion. L'ajout de produits a également été testé, dans le but d'augmenter la protection des protéines induite par l'extrusion seule. Ces produits ajoutés étaient de l'eau, de l'urée, des tannins ou encore des sucres réducteurs. Les différentes combinaisons de ces facteurs expérimentaux ont conduit à l'obtention de 105 formules à tester lors de différentes phases de screening réparties en plusieurs étapes au cours du projet.

Ces screening consistaient dans un premier temps, outre la caractérisation chimique des produits, en des mesures *in vitro* pour déterminer leur DE1. Les combinaisons les plus prometteuses, c'est-à-dire celles présentant les DE1 mesurées les plus faibles, ou des combinaisons permettant *a priori* d'accentuer la protection, ont ensuite été testées *in vivo* lors des deux essais de la thèse sur vaches laitières. Des mesures *in situ* ont été réalisées en parallèle sur ces produits, mais malheureusement les résultats de  $DT_N$  et  $dr_N$  ont été obtenus *a posteriori* des essais *in vivo*. De ce fait, la valeur PDI des aliments expérimentaux distribués aux animaux lors des essais *in vivo* a été calculée avec une  $DT_N$  estimée à partir de la DE1 mesurée (INRA, 2007 ; 2018).

Le premier essai *in vivo*, conduit début 2017, a permis de tester des combinaisons « matière première × traitement technologique » issues des phases de screening réalisées en 2015. Les combinaisons retenues ont été les mélanges 90 % féverole – 10 % lin et 90 % lupin – 10 % lin, sous forme crue et extrudée à 140°C, dont les résultats étaient les plus prometteurs à l'issue de cette phase de screening sur la DE1. Ces mêmes mélanges, extrudés à une température de 160°C visant *a priori* à accentuer la protection des protéines, ont également été testés dans cet essai *in vivo* au cours duquel ces 6 produits ont été comparés au tourteau de soja.

Le deuxième essai *in vivo*, conduit début 2018, a permis de tester 3 combinaisons prometteuses issues des phases de screening de 2017. Il s'agissait cette fois uniquement du mélange 90 % féverole – 10 % lin sous forme crue, extrudée à 140°C après maturation en conditions classiques, c'est-à-dire un conditionnement thermique sans ajout d'autre produit (de manière *a priori* identique au traitement équivalent de l'essai *in vivo* 1), ou extrudée à 140°C après maturation avec ajout de sucres réducteurs. Un 4<sup>ème</sup> traitement innovant supplémentaire, basé sur une maturation avec ajout d'un cocktail enzymatique avant extrusion à 140°C, a également été développé pour cet essai *in vivo*.

Pour chacune des dix combinaisons retenues pour ces deux essais *in vivo* ainsi que pour le tourteau de soja, l'accent a été mis sur la description la plus précise possible des graines utilisées (composition chimique, DE1, dégradabilité et paramètres des cinétiques de dégradation, digestibilité réelle). Des analyses des composés de Maillard ont également été réalisées, ce qui est, à notre connaissance, inédit dans les études d'utilisation des graines protéagineuses chez les ruminants. Enfin, les procédés d'extrusion utilisés ont été décrits finement, afin de mieux comprendre les résultats observés.

Parallèlement à ce travail expérimental, une synthèse quantitative des données publiées sur les réponses digestives et zootechniques des vaches laitières obtenues lors d'une substitution du tourteau de soja par des graines protéagineuses, et lors d'un traitement technologique des graines protéagineuses, a été réalisée.

Pour répondre à l'objectif fixé, ce travail de thèse s'est donc découpé en trois axes majeurs, décrits ci-dessous.

## II. Axe 1

Le premier axe de travail avait pour objectif de déterminer **les effets du degré d'extrusion de mélanges à base de féverole et de lupin sur l'utilisation des protéines chez la vache laitière**. L'hypothèse était que l'accroissement de la température d'extrusion augmentait la protection de l'azote dans le rumen et la digestibilité des protéines dans l'intestin. Pour vérifier cette hypothèse, un essai *in vivo* sur 8 vaches laitières en lactation a été conduit, pendant lequel les vaches étaient alimentées avec soit du tourteau de soja (régime témoin), soit les mélanges 90 % féverole – 10 % lin ou 90 % lupin – 10 % lin distribués soit crus, soit extrudés à basse température (140°C) ou à haute température (160°C). Outre des mesures de digestibilité, de production laitière et de partition de l'azote, les aliments et les procédés d'extrusion ont été caractérisés finement. La description de cet essai et des résultats qui en découlent se trouve dans la partie I des résultats de ce manuscrit, tandis que les résultats de la détermination de la  $DT_N$  et de la  $dr_N$  de ces mélanges, obtenus postérieurement, sont présentés dans la partie III des résultats.

### III. Axe 2

Le deuxième axe de travail avait pour objectif d'évaluer **les effets de l'ajout de sucres réducteurs ou d'un cocktail enzymatique lors de la phase de maturation avant extrusion d'un mélange à base de féverole sur l'utilisation des protéines chez la vache laitière**. L'hypothèse était que la maturation avec du sucre (par apport exogène grâce aux sucres réducteurs ou par libération de sucres endogènes grâce aux enzymes contenues dans le cocktail enzymatique) avant extrusion permettait d'augmenter la complexation des protéines et donc d'accroître leur protection dans le rumen par rapport à l'extrusion réalisée après maturation classique. Afin de vérifier cette hypothèse, un essai *in vivo* sur 16 vaches laitières en lactation a été conduit, lors duquel les vaches étaient alimentées soit avec le mélange 90 % féverole – 10 % lin cru (régime témoin), soit avec ce mélange extrudé après maturation classique, ou après maturation avec des sucres réducteurs, ou après maturation avec un cocktail enzymatique. Le traitement d'extrusion correspondait au traitement 140°C mis en place lors du premier essai *in vivo*. Les mesures réalisées lors de cet essai ont été identiques à celles réalisées dans le premier essai. Ces mesures, ainsi que les résultats issus de cet essai, sont décrits dans la partie II des résultats de ce manuscrit. Les résultats de  $DT_N$  et  $dr_N$  de ces mélanges, obtenus postérieurement, sont quant à eux présentés dans la partie III des résultats.

### IV. Axe 3

Le troisième axe de ce travail de thèse avait pour objectif de synthétiser, par une approche quantitative, les connaissances publiées sur la digestion et l'utilisation des graines protéagineuses chez le ruminant. **Deux bases de données** ont été constituées pour regrouper toutes les informations trouvées dans la littérature **sur l'utilisation digestive, les performances zootechniques, la partition de l'azote, la dégradabilité ruminale et la digestibilité réelle de l'azote lorsque des graines protéagineuses** sont distribuées à des **ruminants**. Ces bases, qui regroupent respectivement les données issues d'essais *in vivo* pour la première et *in situ* pour la seconde, ont été analysées selon deux grands axes de comparaisons. Le premier axe comprenait les comparaisons « tourteau de soja versus graines protéagineuses crues ou traitées », et le second axe comprenait les comparaisons du type « graine protéagineuse crue versus graine protéagineuse traitée ». La constitution de ces deux bases de données, leurs analyses et les résultats de ces analyses pour les vaches laitières sont présentés dans la partie IV des résultats de ce manuscrit.

# Résultats

---

## I. Effets du remplacement du tourteau de soja par des mélanges contenant de la féverole ou du lupin crus ou extrudés sur l'utilisation des protéines et les performances des vaches laitières



J. Dairy Sci. 102:5130–5147  
<https://doi.org/10.3168/jds.2018-15416>  
© American Dairy Science Association®, 2019.

### Effects of replacing soybean meal with raw or extruded blends containing faba bean or lupin seeds on nitrogen metabolism and performance of dairy cows

S. Mendowski,<sup>1,2</sup> P. Chapoutot,<sup>3</sup> G. Chesneau,<sup>2</sup> A. Ferlay,<sup>1</sup> F. Enjalbert,<sup>4</sup> G. Cantalapiedra-Hijar,<sup>1</sup> A. Germain,<sup>2</sup> and P. Nozière<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Université Clermont Auvergne, INRA, VetAgro Sup, UMR Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

<sup>2</sup>Valorex, La Messayais, F-35210 Combourtille, France

<sup>3</sup>UMR MoSAR, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, F-75005 Paris, France

<sup>4</sup>GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, ENVT, F-31320 Castanet Tolosan, France

*Article accepté dans Journal of Dairy Science le 20 février 2019*



## Effects of replacing soybean meal with raw or extruded blends containing faba bean or lupin seeds on nitrogen metabolism and performance of dairy cows

S. Mendowski,<sup>1,2</sup> P. Chapoutot,<sup>3</sup> G. Chesneau,<sup>2</sup> A. Ferlay,<sup>1</sup> F. Enjalbert,<sup>4</sup> G. Cantalapiedra-Hijar,<sup>1</sup> A. Germain,<sup>2</sup> and P. Nozière<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Université Clermont Auvergne, INRA, VetAgro Sup, UMR Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

<sup>2</sup>Valorex, La Messayais, F-35210 Combourillé, France

<sup>3</sup>UMR MoSAR, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, F-75005 Paris, France

<sup>4</sup>GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, ENVT, F-31320 Castanet Tolosan, France

### ABSTRACT

The objective was to test the effects of replacing soybean meal in dairy cow diets with either raw or extruded faba bean:linseed or lupin:linseed blends on intake, milk yield and composition, N partitioning, and ruminal and plasma parameters. Our main hypotheses were that N from extruded blends was less degradable in the rumen than N from raw seeds, and that a higher extrusion temperature favored ruminal protection of proteins and milk protein yield, and lowered urinary N excretion. Eight Holstein cows fitted with ruminal cannulas were used in two 4 × 4 Latin square design experiments conducted in parallel. In both experiments, cows were fed diets with a crude protein content of 14.6%, containing 60% of forage (dry matter basis). Treatments differed by the composition of the concentrates: control in both experiments was based on soybean meal, and experimental treatments were based on proteaginous:linseed (90:10%) blends consisting of faba bean blends (first experiment) or lupin blends (second experiment) presented either raw, extruded at 140°C, or extruded at 160°C. Intake, milk yield and composition, ruminal pH, volatile fatty acids and ammonia kinetics, digestibility, N partitioning, Maillard compounds in feed and feces, plasma AA, and <sup>15</sup>N natural enrichment were measured. Data were analyzed using ANOVA according to the MIXED procedure of SAS (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC). Ammonia content in ruminal fluid did not significantly change when soybean meal was replaced by either raw or extruded faba bean, but tended to be higher with lupin. Milk yield

was increased by 2.6 kg with faba bean blend extruded at 140°C compared with faba bean blend extruded at 160°C. Milk fat and milk protein concentrations were decreased by 3.1 and 2.3 g/kg, respectively, with lupin blends compared with soybean meal. Nitrogen partitioning between milk, feces, and urine did not change. Nitrogen apparent digestibility decreased by 3 g/100 g of N between faba bean blend extruded at low and at high temperatures. The content of Maillard compounds in feces was higher with blends extruded at 160°C than with raw or extruded at 140°C blends within both experiments. Total plasma AA tended to be higher with extruded blends than with raw in the faba bean experiment. Both extrusion temperatures appeared to protect dietary proteins from ruminal degradability, but proteins seemed to be overprotected at 160°C.

**Key words:** dairy cow, extrusion, nitrogen, proteaginous seed

### INTRODUCTION

Sources of protein in the diets of dairy cows are now mainly supplied by soybean meal due to its high protein content (52.6 ± 1.1%, mean ± SD, on a DM basis, INRA-CIRAD-AFZ, 2017). However, France is deficient in its production of protein-rich feedstuff for animals and has very low soybean production, which leads to a massive import of soybean meal (Peyronnet et al., 2014), 2.8 million t in 2016/2017 (Terres Univia, 2017). Proteaginous seeds such as lupin, faba bean, and pea grown in France could be an alternative solution to feed dairy cows. However, these seeds have disadvantages: their protein content is lower than that of soybean meal and their proteins are highly degraded in the rumen (79% for faba bean and 81% for lupin vs. 65% for soybean meal, INRA-CIRAD-AFZ, 2017). Mechanical and thermal seed treatments such as extrusion are solutions to reduce ruminal protein degradability,

Received July 20, 2018.

Accepted February 20, 2019.

\*Corresponding author: pierre.noziere@inra.fr

while maintaining a high intestinal protein digestibility (Bayourthe et al., 1998).

Although most of the results from in situ studies, numerous in cows, converge toward a lower effective degradability of N (**ED<sub>N</sub>**) when faba bean or lupin seeds are extruded (vs. raw seeds), in vivo experiments are inconclusive. Indeed, in vivo studies on intake and milk production when soybean or rapeseed meal are replaced by raw or extruded proteaginous seeds are scarce, in particular with extruded faba bean. Among these studies, only a few report results on N partitioning between feces, urine, and milk. Moreover, when proteaginous seeds are extruded, very little information about extrusion conditions is available (e.g., exit temperature of product, or extrusion time), which precludes an overall interpretation of available results.

Our hypotheses are that (1) N from extruded faba bean and lupin is expected to be less degradable in the rumen than N from raw seeds, (2) temperature during extrusion has an effect on the extent of rumen protein degradation, and (3) lower N degradability with extruded blends will promote higher milk yield and lower urinary N excretion.

Consequently, 2 in vivo experiments were conducted in parallel on dairy cows to test the effects of replacing soybean meal by raw or extruded faba bean and lupin seeds at 2 temperature levels. The extrusion conditions to obtain the experimental concentrates were precisely characterized. The N partitioning, as well as indicators of digestive and metabolic N use, were measured.

## MATERIALS AND METHODS

These experiments were conducted in INRA facilities (Herbipôle, UE 1414, Theix, France) following validation by the Ethics Committee of the Auvergne-Rhône-Alpes region and the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation (APAF-IS#7652-2016111015426814 v6).

### Animals, Experimental Design, and Diets

Eight multiparous lactating Holstein cows fitted with rumen cannulas (outer and inner diameters of 123 and 106 mm, respectively), weighing  $754 \pm 58$  kg (mean  $\pm$  SD) at  $65 \pm 21$  d of lactation, were used in the 2 experiments according to two  $4 \times 4$  Latin square designs. The 2 experiments were conducted simultaneously in parallel, with 4 experimental periods for each Latin square. Each period lasted 28 d, including 22 d of adaptation to the diet, during which cows were housed in free stabling and fed ad libitum. Cows divided between the 2

experiments were similar in terms of DMI, parity, DIM, and milk yield and composition. Measurements were carried out during the last 6 d of each period, during which the cows were housed in individual stalls and fed at 95% of the ad libitum intake (measured between d 14 to 22). The cows have been previously accustomed to individual stalls, and all treatments were strictly compared under the same housing conditions.

Within each experiment, the 4 diets were formulated to be iso-CP and iso-net energy of lactation (**UFL**) according to INRA 2018 assuming a feeding level of 3% of BW (Table 1). All the diets contained 60% forage and 40% concentrate, on a DM basis, with a common mixture of corn silage, grass silage, hay, and beet pulp, and differed according to protein source provided by the experimental concentrate. The experimental concentrate supplied 50% of total dietary CP. It consisted of ground corn grain and soybean meal for the same control diet (**C**) in both experiments, substituted by experimental concentrate containing ground corn and 90:10 blends (on raw basis) of faba bean (*Vicia faba*): linseed in the first experiment (**F**) or ground corn and lupin (*Lupinus albus*): linseed in the second experiment (**L**); namely, faba bean blend and lupin blend, respectively. Linseed was added to each blend to benefit from the mechanical effects of its lipid content on extrusion conditions of proteaginous seeds. In each experiment, these blends were either raw (**R**), or extruded at a low or high expected output temperature of 140°C (**E1**) or 160°C (**E2**). Chemical composition of the soybean meal and of the blends is shown in Table 2. All diets were supplemented with 0.25% urea to ensure a sufficient level of available N for rumen microorganisms, and 50 g/d of MetaSmart Dry (Kemin France, Nantes, France) to guarantee an adequate supply of metabolizable methionine. The cows also received 200 g/d of mineral and vitamin supplement containing 4.5% P, 20% Ca, 4.5% Mg, and 5% Na (Galaphos Midi Duo, CCPA, Janzé, France). Faba bean and lupin blends were supplied by Valorex (Valorex S.A., Combourtillé, France). According to INRA (2018), diets with 40% of concentrate and containing more than 350 g of NDF/kg of DM, close to 300 g/kg of DM of NDF forage, and less than 200 g of degradable starch/kg of DM are likely to prevent ruminal acidosis.

Diets (forages mixed together and concentrates added above) were distributed twice a day, 60% at 0900 h and 40% at 1600 h. Water and a salt rock were available ad libitum throughout the experiments. Milking was conducted daily at 0730 and 1530 h, in the milking parlor from d 1 to 22 of each period and in the stalls from d 23 to 28.

**Table 1.** Ingredients, chemical composition, and nutritive values of the diets<sup>1</sup>

Item	C	Faba bean			Lupin		
		FR	FE1	FE2	LR	LE1	LE2
% of DM							
Corn silage	33	33	33	33	33	33	33
Grass silage	17	17	17	17	17	17	17
Hay	10	10	10	10	10	10	10
Dehydrated beet pulp	10.75	10.75	10.75	10.75	10.75	10.75	10.75
Ground corn	17.7	4	4	4	10.5	10.5	10.5
Soybean meal	11.3	—	—	—	—	—	—
90% Faba bean + 10% linseed	—	25	25	25	—	—	—
90% Lupin + 10% linseed	—	—	—	—	18.5	18.5	18.5
Urea	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
CP (g/kg of DM)	146	146	146	146	146	146	146
NDF (g/kg of DM)	378	388	388	388	394	394	394
Starch (g/kg of DM)	243	230	230	230	190	190	190
Ether extract (g/kg of DM)	26	33	33	33	45	45	45
Nutritive value according to INRA (2018)							
PDI <sup>2</sup> (g/kg of DM)	92	80	91	99	80	92	100
RPB <sup>3</sup> (g/kg of DM)	3.47	14.82	5.50	-2.33	15.54	5.71	-2.61
PDIA <sup>4</sup> (g/kg of DM)	44	30	42	51	30	42	52
Net energy (UFL <sup>5</sup> /kg of DM)	0.94	0.95	0.95	0.94	0.98	0.97	0.96
Rumen degradable starch (g/kg of DM)	155	162	153	153	123	123	123
LysDi <sup>6</sup> (% of PDI)	6.82	7.18	7.10	7.09	6.85	6.44	6.51
MetDi <sup>7</sup> (% of PDI)	2.53	2.62	2.38	2.29	2.67	2.42	2.31

<sup>1</sup>C = control (soybean meal); F = faba bean blends; L = lupin blends; R = raw blend; E1 = blend extruded at 140°C; E2 = blend extruded at 160°C.

<sup>2</sup>PDI = protein truly digestible in the intestine.

<sup>3</sup>RPB = rumen protein balance.

<sup>4</sup>PDIA = dietary protein truly digestible in the intestine.

<sup>5</sup>UFL = net energy for lactation; 1 UFL = 1,760 kcal of NE<sub>L</sub>.

<sup>6</sup>LysDi = lysine truly digestible in the intestine.

<sup>7</sup>MetDi = methionine truly digestible in the intestine.

## Extrusion Conditions

Linseed was added to faba bean and lupin seeds because of its fat content: during the process of extrusion, linseed fat made the passage of proteaginous seeds easier by decreasing viscosity of proteaginous seeds compared with proteaginous seeds extruded alone.

Before both extrusion treatments (low or high temperature), faba bean and lupin blends underwent a pretreatment, which consisted of grinding followed by

thermal preconditioning. Extrusion of these blends then took place in a single screw extruder. The increase in temperature of the blends within the extruder occurred by self-heating as a result of the applied compression and shear forces, without any external thermal energy supply. Target temperatures of 140 and 160°C were previously determined based on an analysis of the literature and in vitro and in situ experiments on the blends (Chapoutot et al., 2016, 2018, and unpublished results by the same authors). These in situ experiments tested

**Table 2.** Chemical composition of the soybean meal used as control and experimental proteaginous:linseed blends

Item	Soybean meal	Faba bean:linseed (90:10)			Lupin:linseed (90:10)		
		Raw	Extruded at 140°	Extruded at 160°C	Raw	Extruded at 140°	Extruded at 160°C
DM (%)	87.8	86.4	90.2	90.6	89.7	93.0	95.8
OM (g/kg of DM)	933	961	956	959	958	957	957
CP (g/kg of DM)	521	276	285	279	329	339	344
NDF (g/kg of DM)	139	242	172	181	216	206	244
ADF (g/kg of DM)	81	117	112	117	144	134	142
Ether extract (g/kg of DM)	19	63	65	62	115	112	119
NFC <sup>1</sup> (g/kg of DM)	254	380	434	437	298	300	250

<sup>1</sup>NFC calculated as  $NFC = 1,000 - (1,000 - OM) - CP - NDF - \text{ether extract}$ .

**Table 3.** Incoming and outgoing parameters of extruders

Item	Faba bean:linseed (90:10)		Lupin:linseed (90:10)	
	Extruded at 140°	Extruded at 160°C	Extruded at 140°	Extruded at 160°C
Incoming parameter				
Le/D ratio <sup>1</sup>	8.1	8.1	8.1	9.7
Intensity (% of extruder's potential)	92.1	92.4	81.8	77.0
Outgoing parameter				
Blend temperature <sup>2</sup> (°C)				
N-2	137	145	102	110
N-1	154	172	143	160
N	143	160	143	145
Mechanical power (kW)	103.0	103.3	91.5	86.1
Thermal energy level (°C × mm × kg/h)	18.96	21.94	21.22	30.87
Mechanical energy index (Wh/kg)	60	55	54	62

<sup>1</sup>Le/D = length (Le) to diameter (D) ratio of the extruder.

<sup>2</sup>N-2 = antepenultimate section; N-1 = penultimate section; N = last section of the extruder.

a wide range of extrusion conditions, and the temperature of 140°C (which was the highest temperature tested) appeared to be the most efficient to decrease the ED<sub>N</sub>. In the present work, we hypothesized that the effects of extrusion were stronger at 160°C than at 140°C.

As a result of the different behaviors of the blends under mechanical constraint during the extrusion process (due to differences in chemical composition), the enforced mechanical constraints (compression and shearing) were modified to reach the desired temperatures: the length (**Le**) to diameter (**D**) ratio of the extruder was the same for the extrusion of both faba bean blend and lupin blend extruded at 140°C, whereas the lupin blend extruded at 160°C required an increased Le/D ratio (longer extruder, Table 3). Indeed, the lupin blend, due to its higher lipid content compared with the faba bean blend, offered little resistance to advancement by the extruder screw and to the flow through the die (as described by the lower intensity compared with faba bean blend, Table 3), and thus required greater inside constraints to raise its temperature (i.e., a greater thermal energy level). In contrast, the faba bean blend was more resistant because of a greater change in viscosity during extrusion, largely due to a change in starch structure. Consequently, faba bean blends required more mechanical power for extrusion than lupin blends. Thus, 3 different assemblies were used. A first assembly was used for the faba bean blend extruded at 140°C and had the lowest level of compression mainly due to a higher output surface. A second identical assembly was used for the faba bean blend extruded at 160°C and the lupin blend extruded at 140°C, but with variable compression levels, stronger for the lupin blend extruded at 140°C than for the faba bean blend extruded at 160°C due to a smaller exit area. Finally, a third assembly

was used for the lupin blend extruded at 160°C with an intermediate exit surface. Extruders output data are presented in Table 3. Obtained temperatures are shown for the last 3 sections in the extruders: N-2, N-1, and N represent antepenultimate, penultimate, and last sections, respectively. Compared with the target temperatures (140 and 160°C), the temperatures reached with the study extruder settings were very close to those expected at the end of the extruders for the faba bean blends (143 and 160°C for faba bean blends, extruded at low and high temperatures, respectively), and in the penultimate section of the extruders for the lupin blends (143 and 160°C for lupin blends, extruded at low and high temperatures, respectively).

### Measurements and Sampling

All measurements and sampling were identical in both experiments.

**Feed Intake and BW.** Feed intake was measured daily from d 22 to 28, and DM content of each feed was determined on 3 d between d 21 and 28 on a sample placed for 24 h in a ventilated oven at 103°C. A 200-g sample of each ingredient was also collected on d 21, 24, and 26, pooled over the period at room temperature (except for silages that were stored at -20°C), and then oven-dried at 60°C for 72 h and ground through a 1-mm sieve for subsequent chemical analyses. Between d 22 and 28, if daily fresh refusals were greater than 1 kg, 10% of the refusals were collected and pooled over the period at -20°C, and then dried and ground as described above for the chemical analyses. A separate sample was collected and placed in a ventilated oven for 24 h at 103°C to determine the DM content. Cows were weighed daily after each milking between d 1 and 20. Body condition score was also measured on a 0 to 5

scale (Bazin, 1984) at the beginning of the experiments and at the end of each period.

#### **Total-Tract Digestibility and N Partitioning.**

From d 22 to 28, feces and urine were collected separately and totally. Excreted feces were directly collected in a bin placed behind the cow, then regularly transferred in another bin to avoid losses until sampling. For urine collection, a pouch was glued around the vulva of the cow and connected by a flexible pipe to a 30-L flask containing at least 500 mL of sulfuric acid 30% to acidify the urine to a pH less than 4. Every day at 0830 h, 0.5% of the total homogenized amount of feces and urine was sampled, immediately pooled per period, and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Feces samples were then thawed, oven-dried at  $60^{\circ}\text{C}$  for 72 h, and ground through a 1-mm sieve for NDF and ash assays, or lyophilized and ground through a 1-mm sieve for N assays and determination of Maillard compounds. For feces, a sample of 0.5% of the total amount was also collected daily to determine the DM content (24 h at  $103^{\circ}\text{C}$ ).

**Rumen Fermentation Traits.** On d 23 and 27, 500 mL of ruminal fluid was collected in the ventral sac of the rumen through the ruminal cannula by suction using a hose just before and 1, 2.5, 5, and 8 h after the morning meal. For each sample, the ruminal liquid was filtered through a 250- $\mu\text{m}$  nylon pore cloth and the pH measured with a pH meter (Schott-Geräte CG840, Schott-Geräte, Mainz, Germany; Mettler-Toledo Inlab routine 51343050 electrode, Mettler-Toledo, Greifensee, Switzerland). The ruminal liquid was then used to determine VFA molar proportion and ammonia (samples stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ ), and for protozoa counting (stored in the dark at room temperature). For VFA analysis, 8 mL of ruminal fluid was mixed with 0.5 mL of a deproteinizing solution containing 1 g of crotonic acid at 0.4% and 5 g of metaphosphoric acid at 2%. Ammonia was determined in 1 mL of ruminal fluid mixed with 0.1 mL of phosphoric acid. Protozoa counting was only performed on the samples collected just before and 2.5 h after the morning meal by adding 2 mL of methyl-green formalin saline (Sigma, Darmstadt, Germany) to 2 mL of ruminal fluid.

**Milk Yield and Composition.** Milk production was recorded daily. Milk fat, protein, lactose and urea concentrations were determined using 6 samples taken on d 24, 26, and 27 of each experimental period from both morning and evening milkings. These samples were preserved in bronopol and stored at  $+4^{\circ}\text{C}$  before analysis. The respective proportions of casein versus noncasein N were also determined, using a single morning milking sample taken on d 27 and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Blood Samples.** On d 27 of each experimental period, before the morning meal, blood samples (with either heparin lithium or  $\text{K}_3\text{EDTA}$  anticoagulants,

Greiner 455084 and 455036, Greiner, Kremsmünster, Austria) were taken from the caudal vein. The collected blood samples were immediately placed in ice before centrifugation at  $3,500 \times g$  for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Plasma was aliquoted and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  ( $\text{K}_3\text{EDTA}$  anticoagulant) for plasma urea determination, and at  $-80^{\circ}\text{C}$  (heparin lithium anticoagulant) for plasma AA profile, taurine, methionine sulfoxide, and  $^{15}\text{N}$  natural abundance analyses.

#### **Chemical Analyses**

**Feeds, Diet Characteristics, and N Partitioning.** For each diet ingredient, refusal, and feces sample, N (Dumas method, norm ISO 16634-1, 2008, using a Rapid N Cube, Elementar Analysensystem GmbH, Hanau, Germany), NDF, ADF (except for feces) (Van Soest et al., 1991), and ash (overnight at  $550^{\circ}\text{C}$ ) content were determined. The enzymatic CP degradability after 1 h in vitro incubation (**ED1**) of faba bean and lupin blends was measured according to Aufrère et al. (1989, 1991). The following Maillard compounds were measured in feed blends or feces according to Niquet-Léridon and Tessier (2011): acrylamide, total lysine, N $\epsilon$ -carboxymethyl-lysine (**CML**), and hydroxymethylfurfural (**HMF**) in feed blends, and total lysine and CML in feces. Nitrogen concentration in thawed urine was measured by the Kjeldahl method (using a Foss Kjeltex 2400 analyzer, Foss, Hillerød, Denmark, with norms NF EN ISO 5983-1, 2005 and NF EN ISO 5983-2, 2009).

**Rumen Fermentation Traits.** For all assays of ruminal fluid, samples of the 2 d of measurement were pooled per cow and per sampling time for each period. Volatile fatty acids were assayed by GC (Clarus 580, fitted with a CP-Wax 58 column, Perkin Elmer, Waltham, MA) using crotonic acid as internal standard (Morgavi et al., 2003). Ammonia was determined by spectrophotometry (Weatherburn, 1967) using a Boehringer Mannheim Urea/Ammonia (ref. 10542946035) kit (wavelength of 340 nm, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany).

**Milk and Plasma.** Milk fat, protein, and lactose concentrations were performed by laboratory Galilait (Clermont-Ferrand, France) with an infrared method. Milk total N and soluble N contents in morning milking (d 27) were determined by the Kjeldahl method (Galilait, Clermont-Ferrand, France), and milk casein N was calculated as milk total N minus soluble N. Milk urea was assayed by Mean Infra-Red spectrometry in laboratory MAEL (Ceyzériat, France). Plasma urea was measured by photometry using an Arena 20XT device (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) with a urea kit (Ref. 981820 Thermo Fisher Diagnostics

SAS, Dardilly, France). Freeze-dried plasma proteins and finely ground feed samples were weighted in tin capsules and analyzed for N stable isotope composition ( $\delta^{15}\text{N}$ ;  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  ratio deviation from the international standard [atmospheric  $\text{N}_2$ ]) by using an isotope-ratio mass spectrometer (Isoprime, VG Instruments, Manchester, UK) coupled to an elemental analyzer (EA Isoprime, VG Instruments). Glutamic acid was used as internal standard and included in triplicates every 5 samples to correct for possible variations in the raw values determined by the mass spectrometer. Typical replicate measurement errors for these reference materials were  $\pm 0.1\%$ ; results are expressed using the delta notation. Plasma AA and methionine sulfoxide were assayed by tandem mass spectrometry by Biocrates Life Sciences AG (Innsbruck, Austria) using the Absolute IDQ p180 kit.

### Calculations and Statistical Analyses

The nutritive values of the diets (Table 1) were calculated according to INRA (2018), as described in detail by Sauvant and Nozière (2016), using the Systool Web application ([www.systool.fr](http://www.systool.fr)) with an a priori feeding level of 3 kg of DM/100 kg of BW and 40% of concentrate in the diet, and according to the measured chemical composition of each feed. The ED<sub>N</sub> of feedstuffs in their respective diets was calculated from INRA (2018) tables for soybean meal (63%), faba bean blends raw (79%) and extruded at 140°C (64%), lupin blends raw (82%) and extruded at 140°C (66%), and hypothesized according to previous in vitro and in situ screening assays (unpublished results) for faba bean and lupin blends extruded at 160°C (52%). The true intestinal digestibility was assumed to be 95% for soybean meal, 89% for raw faba bean blend, 97% for both extruded faba bean blends, 89% for raw lupin blend, and 99% for both extruded lupin blends, according to INRA table values (INRA, 2018) for each individual feed. Nitrogen in milk was calculated as [(milk yield  $\times$  milk protein concentration)/6.38]/0.95, assuming 95% of protein N in total N (DePeters and Cant, 1992; Spanghero and Kowalski, 1997). Nitrogen balance was calculated as the difference between N intake and N recovered in urine, feces, and milk. The apparent digestibility of a dietary chemical component was calculated as the difference between intake and fecal excretion of this component, expressed as % of its intake. The efficiency of MP [protein truly digestible in the intestine (PDI) efficiency] was calculated as the ratio between animal protein synthesis and diet available PDI, according to INRA (2018): animal protein synthesis accounts for milk + endogenous fecal + scurf + body retention, and diet available PDI accounts for PDI intake

– endogenous urinary proteins (Sauvant et al., 2018a). The isotopic discrimination between animal proteins and diet ( $\Delta^{15}\text{N}_{\text{animal-diet}}$  in ‰) was calculated for each animal as the  $\delta^{15}\text{N}$  in plasma proteins minus  $\delta^{15}\text{N}$  of its diet; the latter was calculated as the average  $\delta^{15}\text{N}$  of each ingredient weighted by the percentage of N the ingredient represents in the diet.

The statistical analyses were carried out by ANOVA with the MIXED SAS procedure (version 9.4, 2004, SAS Institute Inc., Cary, NC). The 2 experiments were analyzed separately. For each variable, the statistical unit was the mean per diet per cow. The model was

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + \text{Trt}_j + C_k + \varepsilon_{ijk}$$

where  $Y_{ijk}$  is the value of the tested variable for period  $i$ , treatment  $j$ , and cow  $k$ ;  $\mu$  is the overall mean;  $P_i$  is the period effect ( $i = 1$  to 4);  $\text{Trt}_j$  is the treatment effect ( $j = \text{C vs. R vs. E1 vs. E2}$ );  $C_k$  is the cow as random effect ( $k = 1$  to 4); and  $\varepsilon_{ijk}$  is the error. For rumen fermentation parameters, time ( $T_l$ , with  $l = 0$  vs. 1 vs. 2.5 vs. 5 vs. 8) and  $(\text{Trt} \times T)_{jl}$  were added as fixed effects using the REPEATED statement, with auto regression as covariance structure:

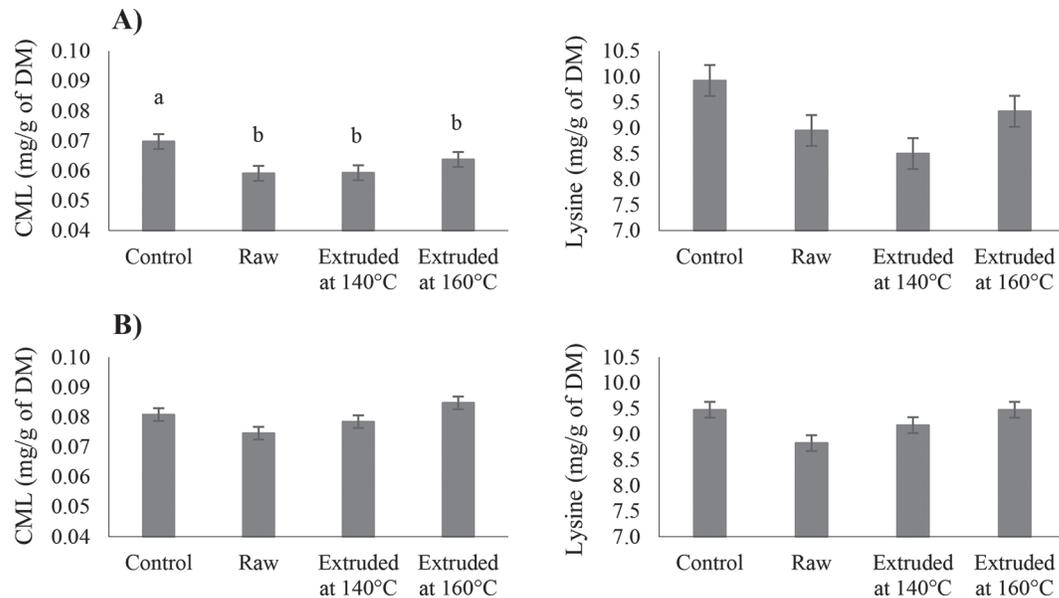
$$Y_{ijkl} = \mu + P_i + \text{Trt}_j + C_k + T_l + (\text{Trt} \times T)_{jl} + \varepsilon_{ijkl}$$

where  $Y_{ijkl}$  is the value of  $Y_{ijk}$  at time  $l$ . Analyses of contrasts were also conducted within each experiment to compare control vs. blends [C vs. (R, E1, E2)], raw vs. extruded blends [R vs. (E1, E2)], and extrusion conditions (E1 vs. E2). The differences were considered significant below the threshold  $P$ -value of 0.05 and a trend was considered at  $0.05 < P < 0.10$ . Effects of contrasts were taken into account when Trt effect was significant ( $P < 0.05$ ) or a trend ( $P < 0.10$ ).

## RESULTS

### Enzymatic CP Degradability and Maillard Compounds

The ED1 of CP was lower for extruded blends compared with raw blends and was slightly lower for faba bean blends than lupin blends, but the level of extrusion (low or high temperature) led to similar ED1 values (Table 4). Maillard compound contents of the feeds were higher in extruded blends. The effect of extrusion on acrylamide, and to a lesser extent on CML content, was less marked with extruded faba bean than with extruded lupin blends, especially at high temperature. Moreover, the total lysine content of extruded blends was slightly decreased compared with raw blends, especially for lupin blend extruded at 160°C. Significant



**Figure 1.** Effect of protein source on Maillard compounds in feces in faba bean (A) and lupin (B) experiments. Means with different letters (a,b) differ ( $P = 0.05$ ). Vertical bars refer to SE. CML = N $\epsilon$ -carboxymethyl-lysine.

treatment effects on Maillard compound contents in feces were observed for the faba bean experiment ( $P = 0.050$ , Figure 1A); less CML was observed in feces when cows were fed with blends than with control.

### Feed Intake, BW, BCS, and Milk Yield and Composition

Within both experiments, no significant difference was observed between diets in terms of DMI, BW, BCS, 4% FCM yield, milk fat and protein yields, milk soluble CP and milk casein/CP ratio, and net energy balance (Table 5). For all treatments, milk fat concentration was low (on average 30.7 g/kg).

Significant treatment effects were observed in the faba bean experiment: cows fed FE2 produced less milk than those fed FE1 (and milk yield tended to be higher

with FE than with FR diets). Milk lactose concentration was lower with FE than with FR, but higher with FE2 than with FE1. There was a trend of treatment effect on milk protein concentration, which was lower with blends than with C.

Significant treatment effects were also observed in the lupin experiment: milk fat concentration was lower with blends than with C, and with LE than with LR, but tended to be higher with LE2 than with LE1; protein and urea concentrations were lower with blends than with C. Milk urea also tended to be lower with LE blends than with LR.

As expected, the PDI intake varied among treatments in both experiments, being higher with E than with R diets. In the faba bean experiment, it tended to be higher with E2 than with E1, and in the lupin experiment, it was lower with lupin blends than with C.

**Table 4.** Enzymatic CP degradability (ED1) and content of Maillard compounds in raw and extruded faba bean and lupin blends

Item	Faba bean:linseed (90:10)			Lupin:linseed (90:10)		
	Raw	Extruded at 140°	Extruded at 160°C	Raw	Extruded at 140°	Extruded at 160°C
ED1 (%)	82.1	35.5	34.6	83.6	47.4	53.1
Maillard compound						
Acrylamide (g/kg of DM)	<35.10 <sup>-6</sup> <sup>1</sup>	69.10 <sup>-6</sup>	39.10 <sup>-6</sup>	<34.10 <sup>-6</sup> <sup>1</sup>	175.10 <sup>-6</sup>	507.10 <sup>-6</sup>
CML <sup>2</sup> (g/kg of DM)	0.008	0.017	0.023	0.009	0.023	0.029
Lysine (g/kg of DM)	16	15	14	17	13	8
HMF <sup>3</sup> (g/kg of DM)	<0.004 <sup>1</sup>	<0.003 <sup>1</sup>	<0.003 <sup>1</sup>	<0.003 <sup>1</sup>	<0.009 <sup>1</sup>	0.009

<sup>1</sup>Limit of detection.

<sup>2</sup>CML = N $\epsilon$ -carboxymethyl-lysine.

<sup>3</sup>HMF = hydroxymethylfurfural.

**Table 5.** Effect of protein source on feed intake, BW, BCS, and milk yield and composition<sup>1</sup>

Item	Faba bean experiment										Lupin experiment									
	Faba bean blend					P (contrast)					Lupin blend					P (contrast)				
	C	FR	FE1	FE2	SE	P Trt	C vs. blend	FR vs. FE	FE1 vs. FE2		C	LR	LE1	LE2	SE	P Trt	C vs. blend	LR vs. LE	LE1 vs. LE2	
DMI (kg/d)	21.6	21.1	21.9	21.7	1.54	0.588	0.934	0.215	0.703		21.3	19.6	19.9	19.1	0.87	0.175	0.048	0.963	0.392	
BW (kg)	728	728	741	739	26	0.523	0.422	0.238	0.857		714	715	719	721	26	0.780	0.483	0.520	0.796	
BCS (point)	2.2	2.1	2.3	2.2	0.14	0.455	1.000	0.184	0.420		2.3	2.1	2.2	2.2	0.11	0.137	0.038	0.326	1.000	
Milk yield (kg/d)	29.7	28.7	31.5	28.9	2.6	0.048	0.960	0.077	0.020		29.4	29.4	30.6	29.4	2.0	0.869	0.813	0.721	0.505	
4% FCM yield (kg/d)	26.1	26.1	26.0	24.9	2.6	0.588	0.629	0.473	0.308		26.2	25.9	24.5	24.4	1.5	0.622	0.399	0.344	0.932	
Milk lactose concentration (g/kg)	50.1	50.8	49.9	50.4	0.62	0.014	0.130	0.007	0.042		51.9	52.1	51.9	51.5	0.4	0.717	0.921	0.384	0.504	
Milk fat concentration (g/kg)	31.6	33.9	28.5	30.9	1.8	0.302	0.827	0.105	0.386		32.6	32.4	27.0	29.2	2.2	0.007	0.016	0.005	0.095	
Milk protein concentration (g/kg)	30.6	29.1	28.8	29.3	1.2	0.062	0.014	0.898	0.369		31.5	29.2	29.2	29.2	0.9	0.049	0.009	0.924	0.921	
Milk fat yield (g/d)	925	986	898	893	111	0.511	0.999	0.160	0.943		958	947	811	855	65	0.199	0.175	0.107	0.550	
Milk protein yield (g/d)	888	842	906	842	73	0.161	0.338	0.265	0.072		917	857	885	867	49	0.698	0.314	0.696	0.750	
Milk soluble CP (g/kg)	6.7	6.1	6.2	6.1	0.3	0.580	0.199	0.911	0.846		7.9	6.3	6.5	7.0	0.6	0.085	0.025	0.335	0.365	
Milk casein/milk CP (mg/L)	0.79	0.79	0.79	0.80	0.013	0.961	0.847	0.954	0.646		0.76	0.79	0.78	0.76	0.012	0.073	0.133	0.090	0.074	
Milk urea (mg/L)	177	143	135	123	35	0.338	0.107	0.575	0.686		178	140	120	102	17	0.011	0.003	0.066	0.281	
Net energy balance (UFL <sup>2</sup> /d)	1.9	2.1	2.5	2.6	0.88	0.477	0.260	0.322	0.749		1.7	1.3	1.9	1.2	0.41	0.379	0.517	0.549	0.145	
PDI <sup>3</sup> intake (g/d)	1,988	1,697	2,003	2,155	150	0.004	0.548	<0.001	0.073		1,966	1,558	1,818	1,902	86	0.013	0.025	0.007	0.362	
PDI use efficiency (g/g)	0.73	0.82	0.73	0.64	0.031	<0.001	0.953	<0.001	0.002		0.73	0.88	0.78	0.69	0.02	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

<sup>1</sup>C = control (soybean meal); F = faba bean blends; L = lupin blends; R = raw blend; E1 = blend extruded at 140°C; E2 = blend extruded at 160°C; Trt = treatment.

<sup>2</sup>UFL = net energy for lactation; 1 UFL = 1,760 kcal of NE<sub>L</sub>.

<sup>3</sup>PDI = protein truly digestible in the intestine (INRA, 2018).

**N Partitioning**

Within both experiments, no significant differences were observed among diets on N intake, on its partitioning between milk secretion, and urine or feces excretions (Table 6), or on N balance.

**Apparent Total-Tract Digestibility**

In the faba bean experiment, apparent N digestibility was lower with FE2 than with FE1, tended to be higher with blends than with C, and apparent NDF digestibility was lower with blends than with C (Table 7).

Trends were observed in both experiments on apparent OM digestibility, which were lower with blends than with C; it also tended to be lower with E2 than E1 in the faba bean experiment. The apparent NDF digestibility tended to vary among diets in the lupin experiment, where it was lower with blend diets than with C.

**Ruminal Parameters**

In the faba bean experiment, treatment had no effect on the kinetics of ruminal pH and NH<sub>3</sub> concentration (Figure 2A), or on the propionate, valerate, and caproate molar proportions, and protozoa counts (Table 8). There were more acetate molar proportions with FE2 than FE1, less iso-butyrate with FE than FR, and less iso-valerate with blends than C, with FE than FR, and with FE2 than FE1. The total VFA tended to be higher with FE than FR blends, and lower with FE2 than FE1, and butyrate proportion tended to be lower with FE2 than FE1.

In the lupin experiment, treatment had no effect on total VFA concentrations, or iso-butyrate and caproate molar proportions (Table 8). Propionate and more butyrate molar proportions were lower in ruminal fluid with blends than C, and with LE2 than LE1. Valerate and iso-valerate were lower with LE than LR, and with LE2 than LE1. Protozoa counts were higher with LE than LR, and tended to be lower with blends than C, and higher with LE2 than LE1. There was a trend of treatment effect on the kinetics of ruminal pH and NH<sub>3</sub> (Figure 2B), whose levels were higher with blends than C; NH<sub>3</sub> also tended to be lower with LE2 than with LE1. The acetate molar proportion tended to be increased with extrusion compared with the LR.

**Plasma Parameters**

No significant differences were observed among treatments for most plasma parameters, except for His concentration in both experiments and for Δ<sup>15</sup>N<sub>animal-diet</sub>

**Table 6.** Effect of protein source on N partitioning<sup>1</sup>

Item	Faba bean experiment										Lupin experiment								
	Faba bean blend					P (contrast)					Lupin blend			P (contrast)					
	C	FR	FE1	FE2	SE	P	Trt	C vs. blend	FR vs. FE	FE1 vs. FE2	C	LR	LE1	LE2	SE	P	Trt	C vs. blend	LR vs. LE
N intake (g/d)	500	502	526	487	36	0.295	0.747	0.794	0.079	501	457	474	458	19	0.213	0.063	0.637	0.637	0.457
N milk (g/d)	146	139	149	139	12	0.161	0.338	0.265	0.072	151	141	146	143	8	0.698	0.314	0.695	0.695	0.750
N urine (g/d)	149	150	160	151	13	0.865	0.679	0.672	0.584	139	132	130	121	8	0.109	0.055	0.239	0.239	0.207
N feces (g/d)	185	179	180	181	14	0.829	0.431	0.750	0.824	171	148	152	164	10	0.191	0.104	0.274	0.274	0.275
N balance (g/d)	20.2	34.6	35.1	15.2	10.4	0.146	0.297	0.337	0.059	39.6	35.5	46.0	29.2	8.5	0.543	0.777	0.835	0.835	0.186
N milk/intake	0.29	0.28	0.28	0.29	0.024	0.550	0.201	0.646	0.895	0.30	0.31	0.31	0.31	0.015	0.867	0.473	0.759	0.759	0.873
N urine/intake	0.30	0.30	0.30	0.31	0.017	0.700	0.404	0.594	0.572	0.28	0.29	0.27	0.26	0.017	0.630	0.902	0.250	0.250	0.669

<sup>1</sup>C = control (soybean meal); F = faba bean blends; L = lupin blends; R = raw blend; E1 = blend extruded at 140°C; E2 = blend extruded at 160°C; Trt = treatment.

Table 7. Effect of protein source on apparent total-tract digestibility<sup>1</sup>

Item	Faba bean experiment										Lupin experiment							
	Faba bean blend					Faba bean experiment					Lupin blend			Lupin experiment				
	C	FR	FE1	FE2	SE	P Trt	C vs. blend	FR vs. FE	FE1 vs. FE2	C	LR	LE1	LE2	SE	P Trt	C vs. blend	LR vs. LE	LE1 vs. LE2
OM (g/g)	0.73	0.71	0.72	0.71	0.008	0.054	0.035	0.164	0.098	0.74	0.72	0.72	0.73	0.009	0.067	0.020	0.459	0.220
N (g/g)	0.63	0.64	0.66	0.63	0.013	0.005	0.058	0.654	0.001	0.66	0.68	0.68	0.64	0.011	0.147	0.644	0.218	0.055
NDF (g/g)	0.60	0.55	0.54	0.53	0.001	0.024	0.005	0.320	0.497	0.60	0.57	0.57	0.59	0.019	0.086	0.047	0.330	0.116

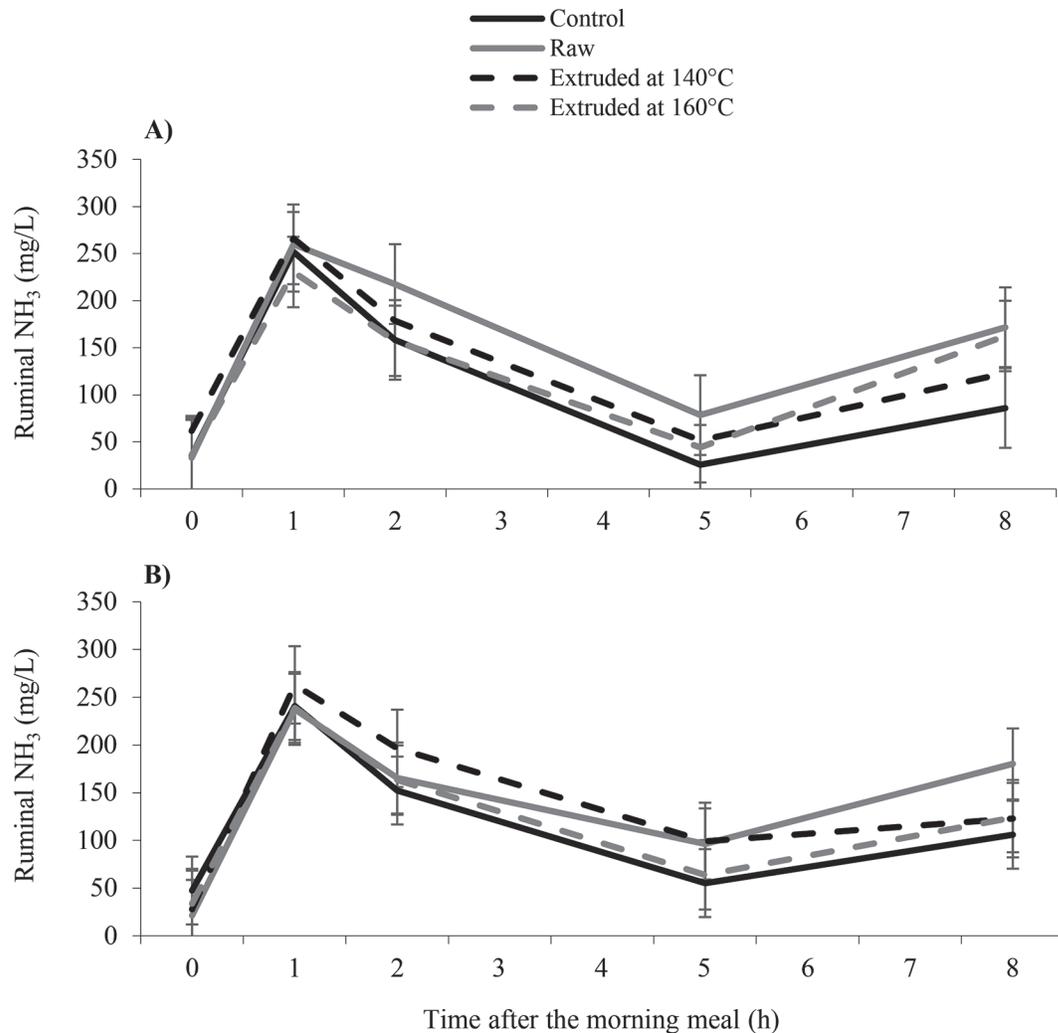
<sup>1</sup>C = control (soybean meal); F = faba bean blends; L = lupin blends; R = raw blend; E1 = blend extruded at 140°C; E2 = blend extruded at 160°C; Trt = treatment.

natural enrichment in the lupin experiment (Table 9). Plasma His concentration was higher with E diets than R diets in both experiments, and lower with blends than C in the lupin experiment. In the lupin experiment, extrusion decreased  $\Delta^{15}\text{N}_{\text{animal-diet}}$  values, which also tended to be lower with E2 than E1. A trend of treatment effect was noted for many AA, especially in the faba bean experiment: FE diets tended to induce higher plasma concentrations of total AA and EAA than FR diets. In the lupin experiment, taurine and methionine sulfoxide tended to be lower with blends than C, and for NEAA, which tended to be lower with LE2 than LE1. In the lupin experiment, plasma urea tended to be lower with blends than C.

The N use efficiency (N milk/N intake) was significantly related to  $\Delta^{15}\text{N}_{\text{animal-diet}}$ , with  $R^2 = 0.31$  and  $P = 0.001$  (Figure 3). The relationship between N milk/N intake and  $\Delta^{15}\text{N}_{\text{animal-diet}}$  increased considerably when the effect of experimental period was added to the model ( $R^2 = 0.64$ ; data not shown).

### DISCUSSION

Compared with other published studies on the effects of extruded proteaginous seeds on N use in dairy cows, the present experiments collected a wide range of complementary, simultaneous in vivo measurements (including animal feed intake and milk yield responses, digestibility and N partition, ruminal fermentation as well as several plasma parameters). Furthermore, the treatments were well-characterized and included the extrusion conditions, as well as their effects on in vitro N degradability and Maillard compound contents, parameters that have been generally poorly described in previous in vivo experiments. The discussion is focused on aspects related to effects of experimental concentrate (referred as protein source) on protein degradation and partition. Aspects related to lipid metabolism and the observed low milk fat concentration will not be developed here. Briefly, diets were formulated to avoid ruminal acidosis according to indicators provided by INRA (2018). The measured mean ruminal pH (on average 6.31 among the diets) and VFA profiles (acetate/propionate molar ratio averaging 3.0) were fully consistent with nonacidosis ruminal conditions, and therefore unlikely to be responsible for the low milk fat concentration. However, the manner in which the feed was distributed (forages mixed together and concentrates added above) would have favored a fast intake of concentrate by the cows, and ruminal or metabolic pathways (or both) involved in the observed low milk fat concentration (Table 5). Finally, lower milk fat concentration with lupin blends than with soybean meal (Table 5), and even lower with extruded lupin blends,



**Figure 2.** Effect of protein source on ruminal  $\text{NH}_3$  kinetics in faba bean (A) and lupin (B) experiments. Vertical bars refer to SE.

could be related to the lipids supplied by blends, and to the fact that extrusion increased their availability in the rumen. A higher availability of linseed lipids in extruded faba bean blends would also explain that the trend for a higher milk yield with extruded faba bean blends compared with raw blend was not observed for 4% FCM yield, extrusion leading to a numerically lower milk fat concentration.

### Extrusion Technology

The extrusion duration (25–30 s) in this experiment was similar to that found in the literature for lupin seeds (Bayourthe et al., 1998), but our extrusion temperatures were lower than those applied by other authors in previous works (for example, 195°C in studies conducted by Bayourthe et al., 1998 or Benchaar et al., 1991 and 1992). In the present work, the increase in

temperature was only produced using compression and shear mechanical forces (no external thermal energy source). This self-heating was chosen following a preliminary experiment, in which N was better protected from ruminal degradation with self-heating extrusion than with extrusion with added thermal energy for a same final temperature of 140°C (Chapoutot et al., 2016). In addition to temperature, a wide range of levers remained available to vary the extrusion conditions, such as intensity or Le/D ratio of the extruder (Table 3). There was a need to increase the Le/D ratio for lupin blend extruded at 160°C to produce more severe treatment conditions than those of extruded at 140°C because of the lipid content of this feed. With a higher Le/D ratio, the blend remained longer in the extruder and therefore under the constraining conditions of shearing and compression. This requirement was reinforced by the presence of linseed, a fat-rich

Table 8. Effect of protein source on ruminal parameters<sup>1</sup>

Item	Faba bean experiment										Lupin experiment									
	Faba bean blend					P (contrast)					Lupin blend					P (contrast)				
	C	FR	FE1	FE2	SE	P Trt	C vs. blend	FR vs. FE	FE1 vs. FE2		C	LR	LE1	LE2	SE	P Trt	C vs. blend	LR vs. LE	LE1 vs. LE2	
Mean pH	6.40	6.40	6.25	6.35	0.11	0.479	0.459	0.301	0.360		6.26	6.41	6.33	6.36	0.08	0.098	0.033	0.212	0.64	
NH <sub>3</sub> (mg/L)	119	145	133	130	14	0.578	0.276	0.429	0.870		120	140	140	125	7.8	0.062	0.049	0.335	0.099	
Total VFA (mM)	99	95	110	99	4.0	0.066	0.556	0.073	0.051		109	104	99	100	6.8	0.172	0.048	0.310	0.860	
Acetate (% of VFA)	62.0	62.9	61.3	63.8	0.58	0.030	0.374	0.633	0.005		60.0	59.7	60.6	61.5	0.55	0.079	0.312	0.039	0.206	
Propionate (% of VFA)	19.9	19.6	20.4	19.7	0.65	0.326	0.996	0.299	0.123		22.3	21.6	21.3	19.8	0.54	0.003	0.012	0.061	0.024	
Butyrate (% of VFA)	12.5	11.9	12.8	11.7	0.53	0.068	0.296	0.379	0.022		12.6	13.2	12.7	13.7	0.34	0.008	0.034	0.800	0.005	
Iso-butyrate (% of VFA)	0.76	0.83	0.66	0.60	0.056	0.018	0.302	0.003	0.403		0.70	0.69	0.68	0.65	0.04	0.789	0.501	0.588	0.589	
Valerate (% of VFA)	1.90	1.88	1.97	1.82	0.50	0.947	0.960	0.961	0.559		2.04	2.25	2.05	1.61	0.17	0.001	0.573	0.003	0.007	
Iso-valerate (% of VFA)	1.85	1.86	1.70	1.39	0.066	<0.001	0.006	<0.001	<0.001		1.86	1.86	1.80	1.54	0.18	0.005	0.116	0.032	0.012	
Caproate (% of VFA)	1.00	1.04	0.96	0.95	0.35	0.979	0.892	0.628	0.962		0.80	0.85	0.90	0.83	0.11	0.746	0.423	0.842	0.465	
Total protozoa [log (10 <sup>3</sup> /mL)]	2.47	2.19	2.23	2.27	0.20	0.123	0.035	0.388	0.444		2.23	1.86	2.05	2.22	0.17	0.011	0.085	0.014	0.058	

<sup>1</sup>C = control (soybean meal); F = faba bean blends; L = lupin blends; R = raw blend; E1 = blend extruded at 140°C; E2 = blend extruded at 160°C; Trt = treatment.

matrix, which favors flow through the extruder. For the same reason (higher fat content), and also as a result of heat capacity differences between lupin and faba bean, extrusion temperatures for lupin seeds were lower than those of faba beans, although the thermal energy level was higher for blends containing lupin (Table 3). Moreover, because of its lower fat content compared with the lupin blend, the faba bean blend was extruded at a higher intensity due to its greater resistance to flow in the extruder. The greater resistance of blends containing faba bean was due to their lower fat content as well as high starch content (40% of the DM). The starch structure was modified during extrusion, and this starch modification required energy. The extruders and blends used in this experiment allowed the highest possible temperatures with only self-heating to be reached.

**Protein Degradability, Digestibility, and Rumen Parameters**

According to the model of Aufrère et al. (1989) applied to raw or extruded proteaginous seeds, the measured ED1 values of blends allow an estimation of their N effective degradability with a 6%/h outflow from the rumen. This can then be used to predict the ED\_N values of the different blends when incorporated in their respective diets (INRA 2018). These estimated ED\_N values were 86, 64, and 63% for raw, extruded at 140°C and extruded at 160°C faba bean blends, respectively, and 86, 67, and 69% for raw, extruded at 140°C, and extruded at 160°C lupin blends, respectively. This confirms that, as expected and observed in vivo at the duodenal level by Benchaar et al. (1991 and 1992) on both faba bean and lupin seeds, extrusion reduces N degradation in the rumen, but does not support our initial hypothesis of a lower N ruminal degradability with high temperature extrusion than with low one. Indeed, the ED\_N values predicted from ED1 are fully consistent with our initial assumptions (Table 1) for both raw and extruded at 140°C faba bean and lupin blends, but appeared slightly higher for blends extruded at 160°C. However, although not significant in the faba bean experiment but a trend in the lupin experiment, the numerical variations in ruminal NH<sub>3</sub> [i.e., increase between control and feed blends (P = 0.049 with lupin), decrease between raw and extruded faba bean blends, and decrease between extrusion at 140 and 160°C (P = 0.099 with lupin)], are consistent with our initial hypothesis on N degradability (Table 8). The lack of significant decrease in ruminal NH<sub>3</sub> between raw and extruded blends should be partly explained by the fact that blends provided only 50% of dietary CP, and that ruminal NH<sub>3</sub> actually reflects the balance between

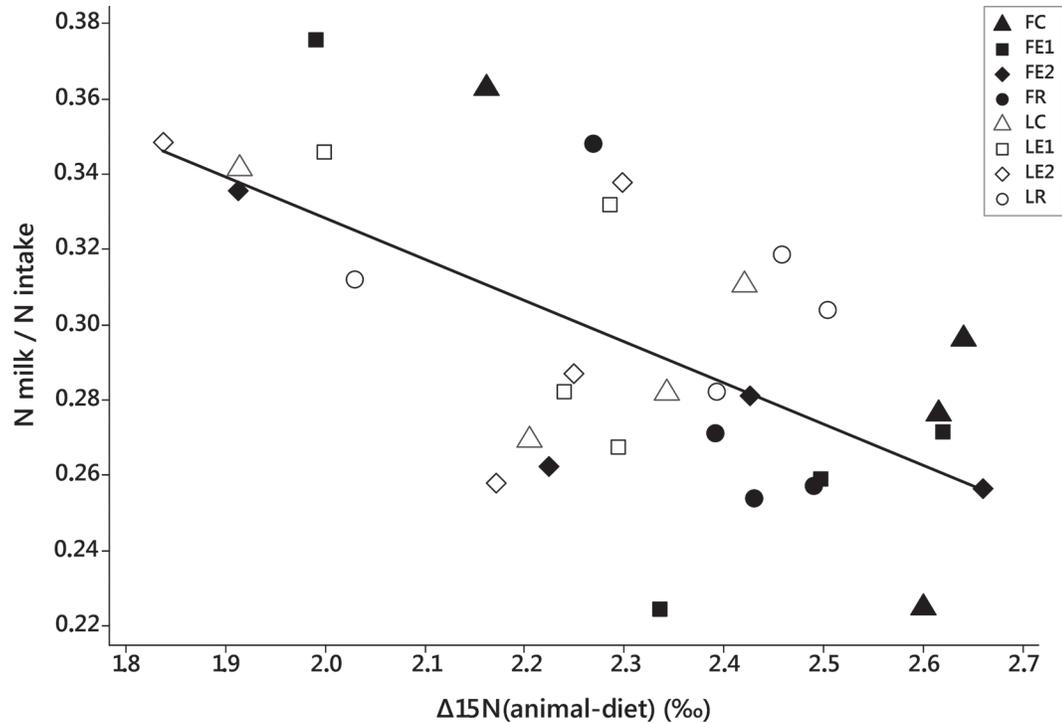
Table 9. Effect of protein source on plasma AA content and natural <sup>15</sup>N enrichment<sup>1</sup>

Item	Faba bean experiment										Lupin experiment									
	Faba bean blend					P (contrast)					Lupin blend					P (contrast)				
	C	FR	FE1	FE2	SE	P Trt	C vs. blend	FR vs. FE	FE1 vs. FE2		C	LR	LE1	LE2	SE	P Trt	C vs. blend	LR vs. LE	LE1 vs. LE2	
Total AA (μM)	2,662	2,401	2,985	2,858	206	0.065	0.571	0.014	0.499	2,642	2,608	2,921	2,411	209	0.244	0.983	0.771	0.060		
EAA (μM)	1,034	898	1,164	1,125	62	0.071	0.690	0.015	0.661	956	774	1,024	914	83	0.202	0.560	0.072	0.327		
Arg	86	75	105	102	8.8	0.118	0.414	0.029	0.833	89	77	111	79	11	0.145	0.993	0.175	0.057		
His	71	58	81	80	10.2	0.039	0.680	0.007	0.881	57	21	32	40	4.6	0.003	0.001	0.018	0.211		
Ile	131	121	145	139	9	0.350	0.715	0.106	0.665	125	101	149	141	14	0.093	0.695	0.020	0.641		
Leu	185	150	198	191	11	0.086	0.681	0.018	0.685	160	119	182	184	20	0.075	0.931	0.014	0.921		
Lys	85	78	108	102	11	0.277	0.408	0.094	0.700	80	68	86	65	8.7	0.294	0.463	0.477	0.111		
Met	23	17	24	22	2.6	0.153	0.351	0.045	0.680	27	25	25	19	2.3	0.162	0.188	0.292	0.099		
Phe	50	42	51	51	3.9	0.120	0.540	0.027	0.979	51	44	55	57	4.7	0.308	0.922	0.081	0.801		
Thr	106	88	117	107	6.4	0.086	0.808	0.022	0.310	92	88	95	65	7.4	0.095	0.300	0.428	0.029		
Trp	51	47	55	52	2.8	0.241	0.885	0.072	0.426	48	48	50	38	4.1	0.178	0.493	0.405	0.057		
Val	246	221	281	279	16	0.104	0.466	0.024	0.924	227	184	240	228	18	0.171	0.621	0.043	0.624		
NEAA <sup>2</sup> (μM)	1,628	1,503	1,821	1,733	185	0.204	0.619	0.057	0.536	1,686	1,834	1,896	1,497	134	0.082	0.620	0.273	0.023		
Taurine (μM)	44	40	47	39	4.4	0.299	0.507	0.359	0.127	55	47	42	37	6.8	0.069	0.027	0.166	0.337		
MetSO <sup>3</sup> (μM)	1.8	1.4	1.8	1.8	0.19	0.316	0.547	0.094	0.883	2.4	2.1	2.2	1.8	0.20	0.056	0.039	0.782	0.045		
Δ <sup>15</sup> N <sub>animal-diet</sub> (‰)	2.5	2.4	2.4	2.3	0.11	0.131	0.042	0.327	0.464	2.2	2.3	2.2	2.1	0.10	0.003	0.674	<0.001	0.074		
Plasma urea (g/L)	0.19	0.19	0.17	0.17	0.037	0.823	0.577	0.484	0.962	0.22	0.19	0.20	0.17	0.017	0.069	0.029	0.668	0.100		

<sup>1</sup>C = control (soybean meal); F = faba bean blends; L = lupin blends; R = raw blend; E1 = blend extruded at 140°C; E2 = blend extruded at 160°C; Trt = treatment.

<sup>2</sup>Ala + Asn + Asp + Gln + Glu + Gly + Pro + Ser + Tyr.

<sup>3</sup>MetSO = methionine sulfoxide.



**Figure 3.** Relationships between isotopic N fractionation between animal proteins and diet ( $\Delta^{15}\text{N}_{\text{animal-diet}}$ ) and the efficiency of N use.  $Y = 0.49 \pm 0.05 - 0.082 \pm 0.022 X$  ( $n = 32$ ,  $R^2 = 0.31$ , root mean squared error = 0.034,  $P = 0.001$ ). F = faba bean; L = lupin; C = control; R = raw; E1 = extruded at 140°C; E2 = extruded at 160°C.

N degradation and N utilization by the microorganisms in the rumen.

Variations in N degradability in the faba bean blends could be related to the higher Maillard compound contents measured in extruded blends than in raw blends (Table 4), as well as their lower total lysine contents, which could have become unavailable due to complexation between proteins and carbohydrates. These Maillard reactions were also related to the color of the extruded blends, which were darker than the raw blends, especially for the lupin blends extruded at high temperature (data not shown). These results are consistent with those previously obtained with wheat distillers dried grains by Cabon et al. (2009) from in situ measurements in cows, and by Cozannet et al. (2010a,b) from in vivo experiments in pigs and poultry. However, to our knowledge, Maillard compounds are only very rarely, if ever, measured in ruminant experiments, which made these results difficult to relate to others, in particular with the fact that ruminal  $\text{NH}_3$  was not significantly decreased by extrusion (Table 8). Although extrusion has been shown to improve true N digestibility in the intestine (Benchaar et al., 1991, 1992), our results suggest that conducting extrusion at high temperature (i.e., higher than 160°C) leads to an

overprotection of feed proteins and a reduced AA availability in the intestine. This assumption is supported by the numerical increase in CML content in feces (Figure 1), and in the ratio (lysine in feces)/(lysine in blend) with increasing extrusion temperature (ratio = 0.56, 0.57, and 0.66 for FR, FE1, and FE2; 0.56, 0.66, and 1.15 for LR, LE1, and LE2), suggesting that the protection provided by extrusion was less reversible in the abomasum, with extrusion at 160°C, particularly with lupin. In addition, the observed variations in apparent N digestibility in the faba bean experiment mainly concerned a decrease between E1 and E2 diets, and were more marked numerically with lupin blends (Table 7). This is also supported by the trend of plasma essential AA availability, which was improved between raw and extruded treatments in the faba bean experiment (Table 9). It should be noted that, as methionine was supplemented to avoid a deficit, plasma levels of methionine were not affected by treatments.

No difference was observed between diets in DMI (Table 5). The trends of decrease in apparent digestibility of OM and NDF when blends replaced soybean meal was more marked with faba bean diets for NDF (Table 7). This result was surprising because the potential NDF digestibility of feedstuffs was expected to be

higher with diets containing blends than with the control diet, according to INRA (2018). Moreover, because of the greater availability of lipids due to extrusion, we could have expected a lower NDF digestibility (Weld and Armentano, 2017) with extruded lupin blends, but it was only significant in the faba bean experiment.

The lower protozoa levels with the raw lupin blend may be due to its high fat content, which is known to have a defaunating effect (Guyader et al., 2014). The increase in protozoa levels with E1 and E2 in lupin experiment (Table 8) was quite surprising because extrusion is expected to increase lipid availability in the rumen, but this result was also observed by Kudlinskiene et al. (2016) when cows ate extruded lupin and soybean meal for 2 mo. Variations in rumen VFA molar proportions in both experiments were low (Table 8), which could be related to the low variation in the ratio of digestible NDF/digestible OM between diets, which is the main indicator of variations in VFA profiles (Nozière et al., 2011).

### N Partitioning

A higher milk yield and a lower urinary N excretion was expected with extrusion due to N protection in the rumen. We also expected a lower milk yield and a higher urinary N excretion when soybean meal was replaced by raw proteaginous blends. However, in spite of consistent numerical changes in ruminal  $\text{NH}_3$ , no significant change in N partitioning was observed with the experimental setup used (Table 6). Similarly, Puhakka et al. (2016) observed no change in N partitioning when rapeseed meal was replaced by raw faba bean. This could be partly related to methodological limitations of N balance measurements: N losses have been described (Spanghero and Kowalski, 1997), but are difficult to avoid. The N balance values obtained in the present study (on average 32.2 g of N/d, Table 6) were similar to the values reported by Spanghero and Kowalski (1997), on average 38.8 g of N/d in dairy cows. Assuming a protein accretion related to the positive net energy balance of 33 g of protein/UFL (INRA, 2018), that is, on average 10 g of N/d in the present experiment, and an accretion in scurf proteins of 1.5 g of N/d (INRA, 2018), the N balance default would be lower, on average 20.7 g of N/d, but still remains higher than the observed differences in urinary and milk N flows across treatments. This limited the statistical power of the experimental design.

To increase differences between treatments, we should have increased the level of incorporation of proteaginous blends in the diet. However, to comply with representative feeding practices encountered in dairy

farms, we voluntarily limited the faba bean blend incorporation to 25% DMI (representing 47.9% of total CP); the corresponding value to comply with iso-nitrogenous diets was 18.5% lupin blend (representing 42.7% of total CP).

As reported by Cantalapiedra-Hijar et al. (2018), the natural  $^{15}\text{N}$  enrichment of animal proteins over the diet ( $\Delta^{15}\text{N}_{\text{animal-diet}}$ ) was negatively related to efficiency of N use. This biomarker has been shown to signal the relative orientation of absorbed AA toward oxidation rather than protein synthesis (Poupin et al., 2014), and thus indicates how efficiently the absorbed AA from each dietary treatment are partitioned between protein synthesis (milk, endogenous fecal protein, and protein gain) and excretion (urinary N from amino acid catabolism). In our study, experimental period had a strong effect on the relationship between N milk/N intake and  $\Delta^{15}\text{N}_{\text{animal-diet}}$ . This may be ascribed to other protein sinks not accounted for in our N milk/N intake calculation as the endogenous fecal protein and protein gain, the latter likely increasing with lactation time. Likewise, the  $\Delta^{15}\text{N}_{\text{animal-diet}}$  biomarker could suggest that despite not observing a significant effect of extrusion on N milk/N intake, this process may improve the overall efficiency of AA use, even further than that resulting from soybean meal.

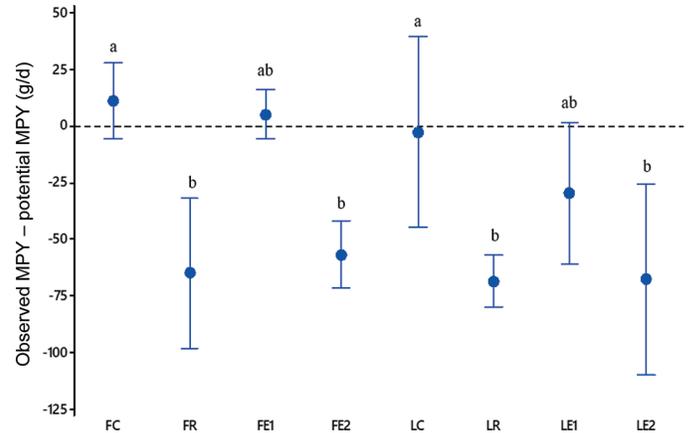
### Observed Productive Responses

Replacing soybean meal by raw blends had no effect on milk yield in this experiment (Table 5). For faba bean seeds, similar findings have been reported in the literature with unchanged milk yield when soybean or rapeseed meal was replaced by raw faba bean in iso-CP diets (Brunschwig and Lamy, 2002; Tufarelli et al., 2012). When soybean meal is replaced by lupin (mainly in iso-CP diets), the literature results on milk yield are inconsistent, reporting some increases (May et al., 1993; Froidmont and Bartiaux-Thill, 2004) and some decreases (Guillaume et al., 1987). In the present experiments, replacing soybean meal by blends decreased milk protein concentration in a significant manner for lupin and with a trend for faba bean (Table 5). These findings are similar to those of Guillaume et al. (1987) or Singh et al. (1995), but differ from those of May et al. (1993) or Froidmont and Bartiaux-Thill (2004) for lupin, and from those of Brunschwig and Lamy (2002) or Tufarelli et al. (2012) for faba bean, who observed no difference compared with soybean meal. Replacing raw blends by extruded blends had no effect on milk yield in the present experiments (Table 5), in contrast to the findings of Bayourthe et al. (1998; milk yield increase) or Brunschwig et al. (2003; milk yield decrease) with

extruded lupin; no data could be found for extruded faba bean. The discrepancy between studies could be partly explained by extrusion conditions. Indeed, in the present work, the high temperature extrusion conditions of faba bean blends induced a significant decrease in milk yield compared with low ones (Table 5), but to our knowledge, no other published data on effect of extruded faba bean on milk yield are still available in the literature. Extrusion of blends decreased milk fat concentration in the lupin experiment (Table 5), in agreement with the findings of Bayourthe et al. (1998) and Brunschwig et al. (2003) with lupin.

### Calculated Responses of Cows Around Their Potential and PDI Efficiency

Only a few feed unit systems account for the fact that the efficiency of use of MP for milk production is variable when predicting milk protein yield [MPY; e.g., OEB/DVE<sub>2010</sub> (Van Duinkerken et al., 2011), NorFor (Volden, 2011), and INRA (2018)]. Among these, the new INRA feeding system (INRA, 2018) is based on milk protein response around a well-defined pivot (potential MPY) corresponding to a PDI efficiency (=  $\Sigma$  protein expenses/available PDI) of 0.67 g/g. This concept can be used when interpreting our observed results, based on the PDI values defined in Table 1. There was a significant within-cow relationship between MPY and available PDI supplied by the diets ( $P = 0.02$ ), with an average slope equal to  $0.137 \pm 0.056$ , which is close to the marginal response that could be expected when cows are fed around their potential (0.19, Daniel et al., 2016; INRA, 2018). Potential MPY of cows can be individually calculated by regression between protein expenses and available PDI. This criteria averaged  $909 \pm 117$  g of MPY/d (mean  $\pm$  SD). Thus, for each cow  $\times$  treatment, the response (observed MPY – potential MPY) can be calculated (Figure 4). This approach indicates in both experiments that potential was reached with the control (response =  $4 \pm 60$  g/d) and E1 (response =  $-12 \pm 47$  g/d) diets, but in contrast was not reached with the raw (response =  $-67 \pm 47$  g/d) and E2 (response =  $-62 \pm 59$  g/d) diets. Moreover, the response was different between the control and the raw or E2 diets ( $P = 0.04$ ). Similar rankings of the animal's potential and response according to diet treatment are obtained using the PDI values estimated from ED1 measurements, but the relationships between PDI supply, PDI efficiency, and MPY are much less consistent than with the PDI values retained in Table 1. As a result of changes in PDI supply and observed MPY, PDI efficiency was highly variable among treatments; it decreases when PDI supply increases, as classically observed in dairy cows (Subnel et al., 1994; Volden, 2011;



**Figure 4.** Effect of protein source on milk protein yield (MPY) response (= observed MPY – potential MPY). Potential is defined as corresponding to a protein truly digestible in the intestine (PDI) efficiency of 0.67 for all functions of proteosynthesis (INRA, 2018). Means with different letters (a,b) differ ( $P < 0.05$ ). Vertical bars refer to SE. F = faba bean; L = lupin; C = control; R = raw; E1 = extruded at 140°C; E2 = extruded at 160°C.

Sauvant et al., 2018a). When blends were extruded, more PDI were available, but PDI efficiency decreased (Table 5). Conversely, when blends were raw, less PDI were available, but PDI efficiency was higher than with soybean meal. This underlines the trade-off between PDI supply and efficiency. Extrusion permitted a better valorization of CP by increasing PDI, but led to a lower efficiency of PDI, albeit with no significant change in milk protein production.

### Urinary N Excretion

Urinary N excretion is highly dependent on the rumen protein balance (79% of the difference between N absorbed as ammonia versus N recycled as urea is recovered in urinary N; Sauvant et al., 2018b), and on the amount of available PDI not used for proteosynthesis (inefficient PDI fraction). This is explicitly integrated in the renewed INRA (2018) feeding system for ruminants, so that N urine excretion can be predicted and compared with measured values. Predicted excretion values were close to measured values. As detailed in a preliminary communication (Nozière et al., 2018), the slope of the inter-treatment (0.876) and overall (0.860) relationships did not significantly differ from 1. The difference ( $20 \pm 31$  g/d,  $P = 0.001$ ) between calculated ( $161 \pm 31$  g/d) and observed ( $142 \pm 28$  g/d) N urinary excretion was mainly related ( $P = 0.001$ ) to the N balance default, and was irrespective of the diet ( $P = 0.925$ ). This supports the consistency of the N partitioning observed in the experiment, despite the methodological limitations related to N balance defaults.

## CONCLUSIONS

In these experiments, as expected, the observed *in vitro* enzymatic degradability values (lower with extruded than with raw blends), the numerical variation in ruminal NH<sub>3</sub> concentrations (lower with extruded than with raw blends), and the trend for plasma AA concentrations (higher with extruded than with raw faba bean blends) support the hypothesis that CP in raw blends is more degradable in the rumen than CP in soybean meal, and that CP in extruded blends is partly protected compared with raw blends. However, based on numerically higher Maillard compound and lysine content in feces with blends extruded at 160°C, extrusion at 160°C would have overprotected the bypass protein from intestinal digestibility. Despite the differences in ruminal protein degradability of the feed, and therefore in the calculated PDI value of the rations, no significant differences in intake, milk yield and N partitioning between feces, urine, and milk were observed when soybean meal was replaced by either raw or extruded proteaginous:linseed blends. This can be largely explained by the uncertainty related to N balance default, and to a lesser extent by the limited level of possible substitution in the diet (50% of dietary CP). However, the results suggest that, unlike R and E2 diets, both soybean meal and E1 diets met the requirements of cows to express their potential. This was related to a lower PDI supply with R (despite a higher efficiency), and to a lower PDI efficiency with E2 (despite a higher PDI supply). Taken together, these promising results demonstrate the feasibility of replacing soybean meal by proteaginous seed blends produced under E1 extrusion conditions.

## ACKNOWLEDGMENTS

These experiments were conducted as part of the Prolevel project, supported by Valorex (Combourtillé, France) and financed by bpifrance (Paris, France). The authors thank their colleagues at INRA: S. Rudel and the staff of “Les Cèdres” (D. Roux, L. Mouly, V. Tate, and G. De Falvard, UE Herbipôle, Theix, France) for help with managing the experiment, sampling, and animal care; V. Largeau, L. Genestoux, E. Tixier, I. Constant, C. Chantelauze (UMR Herbivores, Theix, France), O. Dhumez (UMR MoSAR, Paris, France), T. Le Mouël (UMR Pegase, Rennes, France), for help with sampling and for their valuable technical support; M. Doreau (UMR Herbivores, INRA, Theix, France) for his help in writing this article; and Jenny Grice (Bieuzy Les Eaux, France) for checking and amending the English text.

## REFERENCES

- Aufrère, J., D. Graviou, C. Demarquilly, R. Vérité, B. Michalet-Doreau, and P. Chapoutot. 1989. Aliments concentrés pour ruminants: Prédiction de la valeur azotée PDI à partir d'une méthode enzymatique standardisée. *INRA Prod. Anim.* 2:249–254.
- Aufrère, J., D. Graviou, C. Demarquilly, R. Vérité, B. Michalet-Doreau, and P. Chapoutot. 1991. Predicting *in situ* degradability of feed proteins in the rumen by two laboratory methods (solubility and enzymatic degradation). *Anim. Feed Sci. Technol.* 33:97–116.
- Bayourthe, C., R. Moncoulon, and F. Enjalbert. 1998. Effect of extruded lupin seeds as a protein source on lactational performance of dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 72:121–131.
- Bazin, S. 1984. Grille de notation de l'état d'engraissement des vaches Pie Noires. In Réseau national d'expérimentation et de démonstration en élevage bovin. S. Bazin, ed. Institut technique de l'élevage bovin, Paris, France.
- Benchaar, C., C. Bayourthe, R. Moncoulon, and M. Vernay. 1991. Digestion ruminale et absorption intestinale des protéines du lupin extrudé chez la vache laitière. *Reprod. Nutr. Dev.* 31:655–665.
- Benchaar, C., M. Vernay, C. Bayourthe, and R. Moncoulon. 1992. Effet de l'extrusion de la féverole (*Vicia faba*) sur les flux intestinaux d'azote et d'amidon chez la vache laitière en production. *Reprod. Nutr. Dev.* 32:265–275.
- Brunschwig, Ph., and J.-M. Lamy. 2002. Utilisation de féverole ou de tourteau de tournesol comme sources protéiques dans l'alimentation des vaches laitières. *Renc. Rech. Rum.* 9:316.
- Brunschwig, Ph., J.-M. Lamy, P. Weill, E. Lepage, and P. Nerrière. 2003. Le lupin broyé ou extrudé comme correcteur unique de rations pour vaches laitières. *Renc. Rech. Rum.* 10:383.
- Cabon, G., E. Meslier, Y. Primot, C. Gady, P. Chapoutot, and F. Skiba. 2009. Diversité des valeurs énergétique et azotée des drèches de blé issues des usines européennes de bioéthanol: Estimation à partir des mesures de dégradation en sachets incubés dans le rumen. *Renc. Rech. Rum.* 16:60.
- Cantalapiedra-Hijar, G., R. J. Dewhurst, L. Cheng, A. R. J. Cabrita, A. J. M. Fonseca, P. Nozière, D. Makowski, H. Fouillet, and I. Ortigues-Marty. 2018. Nitrogen isotopic fractionation as a biomarker for nitrogen use efficiency in ruminants: A meta-analysis. *Animal* 12:1827–1837.
- Chapoutot, P., O. Dhumez, G. Chesneau, A. Germain, S. Mendowski, and P. Nozière. 2018. Influence de l'extrusion sur la dégradabilité de l'azote de mélanges à base de féverole ou lupin et effet de la distribution granulométrique des produits. *Renc. Rech. Rum.* In press. [http://www.journees3r.fr/IMG/pdf/texte\\_34\\_affiche\\_alimentation\\_p-chapoutot.pdf](http://www.journees3r.fr/IMG/pdf/texte_34_affiche_alimentation_p-chapoutot.pdf).
- Chapoutot, P., O. Dhumez, A. Germain, and G. Chesneau. 2016. Influence of extrusion on nitrogen degradability of faba bean or lupine blends including urea. Page 564 in EAAP 67th Annual Meeting, Belfast. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.
- Cozannet, P., M. Lessire, J. P. Métayer, C. Gady, Y. Primot, P. A. Geraert, L. Le Tutour, F. Skiba, and J. Noblet. 2010a. Valeur nutritive des drèches de blé et de maïs pour les volailles. *INRA Prod. Anim.* 23:405–414.
- Cozannet, P., Y. Primot, C. Gady, J. P. Métayer, P. Callu, M. Lessire, F. Skiba, and J. Noblet. 2010b. Ileal digestibility of amino acids in wheat distillers dried grains with solubles for pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 158:177–186.
- Daniel, J. B., N. C. Friggens, P. Chapoutot, H. Van Laar, and D. Sauvant. 2016. Milk yield and milk composition responses to change in predicted net energy and metabolizable protein: A meta-analysis. *Animal* 10:1975–1985.
- DePeters, E. J., and J. P. Cant. 1992. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: A review. *J. Dairy Sci.* 75:2043–2070.
- Froidmont, E., and N. Bartiaux-Thill. 2004. Suitability of lupin and pea seeds as a substitute for soybean meal in high-producing dairy cow fed. *Anim. Res.* 53:475–487.

- Guillaume, B., D. E. Otterby, J. G. Linn, and M. D. Stern. 1987. Comparison of sweet white lupin seeds with soybean meal as a protein supplement for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 70:2339–2348.
- Guyader, J., M. Eugène, P. Nozière, D. P. Morgavi, M. Doreau, and C. Martin. 2014. Influence of rumen protozoa on methane emission in ruminants: A meta-analysis approach. *Animal* 8:1816–1825.
- INRA. 2018. INRA Feeding System for Ruminants. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.
- INRA-CIRAD-AFZ. 2017. Ingénierie & Etudes. Accessed Mar. 14, 2018. <https://www.zootechnie.fr/ingenierie-etudes/tables-inra-cirad-afz-2017.html>.
- Kudlinskiene, I., R. Gruzauskas, R. Stankevicius, R. Zelvyte, I. Monkeviciene, G. Stanyte, G. Dovidaitiene, J. Kantautaitė, and M. Ots. 2016. The effects of extruded lupins (*Lupinus* spp), faba bean (*Vicia faba*) and peas (*Pisum sativum*) on the ruminal fluid parameters in dairy cows. *Vet. Med. Zoot.* 73:88–94.
- May, M. G., D. E. Otterby, J. G. Linn, and W. P. Hansen. 1993. Lupins (*Lupinus albus*) as a protein supplement for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76:2682–2691.
- Morgavi, D. P., H. Boudra, J. P. Jouany, and D. Graviou. 2003. Prevention of patulin toxicity on rumen microbial fermentation by SH-containing reducing agents. *J. Agric. Food Chem.* 51:6906–6910.
- Niquet-Léridon, C., and F. Tessier. 2011. Quantification of N-carboxymethyl-lysine in selected chocolate-flavoured drink mixes using high-performance liquid chromatography–linear ion trap tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 126:655–663.
- Nozière, P., F. Glasser, and D. Sauvant. 2011. In vivo production and molar percentages of volatile fatty acids in the rumen: A quantitative review by an empirical approach. *Animal* 5:403–414.
- Nozière, P., S. Mendowski, P. Chapoutot, D. Sauvant, and G. Cantalapiedra-Hijar. 2018. A model of urinary nitrogen excretion: A way to assess diet protein value at individual level? Proceedings of the Xth International Symposium on Nutrition of Herbivores, in press.
- Peyronnet, C., J.-P. Lacampagne, P. Le Cadre, and F. Pressenda. 2014. Les sources de protéines dans l'alimentation du bétail en France: la place des oléoprotéagineux. OCL 21:D402.
- Poupin, N., F. Mariotti, J. F. Huneau, D. Hermier, and H. Fouillet. 2014. Natural isotopic signatures of variations in body nitrogen fluxes: A compartmental model analysis. *PLOS Comput. Biol.* 10:e1003865.
- Puhakka, L., S. Jaakkola, I. Simpura, T. Kokkonen, and A. Vanhatalo. 2016. Effects of replacing rapeseed meal with fava bean at 2 concentrate crude protein levels on feed intake, nutrient digestion, and milk production in cows fed grass silage-based diets. *J. Dairy Sci.* 99:7993–8006. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-10925>.
- Sauvant, D., G. Cantalapiedra-Hijar, S. Lemosquet, P. Nozière, V. Berthelot, and P. Faverdin. 2018a. Protein and amino acids expenditure, efficiency and requirements. Pages 119–137 in INRA, 2018. INRA Feeding System for Ruminants. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.
- Sauvant, D., P. Faverdin, J. L. Peyraud, and P. Nozière. 2018b. Faecal and urinary nitrogen excretion. Pages 203–207 in INRA, 2018. INRA Feeding System for Ruminants. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.
- Sauvant, D., and P. Nozière. 2016. Quantification of the main digestive processes in ruminants: The equations involved in the renewed energy and protein feed evaluation systems. *Animal* 10:755–770.
- Singh, C. K., P. H. Robinson, and M. A. McNiven. 1995. Evaluation of raw and roasted lupin seeds as protein supplements for lactating cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 52:63–76.
- Spanghero, M., and Z. M. Kowalski. 1997. Critical analysis of N balance experiments with lactating cows. *Livest. Prod. Sci.* 52:113–122.
- Subnel, A. P. J., R. G. M. Meijer, W. M. Van Sraalen, and S. Tamminga. 1994. Efficiency of milk protein production in the DVE protein evaluation system. *Livest. Prod. Sci.* 40:215–224.
- Terres Univia. 2017. <http://www.terresunivia.fr/>.
- Tufarelli, V., R. U. Khan, and V. Laudadio. 2012. Evaluating the suitability of field beans as a substitute for soybean meal in early-lactating dairy cow: Production and metabolic responses. *Anim. Sci. J.* 83:136–140. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2011.00934.x>.
- Van Duinkerken, G., M. C. Blok, A. Bannink, J. W. Cone, J. Dijkstra, A. M. Van Vuuren, and S. Tamminga. 2011. Update of the Dutch protein evaluation system for ruminants: The DVE/OEB2010 system. *J. Agric. Sci.* 149:351–367.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583–3597.
- Volden, H. 2011. NorFor - The Nordic feed evaluation system. EAAP Publications No. 130, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.
- Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39:971–974.
- Weld, K. A., and L. E. Armentano. 2017. The effects of adding fat to diets of lactating dairy cows on total-tract neutral detergent fiber digestibility: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 100:1766–1779.

## II. Effets de l'ajout de sucres réducteurs ou d'un cocktail enzymatique lors de la phase de maturation avant extrusion de la féverole sur l'utilisation des protéines et les performances des vaches laitières



J. Dairy Sci. 103:396–409  
<https://doi.org/10.3168/jds.2019-17286>  
© American Dairy Science Association®, 2020.

### Effects of pretreatment with reducing sugars or an enzymatic cocktail before extrusion of fava bean on nitrogen metabolism and performance of dairy cows

S. Mendowski,<sup>1,2</sup> P. Chapoutot,<sup>3</sup> G. Chesneau,<sup>2</sup> A. Ferlay,<sup>1</sup> F. Enjalbert,<sup>4</sup> G. Cantalapiedra-Hijar,<sup>1</sup> A. Germain,<sup>2</sup> and P. Nozière<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Université Clermont Auvergne, INRA, VetAgro Sup, UMR Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

<sup>2</sup>Valorex, La Messayais, F-35210 Combourtille, France

<sup>3</sup>UMR MoSAR, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, F-75005 Paris, France

<sup>4</sup>GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, ENVT, F-31320 Castanet Tolosan, France

*Article accepté dans Journal of Dairy Science le 27 septembre 2019*



## Effects of pretreatment with reducing sugars or an enzymatic cocktail before extrusion of fava bean on nitrogen metabolism and performance of dairy cows

S. Mendowski,<sup>1,2</sup> P. Chapoutot,<sup>3</sup> G. Chesneau,<sup>2</sup> A. Ferlay,<sup>1</sup>  F. Enjalbert,<sup>4</sup> G. Cantalapiedra-Hijar,<sup>1</sup>   
A. Germain,<sup>2</sup> and P. Nozière<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup>Université Clermont Auvergne, INRA, VetAgro Sup, UMR Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

<sup>2</sup>Valorex, La Messayais, F-35210 Combourillé, France

<sup>3</sup>UMR MoSAR, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, F-75005 Paris, France

<sup>4</sup>GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, ENVT, F-31320 Castanet Tolosan, France

### ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effects of pretreatment with reducing sugars or with an enzymatic cocktail before extrusion of fava bean on intake, milk yield and composition, N partitioning, and plasma and ruminal parameters. The main hypothesis was that these pretreatment conditions would allow better N protection in the rumen compared with classic pretreatment before extrusion, thanks to an increase of sugar proportion, either exogenous or endogenous with enzymatic actions. Sixteen Holstein cows were used in a 4 × 4 Latin square design experiment. Cows were fed a diet with a 56:44 forage to concentrate ratio and containing 16.2% of crude protein (CP; dry matter basis). Concentrate consisted of fava bean:linseed blends (90:10%, raw basis) distributed either raw, extruded after pretreatment without additive, extruded after pretreatment with reducing sugars, or extruded after pretreatment with an enzymatic cocktail. The experimental blends provided 53% of total CP in the diet. Intake, milk yield and composition, ruminal pH, volatile fatty acids and ammonia kinetics, apparent total-tract nutrient digestibilities and N partitioning, Maillard compounds in feed and feces, plasma AA, and <sup>15</sup>N natural enrichment were measured. Data were analyzed using analysis of variance according to the MIXED procedure of SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). Extrusion without additive during pretreatment led to higher contents of Maillard compounds in the blend, a lower enzymatic CP degradability, a numerically lower ammonia content in ruminal fluid, and a trend of higher plasma EAA concentration, all suggesting a decrease in degradability of proteins in the rumen,

and a subsequent increase in metabolizable protein supply. Compared with pretreatment without additive, adding reducing sugars or an enzymatic cocktail during pretreatment led to an increase in Maillard compound contents in the extruded blends, and to an increase (+50 mg/L) in rumen ammonia content. With reducing sugars, digestibility of N $\epsilon$ -carboxymethyl-lysine was numerically lower, and plasma EAA concentration tended to decrease, suggesting an overprotection of proteins in the intestine. With the enzymatic cocktail, plasma EAA concentration was similar than without additive during pretreatment, suggesting a similar metabolizable protein supply with both treatments. Finally, no change in N partitioning between milk, urine, and feces was observed whatever the diet.

**Key words:** dairy cow, extrusion, nitrogen, fava bean

### INTRODUCTION

Consumers are increasingly favoring the use of locally produced, non-genetically modified crops with good traceability in animal feeding (Duc et al., 2010; Titze et al., 2019). In Europe, proteaginous seeds could be a good alternative to imported soybean meal, which is nowadays the main protein source in dairy cow feeding. Indeed, proteaginous seeds can be grown in France and Europe, have the capacity to fix N from the atmosphere (Duc et al., 2010; Magrini et al., 2016), and have a good yield (for example, 3.05 t/ha for fava bean in 2016 in France, Terres Univia, 2017). Fava bean contains on average 30% protein (DM basis), which is quite high, and 44% starch, but its proteins are very degradable in the rumen (close to 80%, INRA-CIRAD-AFZ Tables, 2017), which impairs the nutritive value of this feed for ruminants. It is known that heat processes, for example extrusion, can reduce the rumen degradability of fava bean proteins (Cros et al., 1991; Benchaar et al., 1992) and so improve their nutritive value, but information

Received July 18, 2019.

Accepted September 27, 2019.

\*Corresponding author: [pierre.noziere@inra.fr](mailto:pierre.noziere@inra.fr)

on effects on milk yield and composition are still scarce (Mendowski et al., 2019). Moreover, too high temperatures in the heat process could lead to overprotection of proteins, thus reducing their intestinal digestibility and making them less available for the animals (Mendowski et al., 2019).

In most published papers focused on digestive utilization of extruded seeds by ruminants, extrusion conditions are poorly described, but generally, extrusion of raw seeds is applied without specific treatment during pretreatment. The present study is focused on innovative pretreatment conditions before the process of extrusion, aiming to improve the effect of extrusion on protection of proteins of fava bean seeds, and subsequent utilization by dairy cows.

The hypotheses are that (1) proteins extruded are protected against degradation in the rumen compared with proteins of raw fava bean, and (2) an addition of reducing sugars or an enzymatic cocktail during pretreatment before extrusion improves the protection of proteins. Indeed, reducing sugars may react and form complexes with proteins through Maillard reactions during the heat process (Alamir et al., 2013). In the same way, the enzymatic cocktail may hydrolyze sugars from starch and these sugars are likely to form complexes with proteins.

To validate these hypotheses, an in vivo experiment was conducted to test the effects of extrusion of fava bean without additive versus with reducing sugars versus with an enzymatic cocktail during pretreatment, on protein utilization by dairy cows. The experimental feedstuffs were precisely characterized, and feed intake, nutrient digestibilities, N partitioning, milk production and composition, and ruminal and plasma parameters were measured.

## MATERIALS AND METHODS

This study was conducted in INRA facilities (Herbipôle, Theix, France), and all procedures involving animals were approved by the Ethics Committee of the Auvergne-Rhône-Alpes region and the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation (APAF-IS#7652-2016111015426814 v6).

### Animals, Experimental Design, and Diets

Sixteen multiparous lactating Holstein cows (parity =  $2.9 \pm 0.9$  lactations, BW =  $690 \pm 29$  kg, DIM =  $96 \pm 27$  d, mean  $\pm$  SD), were allocated in 4 balanced groups (4 cows/group) based on DMI, parity, DIM, and milk yield and composition. The 4 groups received successively the 4 treatments according to a  $4 \times 4$  Latin

square design. Within each group, all 4 cows received simultaneously the same diet and were used to measure feed intake and milk production and composition ( $n = 16$ ); 2 of them were used to measure nutrient digestibilities and N partitioning (called “digestibility cows,”  $n = 8$ ). Moreover, 1 of these 2 cows was fitted with a rumen cannula (outer and inner diameter of 123 and 106 mm, respectively) and used for ruminal trait measurements ( $n = 4$ ).

There were 4 experimental periods of 28 d, including 22 d of adaptation to the diet and then 6 d of measurements. Throughout the trial, intake was measured daily and individually. During the adaptation period, all cows were housed in free stabling and fed ad libitum. During measurements, all cows were fed at 95% of the ad libitum intake (determined according to the intake measured between d 14 and 22); the 8 “digestibility cows” were housed in individual stalls, while the others stayed in free stabling.

The 4 experimental diets were iso-CP and iso-NE<sub>L</sub> (unité fourragère lait; **UFL**) according to INRA, 2018 (Table 1) and contained 56% forage and 44% concentrate (DM basis), with more than 350 g of NDF/kg of DM, close to 280 g of NDF/kg of DM of from forage, and less than 200 g of degradable starch/kg of DM, to prevent ruminal acidosis (INRA, 2018). All diets were based on the same mixture of corn silage, grass silage (direct cut, first growth from permanent grassland, Auvergne), hay (field cut, first growth from permanent grassland, Auvergne), dehydrated beet pulp, and beet molasses. The experimental concentrate consisted of 90 to 10% blends (raw basis) of fava bean (*Vicia faba*) and linseed. Linseed was added to benefit from the effects of its high lipid content on the extrusion conditions of fava bean (Mendowski et al., 2019). The blends were distributed either raw (**RW**), or extruded at an expected output temperature of 140°C with different conditions of pretreatment. Pretreatment conditions were either without additive (**EXT**), with addition of reducing sugars (**SUG**) or with addition of an enzymatic cocktail (**ENZ**), as described below. The low level of protein truly digestible in the intestine (**PDI**) of the RW diet and the increase in PDI level with extruded blends were expected to allow a measurable marginal response of milk protein yield. The chemical compositions of the blends are presented in Table 2. Raw and extruded blends were supplied by Valorex (Valorex S.A., Combourtillé, France). All diets also contained 0.65% urea to ensure a sufficient level of available N for rumen microorganisms. Moreover, animals received 85 g/d of MetaSmart Dry (Kemin France, Nantes, France) to ensure a nonlimiting supply of digestible methionine, 200 g/d of mineral and vitamin supplement containing

**Table 1.** Ingredients, chemical composition, and nutritive values of the diets

Item	RW <sup>1</sup>	EXT <sup>1</sup>	SUG <sup>1</sup>	ENZ <sup>1</sup>
% of DM <sup>2</sup>				
Corn silage	28.05	28.05	28.05	28.05
Grass silage	13.0	13.0	13.0	13.0
Hay	15.0	15.0	15.0	15.0
Dehydrated beet pulp	9.0	9.0	9.0	9.0
Beet molasses	4.3	4.3	4.3	4.3
Fava bean:linseed (90:10%)	30.0	30.0	30.0	30.0
Urea	0.65	0.65	0.65	0.65
Measured chemical composition				
CP, g/kg of DM	169	174	171	173
NDF, g/kg of DM	356	354	352	353
Starch, g/kg of DM	132	174	184	174
CML, <sup>3</sup> g/kg of DM	0.025	0.032	0.036	0.036
Lysine, g/kg of DM	8.04	7.73	6.11	7.58
Nutritive value according to INRA 2018 <sup>4</sup>				
PDI, <sup>5</sup> g/kg of DM	78	98	97	96
RPB, <sup>6</sup> g/kg of DM	39	25	24	26
PDIA, <sup>7</sup> g/kg of DM	25	47	46	45
NE <sub>L</sub> , UFL <sup>8</sup> /kg of DM	0.95	0.94	0.94	0.94
Rumen degradable starch, g/kg of DM	131	117	123	116
LysDi, <sup>9</sup> % of PDI	7.3	7.2	7.2	7.2
MetDi, <sup>10</sup> % of PDI	3.29	2.73	2.75	2.77

<sup>1</sup>RW = raw fava bean:linseed blend (90:10 raw basis); EXT = extruded at 140°C; SUG = extruded at 140°C after pretreatment with reducing sugars; ENZ = extruded at 140°C after pretreatment with an enzymatic cocktail.

<sup>2</sup>All animals received in addition 85 g/d of MetaSmart Dry (Kemin France, Nantes, France), 200 g/d of mineral and vitamin supplement (containing 4.5% P, 20% Ca, 4.5% Mg, and 5% Na), and 200 g/d of sodium bicarbonate.

<sup>3</sup>CML = N $\epsilon$ -carboxymethyl-lysine.

<sup>4</sup>Calculated for a level intake of 3.3% (DMI = 22.9 kg and BW = 690 kg).

<sup>5</sup>PDI = protein truly digestible in the intestine.

<sup>6</sup>RPB = rumen protein balance.

<sup>7</sup>PDIA = dietary protein truly digestible in the intestine.

<sup>8</sup>1 UFL = 1,760 kcal of NE<sub>L</sub>.

<sup>9</sup>LysDi = lysine truly digestible in the intestine.

<sup>10</sup>MetDi = methionine truly digestible in the intestine (values take into account MetaSmart supplementation).

4.5% P, 20% Ca, 4.5% Mg, and 5% Na (Galaphos Midi Duo, CCPA, Janzé, France), and 200 g/d of sodium bicarbonate (BicarZ, Solvay, Brussels, Belgium).

Forages and concentrate were distributed twice a day, 60% at 0900 h, and 40% at 1600 h. Water and a salt block were available ad libitum throughout the experiment. Animals were milked daily at 0730 and 1530 h, in the milking parlor, except for the 8 “digestibility

cows” that were milked in individual stalls between d 23 and 28.

### Extrusion Conditions

Before extrusion treatments, blends underwent a pretreatment, which consisted of grinding followed by thermal preconditioning (Table 3) at 60°C (EXT and

**Table 2.** Chemical composition of the fava bean:linseed blends

Item	Fava bean:linseed (90:10) blend			
	Raw	Extruded at 140° without additive	Extruded at 140° with sugars	Extruded at 140°C with enzymes
OM, g/kg of DM	959	955	956	956
CP, g/kg of DM	299	314	304	311
NDF, g/kg of DM	151	145	136	139
ADF, g/kg of DM	96	103	90	99
Starch, g/kg of DM	327	300	331	297

SUG) or 68°C (ENZ). For ENZ, the pretreatment time was twice as long as for EXT and SUG. During the pretreatment, reducing sugars (SUG) or an enzymatic cocktail (ENZ) was added to the blends at a level of 2.5 and 0.07% raw basis, respectively. To keep the activity of the enzymes, 8% of water was added for ENZ. The reducing sugars were mainly composed of glucose, and the enzymatic cocktail was composed of one-third of gluco-amylase and two-thirds of endo-amylase. The activities of enzymes was 300 amyloglucosidase unit/mL for gluco-amylases and 480 kg novo unit/g for endo-amylases. Extrusion of blends took place in single screw extruders. The increase in temperature within the extruders occurred by self-heating as a result of the applied compression and shear forces, without any external thermal energy supply. Based on an analysis of the literature, in vitro and in situ experiments on the blends (Chapoutot et al., 2016, 2018, and unpublished results by P. Chapoutot and O. Dhumez, UMR MoSAR, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Paris, France), and in vivo results (Mendowski et al., 2019), the target temperature of 140°C was previously shown to decrease the ruminal effective degradability of N without impairing its intestinal digestibility.

In spite of the difference in water addition, the enforced mechanical constraints (compression and shearing) were the same for the 3 blends to reach the desired temperatures: the length to diameter ratio of the extruders was the same for the extrusion of all blends. Indeed, the resistance to advancement by the extruder screw and to the flow through the die was similar for the 3 blends, as described by the applied intensity (around 70% of the extruder potential).

Temperatures obtained are shown for the last 3 sections in the extruders: N-2, N-1, and N represent antepenultimate, penultimate, and last sections, respectively. Compared with the target temperatures (140°C), the temperatures reached with the extruder settings were a little bit lower than expected in the N-2 and N sections, but close to what was expected in the N-1 section (134, 142, and 138°C for the blends used in EXT, SUG, and ENZ, respectively). Temperature was slightly higher for blends with sugars than for other extruded blends, in the last 3 sections of the extruder.

### Measurements and Sampling

**Feed Intake and BW.** Intake was measured daily and individually by weighing the offered and the refusals. Indeed, each cow was equipped with an electronic collar that guaranteed access to its own trough only. The DM content of each feedstuff was determined 3 times per week between d 1 and 21, and daily between d 22 and 28, on a sample placed for 24 h in a ventilated oven at 103°C. At the same time, a 200-g sample of each feedstuff was collected, pooled over the period at room temperature (except for silages, which were stored at -20°C), and then oven-dried at 60°C for 72 h before being ground through a 1-mm sieve for subsequent chemical analyses. Every day between d 22 and 28, the same sampling as for the offered feedstuff was done for the refusals: 10% of the refusals were collected for the chemical analyses if daily fresh refusals were greater than 1 kg, and the DM content was determined.

Cows were weighed daily at the exit of the milking parlor. The 8 “digestibility cows” were thus weighed

**Table 3.** Incoming and outgoing parameters of extruders

Item	Fava bean:linseed (90:10) blend		
	Extruded at 140° without additive	Extruded at 140° with sugars	Extruded at 140°C with enzymes
Pretreatment condition			
Duration, h	13	12	20
Temperature, °C	60	60	68
Water added, %	0	0	8
Incoming parameter			
Le/D ratio <sup>1</sup>	8.1	8.1	8.1
Intensity, % of extruder potential	70	73	70
Outgoing parameter			
Blend temperature, <sup>2</sup> °C			
N-2	121	125	120
N-1	134	142	138
N	125	132	127
Mechanical power, kW	78.8	82.0	78.6
Mechanical energy index, Wh/kg	56.4	55.1	44.7

<sup>1</sup>Le/D = length (Le) to diameter (D) ratio of the extruder.

<sup>2</sup>N-2 = antepenultimate section; N-1 = penultimate section; N = last section of the extruder.

only between d 1 and 20. Body condition score was determined at the beginning of the trial and at the end of each period, according to a 0–5 scale (Bazin, 1984).

#### **Total-Tract Digestibility and N Partitioning.**

From d 22 to 28, feces and urine of the 8 “digestibility cows” were collected separately and totally, using in a bin placed behind each cow for the feces and a pouch glued around the vulva of each cow and connected by a flexible pipe to a 30-L flask for urine collection. This flask contained at least 500 mL of 30% sulfuric acid to acidify the urine to a pH less than 4. Sampling took place every day at 0830 h and consisted of taking 0.5% of the total homogenized amount of feces and urine. Samples were immediately pooled per period and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  (Mendowski et al., 2019). The DM of feces was determined by oven drying at  $103^{\circ}\text{C}$  for 24 h. Thawed feces samples were either oven-dried for 72 h at  $60^{\circ}\text{C}$ , then ground through a 1-mm sieve for NDF, ADF, starch, and ash determination, or lyophilized and ground through a 1-mm sieve for N assays and determination of Maillard compounds.

**Rumen Fermentation Traits.** On d 24 and 27, 500 mL of ruminal fluid was collected just before, and 1, 2.5, 5, and 8 h after the morning meal through the ruminal cannula of the 4 cannulated cows by suction using a hose. Each ruminal liquid sample was filtered using a 250- $\mu\text{m}$  nylon pore cloth and then the pH was measured with a pH meter (WTW PH 538, Inlab Expert 51343100 electrode, Mettler-Toledo, Greifensee, Switzerland). Then, samples were preserved as described in Mendowski et al. (2019), stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ , and used to determine ammonia and VFA concentrations.

**Milk Yield and Composition.** At every milking, milk production was recorded. For the 4 experimental periods, on d 24, 26, and 27, milk samples from both morning and evening milkings were stored in bronopol at  $+4^{\circ}\text{C}$  before analysis of fat, protein, lactose, and urea contents. On d 27, a 60-mL sample of morning milking (frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ ) was used to determine the respective proportions of casein versus noncasein N.

**Blood Samples.** Blood samples were taken from the caudal vein before the morning meal on d 27 of each experimental period in vacutainers with  $\text{K}_3\text{EDTA}$  anticoagulant. For the 8 “digestibility cows,” an additional sample was taken with vacutainer with heparin lithium anticoagulant (ref. 455036 for  $\text{K}_3\text{EDTA}$  and 455084 for heparin lithium, Greiner, Kremsmünster, Austria). All collected blood samples were immediately placed in ice before centrifugation at  $3,500 \times g$  for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , then plasma was aliquoted and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  ( $\text{K}_3\text{EDTA}$  anticoagulant) for plasma urea determination, or at  $-80^{\circ}\text{C}$  (heparin lithium anticoagulant) for plasma AA profile, taurine, methionine sulfoxide, and  $^{15}\text{N}$  natural abundance analysis.

#### **Chemical Analyses**

For each ingredient of offered diets, refusal and fecal samples, N (Dumas method, norm ISO 16634–1, 2008, using a Rapid N Cube, Elementar Analysensystem GmbH, Hanau, Germany), NDF, ADF (Van Soest et al., 1991), starch (enzymatic method ISO-15914; ISO, 2004), and ash (overnight at  $550^{\circ}\text{C}$ ) contents were determined. The enzymatic CP degradability (**ED1**) of the 4 blends was measured according to Aufrère et al. (1989, 1991). Furosine (early Maillard compound), acrylamide,  $\text{N}\epsilon$ -carboxymethyl-lysine (**CML**) (terminal Maillard compounds) and total lysine contents were measured in blends, and CML and total lysine contents were measured in feces according to Niquet-Léridon and Tessier (2011). Nitrogen in thawed urine was measured by the Dumas method (using the same device and the same method as for solid samples) by pipetting 300  $\mu\text{L}$  on silica (to absorb the liquid) into a N-free tin capsule. For ruminal VFA analysis, samples of the 2 d of measurement were pooled per cow and per sampling time for each period, and were assayed by GC using crotonic acid as an internal standard (Morgavi et al., 2003). Ammonia was determined by spectrophotometry (Weatherburn, 1967) using a Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany) Urea/Ammonia (Ref. 10542946035) kit (wavelength of 340 nm). Milk fat, protein, lactose, and urea contents were measured by the laboratory LIAL (Aurillac, France) with an infrared method. Moreover, morning milk of d 27, total N, as well as soluble N following the precipitation of casein, were determined by the Kjeldahl method (norm ISO 8968–1, LIAL), and milk casein N was calculated as milk total N minus soluble N. Plasma urea was measured by photometry using an Arena 20XT device (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) with a urea kit (ref. 981820 Thermo Fisher Diagnostics SAS, Dardilly, France). Freeze-dried plasma proteins and finely ground feed samples were weighed in tin capsules and analyzed for N stable isotope composition ( $\delta^{15}\text{N}$ ;  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  ratio deviation from the international standard [atmospheric  $\text{N}_2$ ]) by using an isotope-ratio mass spectrometer (Isoprime, VG Instruments, Manchester, UK) coupled to an elemental analyzer (EA Isoprime, VG Instruments). Glutamic acid was used as internal standard and included in triplicate every 5 samples to correct for possible variations in the raw values determined by the mass spectrometer. Typical replicate measurement errors for these reference materials were  $\pm 0.1\%$ ; results are expressed using the delta notation. Plasma AA and methionine sulfoxide were assayed by tandem mass spectrometry by Biocrates Life Sciences AG (Innsbruck, Austria) using the Absolute IDQ p180 kit (Biocrates Life Sciences AG).

## Calculations and Statistical Analyses

The net energy (UFL) and MP (PDI) values of the diets (Table 1) were calculated according to INRA (2018) using the Systool Web application ([www.systool.fr](http://www.systool.fr); Chapoutot et al., 2015) with a feeding level of 3.2 kg of DM/100 kg of BW and 44% of concentrate in the diet, and according to the measured chemical composition of each feedstuff. For calculation of feedstuff PDI values, the effective degradability of N (**ED\_N**) of blends was derived from their measured ED1 (ED\_N = 85, 64, 64, and 66% for blends used in RW, EXT, SUG, and ENZ, respectively), and the true intestinal digestibility (**dr**) of their rumen undegraded protein was derived from INRA tabulated values [i.e., 89% for the raw blend, and 97% for the 3 extruded blends (INRA, 2018)]. For the other feedstuffs, both ED\_N and dr were derived from their chemical composition, according to INRA (2018). Assuming 95% of protein N in total N, N in milk was calculated as [(milk yield × milk protein content)/6.38]/0.95 described by DePeters and Cant (1992) and Spanghero and Kowalski (1997). Nitrogen balance was calculated as the difference between N intake and N recovered in urine, feces, and milk. The efficiency of metabolizable proteins (PDI efficiency) was calculated as the ratio between protein synthesis and available PDI, according to INRA (2018): protein synthesis accounts for milk + endogenous fecal + scurf + body retention, and available PDI accounts for PDI intake – endogenous urinary proteins (Sauvant et al., 2018). The isotopic discrimination between animal proteins and the diet ( $\Delta^{15}\text{N}_{\text{animal-diet}}$  in ‰) was calculated for each animal as the  $\delta^{15}\text{N}$  in plasma proteins minus  $\delta^{15}\text{N}$  of its diet; the latter was calculated as the average  $\delta^{15}\text{N}$  of each ingredient in the diet weighted by the percentage of N coming from this ingredient.

Data were analyzed according to ANOVA with the MIXED SAS procedure (version 9.4, 2004; SAS Institute Inc., Cary, NC). For each variable, the statistical unit was the mean per diet per cow. Periods ( $P_i$ , with  $i = 1$  to 4) and treatments ( $\text{Trt}_j$ , with  $j = 1$  to 4, RW, EXT, SUG, ENZ) were included in the model as fixed effects, and cows as random effect ( $C_k$ , with  $k = 1$  to 16), with the following model (where  $\mu$  is the overall mean and  $\varepsilon_{ijk}$  is the error):

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + \text{Trt}_j + C_k + \varepsilon_{ijk}$$

The REPEATED statement (with autoregression as covariance structure) was used for kinetics in ruminal fluid to take into account repeated measures on the same cow and at different times ( $T_l$ , with  $l = 0, 1, 2.5, 5, \text{ and } 8$  h) with ( $\text{Trt} \times T$ ) as a fixed effect added to the model:

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + \text{Trt}_j + C_k + T_l + (\text{Trt} \times T)_{jl} + \varepsilon_{ijk}$$

The differences were considered significant below the threshold  $P$ -value of 0.05 and a trend was considered at  $0.05 < P < 0.10$ . When a significant  $P$ -value was obtained, means were pairwise compared thanks to  $t$ -tests using the PDIF option of SAS.

In addition, analyses of orthogonal contrasts were performed to determine the effects of extrusion (RW vs. [EXT, SUG, ENZ]), and the effects of additives during pretreatment (EXT vs. [SUG, ENZ]). Effects of contrasts are systematically presented in the tables, but were taken into account only when  $P$  for the Trt effect was  $< 0.10$ .

## RESULTS

### Enzymatic CP Degradability of Blends and Maillard Compound Contents of Feedstuffs

Extrusion reduced ED1 of blends, from 81.8 to 41.5%, on average (Table 4). The ED1 of blends used in EXT and SUG was very similar (38.7 and 39.8%, respectively), but was slightly higher for the blend used in ENZ (46.0%). Acrylamide content was under the limit of detection in all blends except in the blend used in SUG. Extrusion increased the content of CML in blends, especially in the blends used in SUG and ENZ. Total lysine was lower in the blend used in SUG than in the other blends, either raw or extruded. Furosine was higher in extruded blends, in particular in the blend used in SUG, and to a lesser extent in the blend used in ENZ.

Total diet (including fava bean blend) contained 0.025, 0.032, 0.036, and 0.036 g of CML/kg of DM and 8.04, 7.73, 6.11, and 7.58 g of lysine/kg of DM for RW, EXT, SUG, and ENZ, respectively (Table 1).

### Feed Intake, BW, BCS, Milk Yield and Composition

No significant effect of treatments was observed on DMI, BW, and BCS on milk yield and FCM, on milk protein concentration and yield, on N in milk/N intake ratio, milk soluble CP, or on milk casein/milk CP ratio (Table 5). Live BW only slightly increased between the beginning and the end of the experiment (data not shown), averaging +87 g/d (SEM = 38,  $P = 0.038$  for the  $t$ -test).

Compared with RW diet, extrusion led to higher milk lactose ( $P = 0.027$ ) and lower milk fat ( $P = 0.002$ ) concentrations. Among extruded treatments, milk fat yield was higher ( $P = 0.049$ ) and milk urea was lower ( $P < 0.001$ ) with additives during pretreatment (SUG

**Table 4.** Enzymatic CP degradability and Maillard compound contents in raw and extruded fava bean blends

Item	Fava bean:linseed (90:10) blend			
	Raw	Extruded at 140° without additive	Extruded at 140° with sugars	Extruded at 140°C with enzymes
ED1, <sup>1</sup> %	81.8	38.7	39.8	46.0
Maillard compound				
Furosine, g/kg of DM	0.055	0.128	1.917	0.563
CML, <sup>2</sup> g/kg of DM	0.011	0.035	0.049	0.048
Lysine, g/kg of DM	21.0	20.0	14.6	19.5
Acrylamide, g/kg of DM	<32 × 10 <sup>-63</sup>	<32 × 10 <sup>-63</sup>	50.5 × 10 <sup>-6</sup>	<32 × 10 <sup>-63</sup>

<sup>1</sup>ED1 = enzymatic CP degradability (Aufrère et al., 1989, 1991).

<sup>2</sup>CML = Nε-carboxymethyl-lysine.

<sup>3</sup>Limit of detection.

and ENZ), and milk fat concentration was higher with ENZ ( $P = 0.002$ ).

The net energy balance tended to be higher with EXT than with the other treatments ( $P = 0.092$ ). The PDI use efficiency was lower with extruded treatments ( $P < 0.001$ ), in particular with EXT ( $P = 0.015$ ).

### N Partitioning

Treatment had no significant effect on N partitioning (Table 6). However, N balance was higher with

extruded diets (averaging 83.5 g/d) than with the RW diet (48.8 g/d,  $P = 0.003$ ).

### Apparent Total-Tract Digestibility and Maillard Compounds in Feces

No significant effect of treatments was observed on the apparent digestibility of OM, N, NDF ADF, and starch (Table 7).

The apparent digestibility of CML was higher with diets containing extruded blends (71% on average) than

**Table 5.** Effect of protein source on feed intake, BW, BCS, and milk yield and composition ( $n_{\text{cows}} = 16$ )

Item	Diet <sup>1</sup>				SE	P-value		P-value (Contrast)	
	RW	EXT	SUG	ENZ		Treatment	Extrusion	Additives	
DMI, kg/d	22.9	23.3	22.6	22.8	0.51	0.612	0.806	0.210	
BW, kg	690	695	693	693	7.66	0.312	0.106	0.334	
BCS, <sup>2</sup> point	2.4	2.3	2.3	2.3	0.07	0.442	0.110	0.893	
Milk yield, kg/d	31.2	31.5	31.9	32.1	0.84	0.485	0.232	0.348	
4% FCM yield, kg/d	31.1	30.6	31.2	32.0	0.92	0.210	0.779	0.092	
Milk lactose concentration, g/kg	48.7 <sup>b</sup>	49.0 <sup>ab</sup>	48.8 <sup>ab</sup>	49.3 <sup>a</sup>	0.35	0.042	0.027	0.914	
Milk fat concentration, g/kg	40.7 <sup>a</sup>	38.3 <sup>b</sup>	38.5 <sup>b</sup>	39.9 <sup>a</sup>	0.99	0.002	0.002	0.136	
Milk protein concentration, g/kg	31.0	30.8	30.6	30.8	0.39	0.393	0.198	0.472	
Milk fat yield, g/d	1,266 <sup>a</sup>	1,205 <sup>b</sup>	1,228 <sup>ab</sup>	1,275 <sup>a</sup>	44	0.042	0.188	0.049	
Milk protein yield, g/d	968	970	976	986	30	0.789	0.553	0.538	
Milk soluble CP, g/kg	7.1	7.2	7.0	6.9	0.13	0.282	0.438	0.085	
Milk casein/milk CP	0.782	0.779	0.784	0.787	0.004	0.445	0.825	0.145	
Milk urea, mg/L	260 <sup>b</sup>	287 <sup>a</sup>	258 <sup>b</sup>	265 <sup>b</sup>	9	0.004	0.134	<0.001	
N in milk/N intake, g/g	0.251	0.243	0.257	0.253	0.006	0.115	0.914	0.020	
Net energy balance, UFL <sup>3</sup> /d	1.68 <sup>AB</sup>	1.91 <sup>A</sup>	1.08 <sup>AB</sup>	1.01 <sup>B</sup>	0.37	0.092	0.314	0.020	
PDI <sup>4</sup> use efficiency, g/g	0.85 <sup>a</sup>	0.66 <sup>c</sup>	0.68 <sup>b</sup>	0.68 <sup>b</sup>	0.009	<0.001	<0.001	0.015	

<sup>a-c</sup>Different lowercase superscripts indicate a significant difference between treatments ( $P < 0.050$ ).

<sup>A,B</sup>Different uppercase superscripts indicate a trend between treatments ( $P < 0.100$ ).

<sup>1</sup>RW = raw fava bean:linseed blend (90:10 raw basis); EXT = extruded at 140°C; SUG = extruded at 140°C after pretreatment with reducing sugars; ENZ = extruded at 140°C after pretreatment with an enzymatic cocktail.

<sup>2</sup>0–5 scale (Bazin, 1984).

<sup>3</sup>1 UFL = 1,760 kcal of NE<sub>L</sub> (INRA, 2018).

<sup>4</sup>PDI = protein truly digestible in the intestine (INRA, 2018).

**Table 6.** Effect of protein source on N partitioning ( $n_{\text{cows}} = 8$ )

Item	Diet <sup>1</sup>				SE	P-value		
	RW	EXT	SUG	ENZ		Treatment	Extrusion	Additives
DMI, kg/d	22.9	23.7	23.5	23.1	0.5	0.543	0.303	0.430
N intake, g/d	633.5	673.3	654.0	653.0	12.88	0.178	0.072	0.194
N in milk, g/d	154.6	155.9	160.3	158.9	6.15	0.716	0.412	0.448
N urine, g/d	195.7	190.0	183.8	192.6	10.17	0.796	0.463	0.879
N feces, g/d	237.3	233.9	235.0	219.5	8.01	0.216	0.295	0.404
N balance, g/d	48.8 <sup>b</sup>	93.7 <sup>a</sup>	74.9 <sup>a</sup>	82.0 <sup>a</sup>	10.27	0.013	0.003	0.171
N in milk/N intake	0.244	0.231	0.245	0.245	0.008	0.169	0.579	0.033
N urine/N intake	0.305	0.282	0.281	0.295	0.014	0.430	0.169	0.694

<sup>a,b</sup>Different superscripts indicate a significant difference between treatments ( $P < 0.050$ ).

<sup>1</sup>RW = raw fava bean:linseed blend (90:10 raw basis); EXT = extruded at 140°C; SUG = extruded at 140°C after pretreatment with reducing sugars; ENZ = extruded at 140°C after pretreatment with an enzymatic cocktail.

with RW (64%,  $P < 0.001$ ). The apparent digestibility of lysine was lower with SUG and ENZ (52.5% on average) than with EXT (59%,  $P = 0.002$ ). Consequently, extrusion led to increased CML concentrations in feces ( $P = 0.011$ ), but did not affect fecal lysine content.

### Ruminal Parameters

No significant effect of treatments was observed on mean ruminal pH, total VFA concentration, and butyrate and valerate molar proportions (Table 8).

Extrusion increased acetate ( $P = 0.003$ ), decreased branched-chain VFA ( $P < 0.001$ ), and iso-butyrate ( $P < 0.001$ ) and iso-valerate ( $P = 0.001$ ) molar proportions in the rumen, and tended to decrease the molar proportion of propionate ( $P = 0.087$ ) compared with RW. Ammonia concentration in the rumen was higher with SUG and ENZ ( $P = 0.006$ ) than with EXT, mainly due to the short-term (1 h) increase of ammonia after

the morning meal (Figure 1). Caproate was higher ( $P = 0.012$ ) with SUG than with other diets.

### Plasma Parameters

Treatments had no significant effect on plasma total AA, His, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, NEAA, taurine, or methionine sulfoxide concentrations (Table 9).

Extrusion increased plasma concentrations of Arg ( $P = 0.042$ ), Leu ( $P = 0.014$ ), Val ( $P = 0.001$ ), and total branched-chain AA (i.e., Leu + Ile + Val,  $P = 0.007$ ), and tended to increase plasma Ile ( $P = 0.059$ ) and urea ( $P = 0.071$ ) contents, and to decrease  $\Delta^{15}\text{N}_{\text{animal-diet}}$  ( $P = 0.074$ ). Among extruded treatments, plasma urea concentration was lower ( $P < 0.001$ ) and  $\Delta^{15}\text{N}_{\text{animal-diet}}$  was higher ( $P < 0.001$ ) with SUG and ENZ. In addition, Arg, Ile, and Leu contents were higher, and EAA content tended to be higher with EXT and ENZ than with RW and SUG.

**Table 7.** Effect of protein source on apparent total-tract digestibilities ( $n_{\text{cows}} = 8$ )

Item	Diet <sup>1</sup>				SE	P-value		
	RW	EXT	SUG	ENZ		Treatment	Extrusion	Additives
Apparent total-tract digestibility								
OM, g/g	0.70	0.70	0.70	0.70	0.006	0.937	0.858	0.728
N, g/g	0.63	0.65	0.64	0.66	0.012	0.116	0.044	0.924
NDF, g/g	0.57	0.54	0.54	0.55	0.012	0.184	0.042	0.779
ADF, g/g	0.55	0.54	0.52	0.54	0.016	0.503	0.223	0.619
Starch, g/g	0.96	0.97	0.97	0.96	0.002	0.158	0.730	0.201
CML, <sup>2</sup> g/g	0.64 <sup>c</sup>	0.70 <sup>b</sup>	0.71 <sup>ab</sup>	0.73 <sup>a</sup>	0.010	<0.001	<0.001	0.132
Total lysine, g/g	0.57 <sup>a</sup>	0.59 <sup>a</sup>	0.50 <sup>b</sup>	0.55 <sup>a</sup>	0.016	0.002	0.176	0.002
Maillard compound content in feces								
CML, g/kg of DM	0.028 <sup>b</sup>	0.030 <sup>b</sup>	0.033 <sup>a</sup>	0.030 <sup>ab</sup>	0.001	0.010	0.011	0.109
Total lysine, g/kg of DM	10.62	9.69	9.61	10.44	0.541	0.180	0.127	0.479

<sup>a-c</sup>Different superscript letters indicate a significant difference between treatments ( $P < 0.050$ ).

<sup>1</sup>RW = raw fava bean:linseed blend (90:10 raw basis); EXT = extruded at 140°C; SUG = extruded at 140°C after pretreatment with reducing sugars; ENZ = extruded at 140°C after pretreatment with an enzymatic cocktail.

<sup>2</sup>CML = N $\epsilon$ -carboxymethyl-lysine.

**Table 8.** Effect of protein source on ruminal parameters ( $n_{\text{cows}} = 4$ )

Item	Diet <sup>1</sup>				SE	P-value		P-value (Contrast)	
	RW	EXT	SUG	ENZ		Treatment	Extrusion	Additives	
Mean pH	6.44	6.39	6.36	6.37	0.07	0.776	0.346	0.708	
NH <sub>3</sub> , mg/L	192 <sup>ab</sup>	162 <sup>b</sup>	206 <sup>a</sup>	219 <sup>a</sup>	21.80	0.042	0.815	0.006	
Total VFA, mM	122	123	130	125	3.14	0.309	0.335	0.322	
Acetate, % of VFA	62.17 <sup>b</sup>	64.26 <sup>a</sup>	63.85 <sup>a</sup>	63.82 <sup>a</sup>	1.08	0.023	0.003	0.488	
Propionate, % of VFA	20.70 <sup>A</sup>	19.90 <sup>AB</sup>	19.36 <sup>B</sup>	20.54 <sup>A</sup>	0.59	0.065	0.087	0.991	
Butyrate, % of VFA	12.53	11.80	12.21	11.92	0.50	0.270	0.104	0.422	
Iso-butyrate, % of VFA	0.82 <sup>a</sup>	0.65 <sup>b</sup>	0.63 <sup>b</sup>	0.62 <sup>b</sup>	0.28	<0.001	<0.001	0.591	
Valerate, % of VFA	1.64	1.53	1.69	1.41	0.27	0.159	0.387	0.875	
Iso-valerate, % of VFA	1.52 <sup>a</sup>	1.28 <sup>b</sup>	1.38 <sup>ab</sup>	1.16 <sup>b</sup>	0.09	0.004	0.001	0.940	
Caproate, % of VFA	0.61 <sup>b</sup>	0.59 <sup>b</sup>	0.88 <sup>a</sup>	0.52 <sup>b</sup>	0.10	0.012	0.284	0.243	
BC-VFA, <sup>2</sup> % of VFA	2.35 <sup>a</sup>	1.92 <sup>b</sup>	2.01 <sup>b</sup>	1.79 <sup>b</sup>	0.10	<0.001	<0.001	0.913	

<sup>a,b</sup>Different lowercase superscripts indicate a significant difference between treatments ( $P < 0.050$ ).

<sup>A,B</sup>Different uppercase superscripts indicate a trend between treatments ( $P < 0.100$ ).

<sup>1</sup>RW = raw fava bean:linseed blend (90:10 raw basis); EXT = extruded at 140°C; SUG = extruded at 140°C after pretreatment with reducing sugars; ENZ = extruded at 140°C after pretreatment with an enzymatic cocktail.

<sup>2</sup>Branched-chain VFA, defined as the sum of iso-butyrate and iso-valerate.

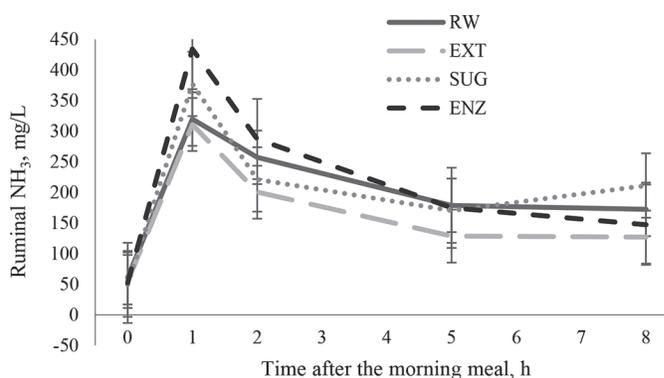
## DISCUSSION

Given the objectives of the present study, only results related to protein utilization will be discussed. It should, however, be noted that treatments had an effect on milk fat concentration (lower with EXT and SUG than with RW and ENZ). This was not observed by Mendowski et al. (2019), but in this previous study, milk fat concentrations were quite low with all treatments, including the control with soybean meal. To our knowledge, no other reference is available about milk response when dairy cows are fed extruded fava bean substituted for raw fava bean.

### N Partition and Productive Responses

Despite measured difference in ED1, no difference was observed on N partition between raw and extruded blends, which is in disagreement with our initial hypothesis. In a previous study, Mendowski et al. (2019) similarly observed no significant difference in milk protein yield with extruded fava bean:linseed blends compared with raw ones. In both studies, the expected increase in PDI supply was counterbalanced by a decrease in PDI efficiency, in particular with the EXT diet. The decrease in PDI efficiency when PDI supply increases is classically observed (Subnel et al., 1994; Volden, 2011). The levels of PDI supply and their subsequent efficiency applied in the present study (respectively, 78 g/kg of DM and 0.85 g/g with RW, vs. 97 g/kg of DM and 0.67 g/g on average with EXT, SUG, and ENZ) would have led to a measurable response in milk protein yield (Sauvant et al., 2018). The lower net energy balance with SUG and ENZ may have attenuated the expected responses on milk protein yield

(Brun-Lafleur et al., 2010; Daniel et al., 2016). Also, the measured N balance (Table 6) was quite high and variable. This may impair detection of differences in N partition. Methodological limitations of N partition measurement in dairy cows have been previously described (Spanghero and Kowalski, 1997; Cutullic et al., 2013; Edouard et al., 2018). These authors underline that the N balance default (i.e., N balance minus N retention associated with growth, gestation, and positive energy balance) increases with N intake. In the present study, conducted on adult early-gestating cows, live BW changes of cows only slightly varied (less than +90 g/d); assuming a retention of 33 g of protein/UFL balance (INRA, 2018), the N balance default averages (mean  $\pm$  SD) 65  $\pm$  39 g/d (i.e., 9.7  $\pm$  5.7% of N intake). This is consistent with the average value of 8.4% of



**Figure 1.** Effect of pretreatment before extrusion on postprandial variations in ruminal NH<sub>3</sub> concentration. Vertical bars refer to SE. RW = raw fava bean:linseed blend (90:10 raw basis); EXT = extruded at 140°C; SUG = extruded at 140°C after pretreatment with reducing sugars; ENZ = extruded at 140°C after pretreatment with an enzymatic cocktail.

N intake reported by Spanghero and Kowalski (1997) with lower N intakes. The causes of N balance default may concern quantification in feed, milk, feces, urine, and even in sweat. In the present work, it varies according to cow ( $P = 0.042$ ), period ( $P < 0.001$ ), and diet ( $P = 0.013$ ), being higher with extruded treatments than with the raw one.

Although the overall treatment effect was not significant, a numerically higher N in milk/N intake ratio was observed for SUG and ENZ compared with EXT (0.245 vs. 0.231). Although this supports numerically an advantage of pretreatment with additive before extrusion for N use efficiency, the differences remain low and are not supported by other indicators such as ruminal ammonia or plasma AA.

### Extrusion Conditions

Published studies on the effects of extrusion of proteaginous seeds on milk production report highly variable results. This could partly be explained by the large diversity of extrusion processes used. Description of the characteristics of extrusion processes is scarce in the literature. The most common information given is the process duration, the target temperature, or more rarely the mechanical energy index.

In the present study, the duration of the process applied was similar to what is commonly used for extrusion (Kaysi and Melcion, 1992), and in particular for proteaginous seeds intended for ruminant diets (about 25–30 s, Benchaar et al., 1992; Petit et al., 1997; Froidmont et al., 2006). However, temperatures obtained in the present study as well as in our previous work (Mendowski et al., 2019) were lower than those reported by some others (up to 195°C, Benchaar et al., 1991; Bayourthe et al., 1998) because only self-heating was used in our work. The temperature of 140°C is identical to that reported by Petit et al. (1997), who extruded pea without an external source of heat, and by Dovidaitienė et al. (2016).

For the same target temperature of 140°C, and for an identical mechanical configuration, the extruders worked at 70% of their potential in the present study, versus 92% in the previous one. Outgoing parameters of extruders were also lower in the present study compared with the previous one: mechanical power averaged 80 versus 103 kW; mechanical energy index was 56 (EXT), 55 (SUG), and 45 (ENZ, lower value due to addition of water) versus 60 Wh/kg. This was consistent with the temperatures measured inside the extruders (on average 15°C lower in the present study than in the previous one). The mechanical energy index was lower for SUG

**Table 9.** Effect of protein source on plasma AA content and natural  $^{15}\text{N}$  enrichment ( $n_{\text{cows}} = 8$ )

Item	Diet <sup>1</sup>				SE	P-value		P-value (Contrast)	
	RW	EXT	SUG	ENZ		Treatment	Extrusion	Additives	
Total AA, $\mu\text{M}$	2,481	2,582	2,298	2,692	156.48	0.339	0.808	0.647	
EAA, $\mu\text{M}$	747 <sup>AB</sup>	868 <sup>A</sup>	713 <sup>B</sup>	872 <sup>A</sup>	51.38	0.068	0.229	0.223	
Arg	93 <sup>b</sup>	118 <sup>a</sup>	93 <sup>b</sup>	119 <sup>a</sup>	7.95	0.014	0.042	0.153	
His	56	64	58	63	4.51	0.400	0.201	0.456	
Ile	135 <sup>b</sup>	163 <sup>a</sup>	134 <sup>b</sup>	166 <sup>a</sup>	8.81	0.018	0.059	0.212	
Leu	148 <sup>b</sup>	188 <sup>a</sup>	155 <sup>b</sup>	188 <sup>a</sup>	11.08	0.009	0.014	0.154	
Lys	103	115	88	111	9.86	0.218	0.882	0.206	
Met	25	25	20	26	2.23	0.194	0.691	0.437	
Phe	47	50	42	52	3.92	0.146	0.701	0.446	
Thr	93	92	76	54	7.30	0.298	0.531	0.478	
Trp	50	53	47	54	2.59	0.168	0.587	0.353	
Val	252 <sup>c</sup>	329 <sup>a</sup>	284 <sup>bc</sup>	323 <sup>ab</sup>	15.61	0.003	0.001	0.150	
BCAA, <sup>2</sup> $\mu\text{M}$	534 <sup>b</sup>	680 <sup>a</sup>	573 <sup>b</sup>	676 <sup>a</sup>	34.54	0.006	0.007	0.158	
NEAA, <sup>3</sup> $\mu\text{M}$	1,733	1,715	1,585	1,820	109.71	0.506	0.834	0.929	
Taurine, $\mu\text{M}$	41	37	38	45	2.78	0.145	0.666	0.125	
MetSO <sub>3</sub> , <sup>4</sup> $\mu\text{M}$	1.2	1.4	1.2	1.4	0.13	0.569	0.675	0.483	
$\Delta^{15}\text{N}_{\text{animal-diet}}$ , ‰	3.8 <sup>a</sup>	3.5 <sup>b</sup>	3.8 <sup>a</sup>	3.7 <sup>a</sup>	0.09	<0.001	0.074	<0.001	
Urea, mg/L	203 <sup>b</sup>	254 <sup>a</sup>	204 <sup>b</sup>	213 <sup>b</sup>	0.01	0.002	0.071	<0.001	

<sup>A,B</sup>Different uppercase superscripts indicate a trend between treatments ( $P < 0.100$ ).

<sup>a-c</sup>Different lowercase superscripts indicate a significant difference between treatments ( $P < 0.050$ ).

<sup>1</sup>RW = raw fava bean:linseed blend (90:10 raw basis); EXT = extruded at 140°C; SUG = extruded at 140°C after pretreatment with reducing sugars; ENZ = extruded at 140°C after pretreatment with an enzymatic cocktail.

<sup>2</sup>Branched-chain AA, defined as the sum of Ile, Leu, and Val.

<sup>3</sup>Ala + Asn + Asp + Gln + Glu + Gly + Pro + Ser + Tyr.

<sup>4</sup>MetSO<sub>3</sub> = methionine sulfoxide.

than for EXT because, unlike mechanical power, it is inversely proportional to the flow of the matrix inside the extruder, and the flow was the highest for the SUG treatment.

As enzymes need a sufficient level of humidity to remain active, water was added during the extrusion process applied to the blend used in ENZ. Consequently, extrusion of this blend is not as strong as for the blends used in EXT and SUG. Indeed, water increased the fluidity of the fava bean-linseed matrix, and so increased the flow of this matrix through the extruder. This is illustrated by a higher ED1 for ENZ than for SUG and EXT (46 vs. 39% on average).

As shown by higher temperatures and a higher mechanical power, the treatment of extrusion was stronger for the SUG treatments than for the others, which is consistent with the trend for a lower total EAA content in plasma with SUG than with EXT and ENZ, suggesting an overprotection of proteins in the intestine.

### Protein Degradation

When EXT is compared with RW, several results were consistent with our initial first hypothesis that proteins of extruded blend would be protected against degradation in the rumen compared with raw blend. This was confirmed by the lower ED1 (decrease from 82 to 39% of the blend used for EXT). Furthermore, it was supported by the numerically lower ruminal  $\text{NH}_3$  content (numerical decrease from 192 to 162 mg/L), the significant decrease in branched-chain VFA (isobutyrate and iso-valerate,  $P < 0.001$ ) proportion in the rumen, the significant increase in branched-chain AA (Ile, Leu, and Val,  $P = 0.006$ ) plasma concentration, and the trend of higher plasma EAA concentration ( $P = 0.068$ , Table 9) with EXT than with RW. These results support the evidence of a lower degradation of proteins in the rumen (Nozière et al., 2010) and a subsequent higher availability of AA for the animals.

When SUG and ENZ are compared with EXT, several results were not consistent with our initial second hypothesis, which was that the use of additives during pretreatment would improve the protection of proteins in the rumen compared with pretreatment without additive. Indeed, ED1 was slightly higher (on average +7 g/100 g) for the blend used in ENZ than for both blends used in SUG and EXT. No difference was observed between EXT, SUG, and ENZ diets for ruminal branched VFA. Finally, more  $\text{NH}_3$  was observed in ruminal fluid with SUG and ENZ diets (+50 mg/L on average for both pretreatment with additives) than with EXT. This last result was unexpected, even if  $\text{NH}_3$  level in the rumen is not only strictly influenced by its produc-

tion from dietary protein hydrolysis and deamination, but also depends on its use by microorganisms and on  $\text{NH}_3$  versus urea exchanges across the rumen wall and recycling through saliva.

The apparent digestibility of lysine was lower with SUG (49.5%) than with the other diets (57.0% on average). This may be due to a lower ruminal degradation or to a lower intestinal absorption. Considering the increase in ruminal  $\text{NH}_3$  contents, and the low lysine concentration in dietary CP (on average 4%, Table 1) compared with the lysine contents in rumen microbe CP and duodenal endogenous CP (8.0 and 7.7%, respectively, as retained in the PDI system by INRA, 2018), this may rather be related to a lower absorption in the intestine. This was also supported by the trend of lower total EAA content in plasma with SUG than with EXT and ENZ.

### Maillard Compounds

Despite small differences in ED1 and similar results in rumen parameters (except caproate molar proportion), SUG and ENZ diets differed regarding the indicators of intestinal digestion (plasma EAA), which suggests a lower absorption of AA with SUG. This could partly be related to their respective and different contents in Maillard compounds. Furosine, which is not naturally present in seeds, is an early product of the Maillard reaction and appears during the first step of the Maillard reaction from protein or free AA. The CML is formed from lysine (one of the most sensitive AA to the Maillard reaction) and is a very stable terminal compound, which can be either free or bound to proteins. Acrylamide is also a terminal compound formed from free asparagine and glucose, and is not a protein-bound molecule.

The metabolism of Maillard compounds in ruminants is still poorly known; Mendowski et al. (2019) quantified Maillard compounds in ruminant digestibility studies, thus providing new information.

Extruded blends contained more CML than the raw blend and among the extruded blends, the highest CML content was observed in the blend used in SUG. This suggests that Maillard reactions increased with extrusion, in particular when sugars were added during pretreatment. Moreover, the blend used in SUG contained more acrylamide than the 3 other blends ( $50.5 \times 10^{-6}$  vs. less than  $32 \times 10^{-6}$  g/kg of DM, respectively), confirming that more Maillard reactions happened with this treatment. Moreover, the blend used in SUG, and to a lesser extent in ENZ, contained a very high level of furosine compared with the blend used in RW, the blend used in EXT being intermediary. Contrary to

CML and acrylamide, which are both terminal products of Maillard reactions, furosine is one of the early compounds. This suggests that the addition of reducing sugars, and to a lesser extent the addition of amylases during pretreatment, favors the start of Maillard reactions.

The CML contents in the extruded blends of the present study were higher than those observed in Mendowski et al. (2019) with extrusion at the same target temperature (140°C), and even with extrusion at 160°C. Given that this was unexpected and maybe related to inter-experiment variability, simultaneous measurements on blends from both studies (i.e., excluding a potential inter-experiment variability) were performed (data not shown). This indicates that CML contents in blends extruded at 140°C without additive during pretreatment were similar in both studies, and that addition of reducing sugars or amylases during pretreatment at 140°C led to CML levels similar to those with extrusion at 160°C without additive.

Apparent total-tract digestibility of CML was higher with ENZ (73%), and to a lesser extent with EXT and SUG (averaging 71%) compared with RW (64%). The CML is known to be absorbable in the intestine (Tessier et al., 2012). Knowing the measured CML contents in blends and in the rest of the diet (i.e., in forages, beet pulp, and beet molasses), and the measured apparent digestibility of CML of the whole diet, the proportion of dietary CML provided by the blends can be calculated. Moreover, the digestibility of CML from the blends alone can be estimated by regression for each of the 8 “digestibility cows.” The results indicate that the blend accounted for 13, 33, 41, and 40% of CML provided in the whole diet for RW, EXT, SUG, and ENZ, respectively. They also show that digestibility of CML in blends was higher (on average 88%) than that in the rest of the diet (60%), and that digestibility of CML from blends alone (88, 89, 85, and 91% for blends used in RW, EXT, SUG, and ENZ treatments, respectively,  $P = 0.279$ ) was not significantly different. The same approach was applied to lysine, and the results showed that blends contributed a major part (71 to 78%) of the dietary lysine supply, and that the apparent digestibility of lysine from blends alone did not differ between treatments (85, 89, 86, and 85% for blends used in RW, EXT, SUG, and ENZ treatments, respectively,  $P = 0.209$ ).

### Nitrogen Use Efficiency

The  $\Delta^{15}\text{N}_{\text{animal-diet}}$ , which is the natural  $^{15}\text{N}$  enrichment of animal proteins over the diets, was expected to be negatively correlated with the N use efficiency (Cantalapiedra-Hijar et al., 2018). This has been ob-

served in a preceding comparison between raw and extruded proteaginous seeds (Mendowski et al., 2019). In the present work, no significant overall relationship was observed between this biomarker and the N use efficiency. However, the range of variation in N use efficiency was rather low (0.11 g/g among the 32 measurements on the 8 “digestibility cows” and 0.14 g/g among the 64 measurements on all 16 cows) compared with other published studies (up to 0.4 g/g, as reviewed by Cantalapiedra-Hijar et al., 2018), which may impair such evidence. However,  $\Delta^{15}\text{N}_{\text{animal-diet}}$  was positively related to rumen  $\text{NH}_3$  concentration ( $R^2 = 0.52$ ;  $P = 0.008$ ) as previously found in dairy cows (Cantalapiedra-Hijar et al., 2016), but unexpectedly was not related to PDI efficiency (Cantalapiedra-Hijar et al., 2018). This may suggest that variability in efficiency of N utilization was mainly related to digestive efficiency in this study conducted with animals having a relatively homogeneous potential in milk production. In a recent study in dairy cows,  $\Delta^{15}\text{N}_{\text{animal-diet}}$  values decreased in animals fed tannin-treated grass silage compared with control without any change in N use efficiency (Herremans et al., 2019). However, in this study, a shift between fecal and urinary N was observed and authors concluded that  $\Delta^{15}\text{N}_{\text{animal-diet}}$  would probably reflect the urinary N excretion rather than N use efficiency.

## CONCLUSIONS

Several results, including Maillard compounds, ED1, rumen  $\text{NH}_3$ , and plasma AA, showed that extrusion of the fava bean:linseed blend without additive makes proteins less degradable in the rumen compared with the raw blend. Pretreatment with reducing sugars under the conditions described in this study led to a lower concentration of some plasma AA, suggesting an over-protection of proteins in the intestine. Pretreatment with amylases led to a similar level of AA in plasma as for the extruded blend without additive, suggesting that intestinal absorption of AA was comparable with both treatments. Despite the variations of  $\text{NH}_3$  concentration in ruminal fluid and plasma EAA concentration, no change in N partitioning was observed. These results altogether confirm that extrusion at 140°C is a promising way to improve the digestive utilization of proteins from fava bean by ruminants, and provide evidence that innovative processes such as adding reducing sugars or amylases during pretreatment before extrusion require more effort to achieve an optimal protection of proteins in the rumen and a good intestinal assimilation of proteins. More work is needed to potentiate the productive responses of the animals to those innovative treatments.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was conducted as part of the Proleval project, supported by Valorex (Combourtille, France) and financed by bpifrance (Paris, France). The authors thank their colleagues at INRA: S. Rudel and the staff of “Les Cèdres”: D. Roux, L. Mouly, V. Tate, G. De Falvard, J. Bourdassol, F. Rosa and J.-N. Beaufils (UE Herbipôle, Theix, France) for help with managing the experiment, sampling and animal care; V. Largeau, L. Genestoux, E. Tixier, I. Constant, P. Denis, C. Chante-lauze, S. Nasrollahi (UMR Herbivores, Theix, France), O. Dhumez (UMR MoSAR, Paris, France), and T. Le Mouël (UMR Pegase, Rennes, France), for help with sampling and for their valuable technical support. The authors also thank C. Léridon (UniLaSalle, Beauvais, France) for her help with Maillard compound analyses. Finally, they thank D. Marsh (freelance editor, Courbevoie, France) for checking and amending the English text.

## REFERENCES

- Alamir, I., C. Niquet-Leridon, P. Jacolot, C. Rodriguez, M. Orosco, P. M. Anton, and F. J. Tessier. 2013. Digestibility of extruded proteins and metabolic transit of Nε-carboxymethyllysine in rats. *Amino Acids* 44:1441–1449. <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1427-3>.
- Aufrère, J., D. Graviou, C. Demarquilly, R. Vérité, B. Michalet-Doreau, and P. Chapoutot. 1989. Aliments concentrés pour ruminants : prévision de la valeur azotée PDI à partir d'une méthode enzymatique standardisée. *INRA Prod. Anim.* 2:249–254.
- Aufrère, J., D. Graviou, C. Demarquilly, R. Vérité, B. Michalet-Doreau, and P. Chapoutot. 1991. Predicting in situ degradability of feed proteins in the rumen by two laboratory methods (solubility and enzymatic degradation). *Anim. Feed Sci. Technol.* 33:97–116.
- Bayourthe, C., R. Moncoulon, and F. Enjalbert. 1998. Effect of extruded lupin seeds as a protein source on lactational performance of dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 72:121–131.
- Bazin, S. 1984. Grille de notation de l'état d'engraissement des vaches Pie Noires. In Réseau national d'expérimentation et de démonstration en élevage bovin. S. Bazin, ed. Institut technique de l'élevage bovin, Paris, France.
- Benchaar, C., C. Bayourthe, R. Moncoulon, and M. Vernay. 1991. Ruminant digestion and intestinal absorption of lupine proteins extruded in the lactating cow. *Reprod. Nutr. Dev.* 31:655–665.
- Benchaar, C., M. Vernay, C. Bayourthe, and R. Moncoulon. 1992. Effet de l'extrusion de la féverole (*Vicia faba*) sur les flux intestinaux d'azote et d'amidon chez la vache laitière en production. *Reprod. Nutr. Dev.* 32:265–275.
- Brun-Lafleur, L., L. Delaby, F. Husson, and P. Faverdin. 2010. Predicting energy × protein interaction on milk yield and milk composition in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:4128–4143.
- Cantalapiedra-Hijar, G., R. J. Dewhurst, L. Cheng, A. R. J. Cabrita, A. J. M. Fonseca, P. Nozière, D. Makowski, H. Fouillet, and I. Ortigues-Marty. 2018. Nitrogen isotopic fractionation as a biomarker for nitrogen use efficiency in ruminants: A meta-analysis. *Animal* 12:1827–1837.
- Cantalapiedra-Hijar, G., I. Ortigues-Marty, A. M. Schiphorst, R. Robins, I. Tea, and S. Prache. 2016. Natural <sup>15</sup>N abundance in key amino acids from lamb muscle: Exploring a new horizon in diet authentication and assessment of feed efficiency in ruminants. *J. Agric. Food Chem.* 64:4058–4067.
- Chapoutot, P., O. Dhumez, G. Chesneau, A. Germain, S. Mendowski, and P. Nozière. 2018. Influence de l'extrusion sur la dégradabilité de l'azote de mélanges à base de féverole ou de lupin et effet de la distribution granulométrique des produits. *Renc. Rech. Rum.* 24:196.
- Chapoutot, P., O. Dhumez, A. Germain, and G. Chesneau. 2016. Influence of extrusion on nitrogen degradability of faba bean or lupine blends including urea. Page 564 in Book of Abstracts of the 67th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, Belfast, UK. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.
- Chapoutot, P., O. Martin, P. Nozière, and D. Sauvart. 2015. Systool Web, a new one-line application for the French INRA «Systali» project. Page 265 in Book of Abstracts of the 66th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, Warsaw, Poland. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.
- Cros, P., M. Vernay, and R. Moncoulon. 1991. In situ evaluation of the ruminal and intestinal degradability of extruded whole horse beans. *Reprod. Nutr. Dev.* 31:249–255.
- Cutullic, E., P. Faverdin, N. Edouard, and J. L. Peyraud. 2013. Report of simulation to quantify the effect of the main factors affecting N balance at cow level, Deliverable D7.3 of the Collaborative European Project FP7, Innovative and practical management approaches to reduce nitrogen excretion by ruminants (RedNex).
- Daniel, J. B., N. C. Friggens, P. Chapoutot, H. Van Laar, and D. Sauvart. 2016. Milk yield and milk composition responses to change in predicted net energy and metabolizable protein: a meta-analysis. *Animal* 10:1975–1985.
- DePeters, E. J., and J. P. Cant. 1992. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: A review. *J. Dairy Sci.* 75:2043–2070.
- Dovidaitienė, G., R. Gružauskas, R. Stankevičius, I. Monkevičienė, J. Kantautaitė, I. Kudlinskienė, A. Grockienė, R. Želvytė, and J. Klementavičiūtė. 2016. Influence of extruded rapeseeds and faba beans mixture on productivity, production quality and rumen fluid parameters of dairy cows. *Vet. Zootech.* 79:20–26.
- Duc, G., C. Mignolet, B. Carrouée, and C. Huyghe. 2010. Importance économique passé et présente des légumineuses: rôle historique dans les assolements et facteurs d'évolution. *Innovations Agronomiques* 11:1–24.
- Edouard, N., A. Suzanne, P. Lambertson, B. Rouillé, and P. Faverdin. 2018. Complete nitrogen balance in dairy cows: Does every drop of sweat count? Xth International Symposium of Nutrition of Herbivores, Clermont-Ferrand, France.
- Froidmont, E., M. Bonnet, Y. Beckers, and N. Bartiaux-Thill. 2006. Influence du degré de mouture et de l'extrusion sur la valeur nutritionnelle de la graine de lupin. *Renc. Rech. Rum.* 13:98.
- Herremans, S., V. Decruyenaere, G. Cantalapiedra-Hijar, Y. Beckers, and E. Froidmont. 2019. Effects of hydrolysable tannin-treated grass silage on milk yield and composition, nitrogen partitioning and nitrogen isotopic discrimination in lactating dairy cows. *Animal* <https://doi.org/10.1017/S175173111900226X>.
- INRA. 2018. INRA Feeding System for Ruminants. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.
- INRA-CIRAD-AFZ Tables. 2017. Ingénierie & Etudes. Accessed Mar. 14, 2018. <https://feedtables.com/fr>.
- ISO. 2004. Animal feeding stuffs—enzymatic determination of total starch content. In: ISO-15914. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Kaysi, Y., and J. P. Melcion. 1992. Traitements technologiques des protéagineux pour le monogastrique: Exemples d'application à la graine de féverole. *Prod. Anim.* 5:3–17.
- Magrini, M.-B., M. Anton, C. Cholez, G. Corre-Hellou, G. Duc, M.-H. Jeuffroy, J.-M. Meynard, E. Pelzer, A.-S. Voisin, and S. Walrand. 2016. Why are grain-legumes rarely present in cropping systems despite their environmental and nutritional benefits? Analyzing lock-in in the French agrifood system. *Ecol. Econ.* 126:152–162.
- Mendowski, S., P. Chapoutot, G. Chesneau, A. Ferlay, F. Enjalbert, G. Cantalapiedra-Hijar, A. Germain, and P. Nozière. 2019. Effects of replacing soybean meal by raw or extruded blends containing

- faba bean or lupin seeds on nitrogen metabolism and performances of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 102:5130–5147.
- Morgavi, D. P., H. Boudra, J. P. Jouany, and D. Graviou. 2003. Prevention of patulin toxicity on rumen microbial fermentation by SH-containing reducing agents. *J. Agric. Food Chem.* 51:6906–6910.
- Niquet-Léridon, C., and F. Tessier. 2011. Quantification of N-carboxymethyl-lysine in selected chocolate-flavoured drink mixes using high-performance liquid chromatography–linear ion trap tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 126:655–663.
- Nozière, P., I. Ortigues-Marty, C. Loncke, and D. Sauvant. 2010. Carbohydrate quantitative digestion and absorption in ruminants: From feed starch and fibre to nutrients available for tissues. *Animal* 4:1057–1074.
- Petit, H. V., R. Rioux, and D. R. Ouellet. 1997. Milk production and intake of lactating cows fed raw or extruded peas. *J. Dairy Sci.* 80:3377–3385.
- Sauvant, D., G. Cantalapiedra-Hijar, S. Lemosquet, P. Nozière, V. Berthelot, and P. Faverdin. 2018. Protein and amino acids expenditure, efficiency and requirements. Pages 119–137 in INRA, 2018. INRA Feeding System for Ruminants. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.
- Spanghero, M., and Z. M. Kowalski. 1997. Critical analysis of N balance experiments with lactating cows. *Livest. Prod. Sci.* 52:113–122.
- Subnel, A. P. J., R. G. M. Meijer, W. M. Van Sraalen, and S. Tamminga. 1994. Efficiency of milk protein production in the DVE protein evaluation system. *Livest. Prod. Sci.* 40:215–224.
- Terres Univia. 2017. Chiffres clés. Oléagineux et plantes riches en protéines.
- Tessier, J., P. Jacolot, and C. Niquet-Léridon. 2012. La réaction de Maillard : cent ans de découvertes scientifiques sur la chimie des aliments et la santé. Lettre scientifique n°10, Conférence du 22 novembre 2012. Fonds Français pour l'Alimentation et la Santé, Paris, France.
- Titze, N., J. Krieg, H. Steingass, and M. Rodehutschord. 2019. Variation of lupin protein degradation in ruminants studied in situ and using chemical protein fractions. *Animal* 13:709–717.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583–3597.
- Volden, H. 2011. NorFor - The Nordic feed evaluation system. EAAP Publications No. 130, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.
- Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39:971–974.

## ORCID

- A. Ferlay  <https://orcid.org/0000-0002-0651-792X>  
G. Cantalapiedra-Hijar  <https://orcid.org/0000-0001-9486-8238>  
P. Nozière  <https://orcid.org/0000-0003-1727-8984>

### III. Mesures complémentaires sur les aliments et les résidus de dégradation *in sacco*

#### 1. Introduction

Dans cette partie sont présentés les mesures et résultats qui concernent les composés de Maillard, les valeurs de dégradabilité *in sacco* ( $DT_N$ ) et de digestibilité réelle intestinale ( $dr_N$ ). Ces mesures, réalisées *a posteriori* des deux essais sur les VL présentés plus haut, ont été conduites afin d'apporter des informations supplémentaires pouvant aider à l'interprétation et à la compréhension des résultats observés *in vivo*. Les composés de Maillard, déjà dosés dans les aliments expérimentaux et dans les fèces, et présentés dans les deux articles ci-dessus, ont été également dosés dans les résidus *in sacco* après 15 h d'incubation dans le rumen. L'ensemble des résultats dans les aliments et dans les résidus sont présentés dans cette partie. Concernant les mesures de  $DT_N$  et de  $dr_N$  de l'azote, elles ont été réalisées en deux temps ( $DT_N$  d'une part et  $dr_N$  d'autre part) sur les 11 concentrés expérimentaux utilisés dans les deux essais sur VL. Les résultats sont également présentés dans cette partie.

Ces résultats, non disponibles au moment de la rédaction des deux articles précédents, auraient pu faire l'objet d'une publication à part. Toutefois, la rédaction d'un 4<sup>ème</sup> article dans le cadre de la thèse n'a pas été possible en raison du temps limité. Ces résultats sont donc présentés tels quels dans cette partie.

#### a. Réactions de Maillard

On appelle « réactions de Maillard » un ensemble de réactions non enzymatiques complexes, séquentielles et parallèles (Helou et al., 2014), initié par la fixation d'un atome d'azote sur un carbone aldéhydique d'un sucre (Tessier et al., 2012) à une température élevée (typiquement lors des phénomènes de cuisson), dans certaines conditions à température ambiante (par exemple lors du stockage des aliments, Helou et al., 2014) ou encore en conditions physiologiques. Cet atome d'azote peut provenir du groupement amine libre des protéines, des peptides ou des AA. L'initiation de la réaction de Maillard conduit à des composés dont la formation est réversible dans des conditions de pH acides. Dans le cas des ruminants, cela peut impliquer que ces composés peuvent être détruits dans la caillette. Cependant, la liaison des composés de Maillard initiaux est plus résistante que la liaison peptidique, d'où une forme de protection dans le rumen due à une limitation de l'hydrolyse microbienne. C'est pourquoi, dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la formation des composés de Maillard dans les aliments testés, mais aussi à leur digestion (résidus d'incubation dans le rumen et les fèces) afin d'apporter un éclairage nouveau sur la digestion de l'azote de graines protéagineuses extrudées.

Les réactions de Maillard sont complexes, diverses et influencées par les conditions du milieu de réactions (Renn et Sathe, 1997). En effet, la teneur en eau, le pH, la température, la

durée du chauffage, mais aussi la nature du sucre et de l'acide aminé ainsi que le ratio ose/AA vont déterminer le type de réaction et donc les composés obtenus.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à 4 composés de Maillard en particulier : la furosine, la N $\epsilon$ -carboxyméthyl-lysine (CML), l'acrylamide et le 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) en raison de leurs différents stades et conditions d'apparition. La furosine est un produit d'Amadori, c'est-à-dire un produit précoce de la réaction de Maillard (le réarrangement d'Amadori est la première étape de la réaction de Maillard). La furosine n'est pas présente naturellement dans les aliments, mais apparaît lors de la réaction à partir des protéines ou des AA libres. Selon les conditions des traitements thermiques, la furosine peut disparaître suite à la formation de composés plus tardifs de la réaction de Maillard du fait de l'avancement de la réaction (Erbersdobler et Somoza, 2007). La CML est un composé terminal de la réaction de Maillard, très stable, formé à partir de la lysine, qui peut être soit libre, soit contenue dans les protéines. La température nécessaire à sa formation est plus faible que pour l'acrylamide. La CML est soluble et capable de franchir la barrière intestinale. L'acrylamide, également un composé terminal, est formé à partir de l'asparagine libre qui réagit notamment avec du glucose ou d'autres sucres réducteurs (Tessier et al., 2012), et sa formation se produit lors de chauffage à température élevée (par exemple lors de friture, notamment des pommes de terre, ou alors lors de la torréfaction du café par exemple). L'acrylamide est libre, ce n'est pas une molécule liée aux protéines. Enfin, le HMF est un composé stable qui peut être formé lors de la réaction de Maillard, mais qui n'est pas spécifique à cette dernière : il peut se former lors de la caramélisation par exemple (auto-dégradation des sucres). Donc si la proportion de sucre augmente, la probabilité de voir apparaître du HMF augmente aussi. Comme l'acrylamide, c'est une molécule libre, donc il n'y a pas d'interaction avec les protéines. Nous nous sommes également intéressés à la teneur en lysine totale des aliments expérimentaux, des résidus de dégradation *in sacco* dans le rumen et dans l'intestin, ainsi que dans les fèces des animaux lors des essais *in vivo*. La lysine est en effet l'un des AA les plus sensibles à la réaction de Maillard, du fait de ses deux groupements amines. Ce dosage de lysine totale quantifie la lysine libre ainsi que la lysine engagée dans des liaisons peptidiques (oligopeptides, peptides, et protéines), mais pas la fraction de lysine engagée dans des formes complexes (comme la CML par exemple) qui ne réagit pas à ce dosage. Dans la suite de ce manuscrit, les résultats sont désignés comme « lysine totale » ou simplement « lysine ».

Les hypothèses étaient que 1/ la teneur en composés de Maillard des produits testés allait augmenter avec l'intensité des traitements d'extrusion, et 2/ la teneur en lysine totale allait au contraire diminuer avec l'intensité des traitements d'extrusion du fait des liaisons de la lysine (libre ou peptidique ou protéique) avec les sucres.

### *b. Dégradation ruminale et digestibilité réelle dans l'intestin*

Pour mettre en place les essais *in vivo* sur les VL, dans lesquels les rations distribuées aux animaux étaient iso-MAT, la connaissance des valeurs PDI des aliments testés n'était pas indispensable. Les valeurs de DT<sub>N</sub> des aliments testés avaient été estimées à partir des valeurs DE1 (déterminées en amont des essais), et les valeurs de dr<sub>N</sub> à partir des tables INRA. Les

mesures *in sacco* permettant de déterminer la DT<sub>N</sub> et la dr<sub>N</sub> mais aussi la dégradabilité ruminale et la digestibilité réelle de la CML et de la lysine ont donc été réalisées *a posteriori* des essais *in vivo*. Ce volet a été pris en charge par Patrick Chapoutot, assisté d'Ophélie Dhumez, dans le cadre des phases de screening du projet PROLEVAL menées par l'UMR MoSAR (75005, Paris) en parallèle des essais *in vivo*. Les incubations dans le rumen ont été effectuées par Ophélie Dhumez, aidée de ses stagiaires (UMR MoSAR, 75005, Paris) sur les animaux fistulés de la ferme expérimentale d'Arvalis – Institut du Végétal de la Jaillière (44370, La Chapelle-Saint-Sauveur). Enfin, les incubations dans l'intestin ont été réalisées par l'équipe de Philippe Lambertson à la station expérimentale de l'INRA de Rennes (Méjusseume, 35650, Le Rheu).

Les hypothèses étaient que 1/ la DT<sub>N</sub> des aliments allait diminuer avec l'augmentation de l'intensité du traitement d'extrusion ; 2/ que la dr<sub>N</sub> allait à l'inverse augmenter avec l'intensité du traitement d'extrusion ; mais nous n'avions pas d'hypothèse préconçue sur la dégradabilité et la digestibilité de la CML et de la lysine par manque de recul sur ces données, à notre connaissance mesurée pour la première fois chez les ruminants.

## 2. Matériels et méthodes

### a. Aliments étudiés

Les échantillons pour les mesures des composés de Maillard et les incubations *in sacco* étaient les 11 aliments expérimentaux (7 issus du premier essai et 4 du second) qui ont été testés sur vaches laitières lors des deux essais *in vivo* (décrits dans les Matériels et Méthodes de chacune des parties I et II des résultats). Le [Tableau 3](#) résume la nature de ces 11 aliments. À la sortie des extrudeurs, une caractérisation visuelle des aliments a également été effectuée afin d'appréhender globalement l'intensité du traitement d'extrusion.

Tableau 3 : rappel des aliments testés et de leurs procédés technologiques

Essai <i>in vivo</i>	Aliment <sup>1</sup>	Additif maturation	Température cible	Ajout eau
1	Féverole FC	Pas d'extrusion, graine broyée crue		
	Féverole FE1	∅	140°C	non
	Féverole FE2	∅	160°C	non
	Lupin LC	Pas d'extrusion, graine broyée crue		
	Lupin LE1	∅	140°C	non
	Lupin LE2	∅	160°C	non
	Tourteau de soja	Pas d'extrusion		
2	Féverole CRU	Pas d'extrusion, graine broyée crue		
	Féverole EXT	∅	140°C	non
	Féverole SUC	Sucres réducteurs	140°C	non
	Féverole ENZ	Cocktail enzymatique	140°C	oui

<sup>1</sup>pour les aliments féverole et lupin, il s'agit de mélanges composés de 90 % de graines protéagineuses associées à 10 % de lin

### *b. Mesures des composés de Maillard et de la lysine*

Toutes les analyses de CML, lysine, furosine et HMF ont été réalisées au laboratoire UniLaSalle, département de chimie analytique (60000, Beauvais) et les analyses d'acrylamide ont quant à elles été réalisées au département chimie du laboratoire UpScience (02400, Château-Thierry).

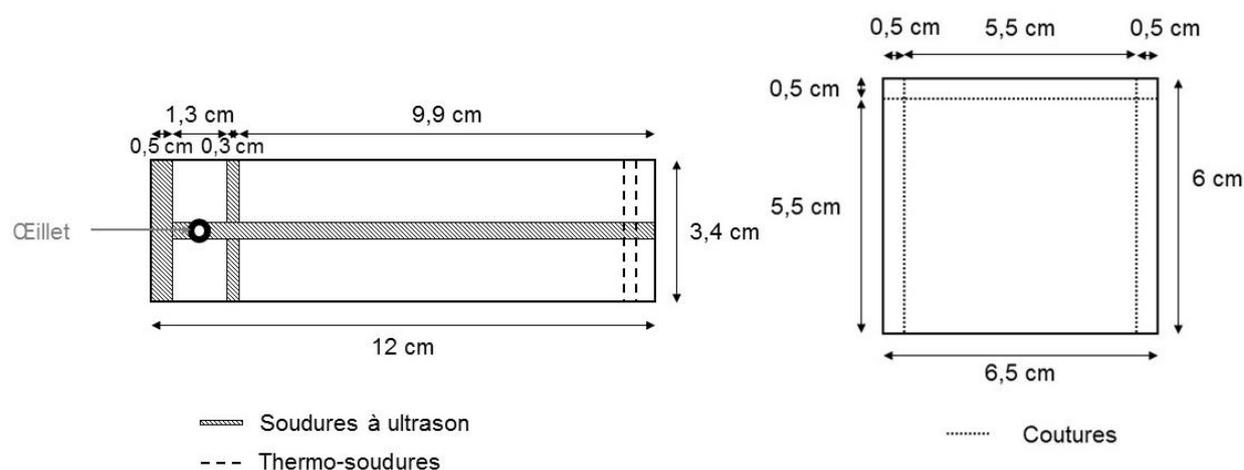
Les dosages de la CML et de lysine ont été effectués par chromatographie liquide à haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem après réduction et hydrolyse en milieu acide (Niquet-Léridon et Tessier, 2011). Des standards internes ont permis de corriger les éventuels effets de la matrice. La furosine a été dosée grâce aux mêmes techniques que pour la CML et la lysine, mais sans réduction avant l'hydrolyse acide. Le HMF a été extrait puis déterminé par chromatographie liquide à haute performance couplée à une détection Ultra-Violet (longueur d'ondes : 284 nm). L'acrylamide a été dosé grâce à une chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse.

L'étude des composés de Maillard est, à notre connaissance, totalement nouvelle chez les ruminants. Les dosages de ces composés ont donc été réalisés en plusieurs fois, au fur et à mesure de l'avancée des réflexions autour de cette thématique. Par exemple, les résultats d'analyses sur les aliments de l'essai 1 (acrylamide, HMF, CML et lysine) ont conduit à affiner les analyses réalisées dans l'essai 2 : le dosage du HMF a été abandonné car les valeurs étaient presque systématiquement sous le seuil de détection, et le dosage de la furosine a été ajouté pour avoir une indication sur la phase précoce des réactions. De plus, suite à des résultats qui nous ont semblé *a posteriori* incohérents pour l'échantillon de féverole EXT (valeur aberrante), et à un décalage des valeurs entre les deux essais pour une même matière première ayant subi le même procédé technologique (traduisant un effet série sur les dosages), la CML, la lysine et la furosine des aliments du premier essai, ainsi que la CML dans l'échantillon féverole EXT (2<sup>ème</sup> essai), ont été redosés. Ce sont les résultats de cette dernière série qui ont été gardés, du fait d'une meilleure cohérence à la fois entre eux et avec les résultats des autres paramètres mesurés lors des essais *in vivo*. Cela explique les valeurs de CML et de lysine différentes entre la partie I des Résultats et cette partie, puisque sont présentés ici les résultats issus de la dernière série de dosage, et non ceux des dosages initiaux comme dans la partie I des Résultats. Enfin, des analyses de CML et lysine dans les mélanges de fourrages des deux essais (ration de base) ainsi que dans le maïs grain du premier essai ont également été réalisés.

### *c. Incubations in sacco*

Deux types de sachets distincts ont été utilisés pour les incubations dans le rumen (détermination de la  $DT_N$ ) et dans l'intestin (détermination de la  $dr_N$ ), respectivement ([Figure 18](#)). Six répétitions par aliment ont été réalisées pour les incubations ruminales et 21 pour les incubations intestinales. Les incubations rumen se sont déroulées comme présenté dans la partie I.2.b. de l'étude bibliographique de ce manuscrit, sur 3 vaches tarées de race Holstein. Pour les incubations intestinales, tous les sachets ont été incubés 15 h dans le rumen sur 3 vaches tarées de race Holstein. Le temps d'incubation de 15 h correspond à un temps de séjour moyen proche de celui obtenu dans les conditions de calcul de la  $DT_N$  avec un  $k_p$  de 6 %/h, et est proche de

celui évoqué dans la partie I.2.b. de ce manuscrit (16 h). Une partie des sachets incubés dans le rumen a été utilisée pour les incubations intestinales puis les calculs de la  $dr_N$  (comme expliqué dans la partie I.2.b. de l'étude bibliographique), tandis que l'autre partie a été analysée pour les calculs de la disparition de la MS et de l'azote après 15 h d'incubation dans le rumen. La solution de pepsine utilisée entre les incubations 15 h dans le rumen et les incubations intestinales était constituée de 3 g de pepsine dans 1 L d'une solution de HCl à 0,01 N, et les sachets y étaient incubés 2h30. Concernant les analyses d'azote, les séries incubées chez Arvalis (détermination de la  $DT_{6N}$ ) ont été dosées grâce à la méthode Dumas, tandis que les séries incubées à Méjusseume (détermination de la  $dr_N$ ) ont été dosées grâce à la méthode Kjeldahl. Les matériels et méthodes détaillés de ces incubations sont présentés en Annexe 1.



**Figure 18 :** schémas d'un sachet de nylon cylindrique SEFAR soudé à ultrason et fermé par thermo-soudure (sachet rumen, à gauche), et d'un sachet de nylon SEFAR plié en deux et cousu sur trois côtés (sachet duodénum, à droite)

### 3. Résultats et discussion

#### a. Caractérisation visuelle des aliments testés

La réaction de Maillard au sens large provoque l'apparition de composés noirâtres, les mélanoïdines, qui entraînent le brunissement des produits (Tessier et al., 2012). Ceci est particulièrement bien mis en évidence sur les produits à base de lupin, où une différence de couleur entre les lupins extrudés et le lupin cru est clairement visible (Figure 19). De plus, l'aspect foncé du lupin est accentué avec l'intensité du traitement d'extrusion (température plus élevée). Ceci s'observe dans une moindre mesure sur les produits à base de féverole (Figure 19). Dans l'essai 1, si la féverole extrudée était légèrement plus foncée que la féverole crue, la différence de couleur entre les deux traitements d'extrusion était minime. Pour l'essai 2, la différence de couleur est nette entre la féverole crue et les féveroles extrudées, mais aucune différence n'est observée entre les trois traitements d'extrusion.



Figure 19 : Effet de l'extrusion sur la couleur des mélanges féverole + lin ou lupin + lin.

### *b. Composés de Maillard et lysine dans les aliments*

Les teneurs en composés de Maillard sont présentées pour tous les aliments des deux essais *in vivo* dans le [Tableau 4](#). Du fait des différentes séries de dosages réalisées, les résultats présentés ici pour les mélanges féverole et lupin de l'essai 1 diffèrent de ceux présentés dans la partie I des Résultats. Les valeurs de CML et lysine sont en particulier plus élevées que dans la publication de Mendowski et al., 2019 (partie I des Résultats), cependant le classement des régimes les uns par rapport aux autres reste le même. Enfin, des analyses de CML et lysine ont également été réalisées dans les mélanges de fourrages des deux essais (ration de base) ainsi que dans le maïs grain du premier essai.

## Résultats

Tableau 4 : composés de Maillard des différents aliments expérimentaux

<b>Essai</b> <i>in vivo</i>	<b>Aliment</b>	<b>CML<sup>1</sup></b> (µg/g MS)	<b>Lysine totale</b> (mg/g MS)	<b>Acrylamide</b> (ng/g MS)	<b>HMF<sup>2</sup></b> (µg/g MS)	<b>Furosine</b> (µg/g MS)
<b>1</b>	<b>Féverole FC</b>	10,1	18,9	< 35	< 4	37,3
	<b>Féverole FE1</b>	33,4	18,3	68,6	< 4	216,9
	<b>Féverole FE2</b>	47,0	18,6	38,6	< 4	182,3
	<b>Lupin LC</b>	14,4	17,7	< 34	< 4	40,2
	<b>Lupin LE1</b>	52,1	15,3	175,4	< 4	176,4
	<b>Lupin LE2</b>	75,1	14,4	507,3	8,8	202,3
	<b>Tourteau de soja</b>	123,2	34,1	< 34	< ld <sup>3</sup>	nd
	<b>Maïs grain</b>	13,2	3,9	nd <sup>4</sup>	nd	nd
	<b>Mélange de fourrages</b>	53,3	3,2	nd	nd	nd
<b>2</b>	<b>Féverole CRU</b>	11,1	21,0	< 32	nd	55,0
	<b>Féverole EXT</b>	35,1	20,0	< 32	nd	128,3
	<b>Féverole SUC</b>	49,2	14,6	50,5	nd	1917,0
	<b>Féverole ENZ</b>	47,6	19,5	< 32	nd	563,3
	<b>Mélange de fourrages</b>	30,8	2,5	nd	nd	nd

<sup>1</sup>Nε-carboxymethyl-lysine

<sup>2</sup>hydroxymethylfurfural

<sup>3</sup>inférieur à la limite de détection

<sup>4</sup>non dosé

Les aliments extrudés contiennent plus de CML que les aliments crus, et *a fortiori* lorsque la température d'extrusion augmente. Il convient toutefois de noter que le tourteau de soja contient plus de CML que les aliments extrudés, même à haute température. Cela peut être dû au process de trituration qui fait intervenir des étapes à température élevées lors de l'extraction de l'huile (pressage puis extraction par solvant) et de la préparation du tourteau (désolvantation puis granulation). En outre, le soja est naturellement plus riche en lysine que la féverole ou le lupin, ce qui favorise l'apparition de CML. De plus, les fourrages, notamment le mélange distribué dans le premier essai, contiennent un niveau de CML similaire à celui des produits extrudés à 140°C. Si on compare les traitements entre les deux essais, les niveaux de CML sont similaires respectivement pour les deux féveroles crues (FC et CRU), pour les deux féveroles extrudées à 140°C sans prétraitement spécifique de maturation (FE1 et EXT), et pour la féverole extrudée à 160°C et les deux féveroles maturées avec du sucre réducteur ou le cocktail enzymatique avant extrusion (FE2, SUC et ENZ). Ces résultats, cohérents entre les échantillons des deux essais, confirment partiellement le choix de garder les résultats issus de la deuxième analyse pour les aliments du premier essai.

La lysine totale diminue avec l'augmentation de l'intensité de l'extrusion pour le lupin dans le premier essai, et est plus faible avec la féverole SUC dans le deuxième essai.

L'acrylamide a été détectée uniquement dans les aliments extrudés. Le choix a été fait de ne pas faire doser l'acrylamide dans les aliments du second essai, étant donné que cette molécule

n'est pas liée aux protéines. Cela apporte donc peu d'informations sur la complexation et la protection des protéines dans le rumen.

Le HMF a été détecté uniquement pour le lupin extrudé à haute température. Comme pour l'acrylamide, le HMF n'a pas été dosé dans les aliments du second essai car c'est une molécule libre, qui plus est non spécifique de la réaction de Maillard.

Enfin, la furosine a été dosée dans les 10 aliments féverole et lupin pour avoir un aperçu de la phase précoce de la réaction de Maillard. De manière générale, les produits extrudés contiennent plus de furosine que les produits crus. Dans l'essai 1, la féverole extrudée à basse température en contient d'avantage que la féverole extrudée à haute température, tandis que c'est l'inverse pour le lupin. Dans l'essai 2, la féverole extrudée après maturation avec additif (en particulier la féverole SUC) contient plus de furosine que la féverole extrudée sans additif. Cela suggère que la maturation de la féverole avec des sucres réducteurs avant extrusion favorise le démarrage de la réaction de Maillard plus que les autres traitements mis en place.

### c. Disparition in sacco dans le rumen et l'intestin

#### α. Azote

Les résultats de la disparition de l'azote dans le rumen et dans l'intestin pour les deux séries de mesures (Arvalis et Méjusseume) des 11 aliments expérimentaux sont présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : dégradabilité et disparition *in sacco* de l'azote dans le rumen, l'intestin et l'ensemble du tube digestif

Essai <i>in vivo</i>	Aliment	Arvalis		Méjusseume			
		n	DT <sub>6N</sub> , %	n	dispR <sub>15N</sub> <sup>1</sup> , %	drN, %	dispTD <sub>N</sub> <sup>2</sup> , %
1	<b>Féverole FC</b>	6	83,5	21	92,7	64,2	97,4
	<b>Féverole FE1</b>	6	66,6	16	78,6	87,8	97,4
	<b>Féverole FE2</b>	6	67,9	16	77,5	89,1	97,5
	<b>Lupin LC</b>	6	92,6	14	94,8	67,4	98,3
	<b>Lupin LE1</b>	6	67,3	18	64,9	95,5	98,4
	<b>Lupin LE2</b>	6	66,5	19	57,2	96,9	98,7
	<b>Tourteau de soja</b>	6	68,7	21	84,6	95,6	99,3
2	<b>Féverole CRU</b>	6	90,9	20	94,2	72,5	98,4
	<b>Féverole EXT</b>	6	65,2	20	68,4	94,2	98,1
	<b>Féverole SUC</b>	6	68,7	21	68,4	94,5	98,3
	<b>Féverole ENZ</b>	6	70,5	19	77,8	91,9	98,2

<sup>1</sup> disparition *in sacco* de l'azote dans le rumen après 15 h d'incubation

<sup>2</sup> disparition *in sacco* de l'azote dans l'ensemble du tube digestif (rumen + intestins)

Les valeurs DT<sub>6N</sub> de l'azote varient de 65 à 93 %, les valeurs les plus élevées étant observées pour les graines de féverole et lupin crues. L'extrusion permet une diminution de la DT<sub>6N</sub> de 16 à 23 points pour la féverole, et d'environ 26 points pour le lupin. Toutefois, l'addition d'un cocktail enzymatique avant extrusion de la féverole conduit à une diminution de la DT<sub>6N</sub> légèrement plus faible que les autres traitements, ce qui est probablement dû à l'ajout d'eau lors de ce process (voir la partie II des Résultats). Le tourteau de soja présente une DT<sub>6N</sub> de 69 %, 80

valeur plus faible que celle de la féverole ou du lupin crus, et similaire à celle des graines protéagineuses extrudées.

Selon les traitements, la disparition de l'N dans le rumen au bout de 15 h varie de 68 à 94 %. Les produits extrudés sont les moins dégradables dans le rumen, les produits crus les plus dégradables, le tourteau de soja étant intermédiaire. Les valeurs  $dispR_{15N}$  des féveroles EXT et SUC du second essai sont 10 points plus faibles que celles des féveroles extrudées du premier essai, ce qui est surprenant compte tenu du fait que l'intensité de l'extrusion a été plus faible lors du deuxième essai que lors du premier. Les valeurs  $dispR_{15N}$  sont, en toute logique, plus faibles que les  $DT_{6N}$ , en cohérence avec les différences de temps de séjour moyen associés à ces 2 critères. De plus, ces écarts entre les 2 critères de dégradabilité sont d'autant plus importants que les produits sont peu dégradables.

Les résultats de disparition de l'N dans l'ensemble du TD varient peu (autour de 98 %), montrant un phénomène de compensation de la digestion entre la partie rumen et la partie intestinale.

Les  $dr_N$  des graines crues sont inférieures d'environ 20 à 30 points par rapport à celles des graines extrudées. La  $dr_N$  du tourteau de soja est intermédiaire entre celles des graines crues et des graines extrudées. Si la  $dr_N$  permet de discriminer les graines crues des graines extrudées, elle ne permet en revanche pas de distinguer les différents traitements d'extrusion.

À partir de ces différents résultats, les teneurs en N absorbable (g/kg MS) dans l'intestin ont été calculées pour chaque traitement des graines de féverole et de lupin (avec N la teneur en azote de l'aliment en g/kg MS,  $dispR_{15N}$  et  $dr_N$  en %) :

$$N_{abs} = N \times \left(1 - \frac{dispR_{15N}}{100}\right) \times \frac{drN}{100}$$

L'extrusion de ces graines multiplie les teneurs en N absorbable en moyenne par 5,6 et 11,1 pour la féverole et le lupin, respectivement.

### *β. Composés de Maillard et lysine*

Les résultats de la dégradation de la lysine et des composés de Maillard dans le rumen et dans l'intestin des 11 aliments expérimentaux sont présentés dans le Tableau 6 et dans le Tableau 7.

Tableau 6 : disparition *in sacco* de la lysine dans le rumen, l'intestin et l'ensemble du tube digestif

<b>Essai</b> <i>in vivo</i>	<b>Aliment</b>	<b>dispR<sub>15Lys</sub><sup>1</sup>, %</b>	<b>dr<sub>Lys</sub><sup>2</sup>, %</b>	<b>dispTD<sub>Lys</sub><sup>3</sup>, %</b>
<b>1</b>	<b>Féverole FC</b>	89,2	87,8	98,7
	<b>Féverole FE1</b>	64,6	96,0	98,6
	<b>Féverole FE2</b>	72,2	95,2	98,7
	<b>Lupin LC</b>	91,1	80,5	98,3
	<b>Lupin LE1</b>	45,6	97,4	98,6
	<b>Lupin LE2</b>	40,0	98,1	98,9
	<b>Tourteau de soja</b>	84,4	96,9	99,5
<b>2</b>	<b>Féverole CRU</b>	89,4	89,0	98,8
	<b>Féverole EXT</b>	60,0	97,2	98,9
	<b>Féverole SUC</b>	65,5	97,4	99,1
	<b>Féverole ENZ</b>	67,6	97,0	99,0

<sup>1</sup>disparition *in sacco* de la lysine dans le rumen après 15 h d'incubation

<sup>2</sup>disparition *in sacco* de la lysine dans le duodénum

<sup>3</sup>disparition *in sacco* de la lysine dans l'ensemble du tube digestif (rumen + intestins)

La disparition de la lysine dans le rumen (Tableau 6) est plus faible que celle de l'azote, en particulier pour les produits extrudés et notamment pour le lupin. En revanche, la disparition de la lysine dans les intestins est supérieure à celle de l'azote, en particulier pour les produits crus. Il en résulte une efficacité globale dans l'ensemble du tube digestif plus importante pour la lysine que pour l'azote (29 % contre 20 % en moyenne pour les 11 aliments expérimentaux). L'impact des phénomènes d'extrusion est également visible pour la lysine, qui est moins dégradable dans le rumen, mais plus digestible dans l'intestin pour les produits extrudés que pour les produits crus. Ces résultats sur la lysine sont globalement cohérents avec ceux obtenus sur l'N (Tableau 5) et avec les hypothèses formulées initialement pour les protéines en général, à savoir une plus faible dégradation dans le rumen et une meilleure digestibilité dans l'intestin pour les produits extrudés que pour les produits crus.

De la même façon que pour l'N, les teneurs en lysine absorbable ont été calculées. Les résultats montrent, comme pour l'azote, que l'extrusion augmente les teneurs en lysine absorbable dans les intestins, mais dans une moindre mesure que pour l'azote (teneurs multipliées par 3,1 et 6,5 en moyenne pour la féverole et le lupin, respectivement).

La disparition ruminale de la lysine du tourteau de soja est intermédiaire entre celle des graines crues et celle des graines extrudées comme ce qui est observé pour l'N total. Sa disparition intestinale est en revanche proche de celle des graines extrudées. Cela peut s'expliquer partiellement par le fait que la nature des protéines est différente entre le soja, la féverole et le lupin. Au sein de ces protéines, la disposition des molécules de lysine dans les chaînes peptidiques change la réactivité des protéines vis-à-vis de la complexation avec les chaînes carbonées réductrices des sucres. Mais surtout, les traitements thermiques subis par le tourteau de soja expliquent ses valeurs plus proches de celles des aliments traités que des protéagineux crus.

Tableau 7 : disparition *in sacco* de la CML dans le rumen, l'intestin et l'ensemble du tube digestif

Essai <i>in vivo</i>	Aliment	dispR <sub>15</sub> CML <sup>1</sup> , %	dr CML <sup>2</sup> , %	dispTD CML <sup>3</sup> , %
1	Féverole FC	0,2	74,2	73,6
	Féverole FE1	-31,5	93,7	91,3
	Féverole FE2	17,4	91,2	93,2
	Lupin LC	32,2	69,8	79,0
	Lupin LE1	1,2	94,6	94,9
	Lupin LE2	16,7	95,4	96,3
	Tourteau de soja	53,1	93,2	97,0
2	Féverole CRU	22,3	79,9	83,0
	Féverole EXT	-63,8	95,1	92,1
	Féverole SUC	-35,8	96,1	95,0
	Féverole ENZ	5,0	95,0	95,2

<sup>1</sup>disparition *in sacco* de la CML dans le rumen après 15 h d'incubation

<sup>2</sup>disparition *in sacco* de la CML dans le duodénum

<sup>3</sup>disparition *in sacco* de la CML dans l'ensemble du tube digestif (rumen + intestins)

La disparition ruminale de la CML varie très fortement selon les aliments, de -60 à +50 % (Tableau 7). Ces résultats sont *a priori* surprenants mais peuvent s'expliquer par le fait que la CML serait pas ou peu dégradable dans le rumen. Pour estimer le niveau de concentration ou de dilution de la CML dans les différents produits dosés, le ratio  $\frac{(\frac{CML}{MS})_{rumen}}{(\frac{CML}{MS})_{aliment}}$  est calculé. Ce ratio est de  $5,1 \pm 1,4$  pour l'ensemble des produits. Il y a donc un enrichissement relatif en CML de la MS au cours de la digestion ruminale, ce qui témoigne d'une faible dégradation de ces composés par les microbes du rumen comparativement aux autres fractions de la matière organique des échantillons.

La disparition mesurée dans l'ensemble du TD (disparition rumen + intestins) permet de discriminer les produits crus (CML moins digestible) des produits extrudés (CML plus digestible), mais ne permet pas la discrimination des produits extrudés entre eux.

Malgré leur variabilité, les valeurs de disparition ruminale de la CML ont été utilisées pour le calcul des valeurs de digestibilité réelle dans l'intestin. La même hiérarchie que pour les valeurs de dégradation dans l'ensemble du TD est observée entre produits crus et extrudés. Il semble donc que les phénomènes de digestion de la CML aient lieu préférentiellement dans l'intestin, et que la CML des produits extrudés soit plus digestible que celle des produits crus.

#### 4. Conclusion

Les différents dosages des composés de Maillard confirment que l'extrusion entraîne des réactions de complexation des protéines avec des sucres réducteurs. En effet, différents composés, intermédiaires ou finaux, issus de ces réactions sont détectés en plus grandes quantités dans les aliments extrudés que dans les aliments crus, ce qui confirme nos hypothèses. L'extrusion de la féverole semble plus propice à l'initiation de ces réactions, tandis que

l'extrusion du lupin semble au contraire plus propice à l'enchaînement des réactions vers des étapes plus avancées, comme le montre la plus importante apparition de composés de Maillard terminaux.

Les résultats de dégradation confirment l'hypothèse que l'extrusion protège les constituants azotés de la dégradation ruminale et favorise leur digestibilité intestinale, ce qui là encore confirme nos hypothèses. En effet, les  $DT_{6N}$  et les  $dr_N$  sont respectivement plus faibles et plus élevées avec les produits extrudés qu'avec les produits crus. Toutefois, s'il est facile de discriminer les produits crus des produits extrudés, la distinction des différents traitements d'extrusion est moins nette au regard de ces seuls paramètres. L'extrusion protège également la lysine de la dégradation ruminale et favorise sa digestion intestinale. En revanche, la CML ne semble pas dégradable dans le rumen, mais apparaît toutefois digestible dans l'intestin.

La protection de l'azote et les réactions de Maillard sont donc liées, comme par exemple dans le cas des aliments féverole SUC et lupin E2, où les teneurs élevées en composés de Maillard sont cohérentes avec les plus faibles concentrations en AA plasmatiques observés chez les vaches ingérant ces aliments dans les essais *in vivo*. Cela témoigne d'une trop forte protection des protéines par complexation, et même si ces complexes sont digestibles dans l'intestin comme l'ont montré les  $dr$  élevées de la CML, les animaux ne semblent pas valoriser les AA ainsi piégés.

Seules les comparaisons entre les différents traitements ont été évoquées ici. Les comparaisons des différentes méthodes de mesure et leurs limites sont développées dans la discussion générale de ce manuscrit.

## **IV. Analyse quantitative des données issues de la bibliographie**

**Raw or technologically treated proteaginous seeds as alternatives to soybean meal for dairy cows: comparative evaluation by meta-analysis of in situ and in vivo digestive parameters, nitrogen partition and dairy performance**

**Solveig Mendowski<sup>a,b</sup>, Pierre Nozière<sup>a,\*</sup>, Anne Ferlay<sup>a</sup>, Pauline Denis<sup>a</sup>, Guillaume Chesneau<sup>b</sup>, Patrick Chapoutot<sup>c</sup>**

*<sup>a</sup>Université Clermont Auvergne, INRAE, VetAgro Sup, UMR Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France*

*<sup>b</sup>Valorex, La Messayais, F-35210 Combourtillé, France*

*<sup>c</sup>Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, 75005, Paris, France.*

\* Corresponding author. Tel: +33 4 73 62 46 86; EM: pierre.noziere@inra.fr

Submitted to Animal Feed Science and Technology in March 2020

### Abstract

The objectives of this study were to quantify the effects on nitrogen metabolism and dairy performance of substituting soybean meal for proteaginous seeds or replacing raw with treated proteaginous seeds in dairy cow diets. This study was focused on three proteaginous seeds: faba bean, lupin and pea. Two databases were created, which gathered information on *in vivo* and *in situ* results, respectively. These were then used to analyze nitrogen ruminal degradability, nitrogen intestinal true digestibility, ruminal parameters, nitrogen partitioning and milk production and composition. A total of 31 and 36 articles were analyzed from the *in vivo* and *in situ* databases, respectively. Statistical analyses assessed the effects of substitution for each measured or calculated variable; t-tests were applied to compare the difference between the tested feed (i.e. raw or treated proteaginous seed, or treated proteaginous seed) and the control feed (i.e. soybean meal, or raw proteaginous seed, respectively). The proteaginous seeds contained less crude protein than soybean meal (on average -199 g/kg DM,  $P < 0.001$ ). The use of raw proteaginous seeds instead of soybean meal led to higher nitrogen ruminal degradability (+16 g/100 g on average,  $P < 0.005$ ), but treatment of these seeds led to a decrease in nitrogen ruminal degradability (-13 g/100 g on average) compared to values for raw seeds. Replacing soybean meal by raw faba bean, lupin or pea in the iso-crude protein diets of dairy cows led to an increase in  $\text{NH}_3$  in ruminal fluid (+22 mg/L,  $P < 0.050$ ) and tended to decrease milk protein content. However, when those seeds were treated and values compared to those of raw seeds, nitrogen in milk tended to increase, but milk fat content was decreased. This quantitative review has allowed some general trends to be highlighted, despite a limited amount of available data for some variables (in particular for pea). Moreover, treatment of seeds is variable (use of different processes, pressures and temperatures) and feeding practices of dairy cows are diverse (e.g. maize silage or grass silage as main forage, forage:concentrate ratio ranging from 84:16 to 40:60), which can dilute the effects of the addition of proteaginous seeds (added at up to 30 g/100 g of dietary dry matter) to the diets of dairy cows.

*Keywords:* proteaginous seed, soybean meal, dairy cows, nitrogen, review

*Abbreviations:* BC-VFA, branched-chain volatile fatty acid; dr<sub>N</sub>, nitrogen intestinal true digestibility; ED<sub>6</sub><sub>N</sub>, nitrogen ruminal effective degradability assuming a particle outflow from the rumen of 0.06 h<sup>-1</sup>; MFC, milk fat content; MPC, milk protein content; NANM N, non-ammoniacal non-microbial nitrogen; PDIA<sub>6</sub>, dietary protein truly digestible in the intestine assuming a particle outflow from the rumen of 0.06 h<sup>-1</sup>; PIA<sub>6</sub>, dietary protein entering the intestine assuming a particle outflow from the rumen of 0.06 h<sup>-1</sup>; PS, proteaginous seeds; SBM, soybean meal

### **1. Introduction**

Replacing soybean meal (SBM) by proteaginous seeds (PS) in dairy cow diets has been studied for many years in different parts of the world (e.g. Ingalls and McKirdy, 1974; Yu et al., 1999; Puhakka et al., 2016). Compared to soybean meal, PS contain less crude protein (CP) (between 213 and 380 g/kg dry matter (DM) for PS versus 526 g/kg DM for SBM, INRA, 2018). In addition, proteins of raw PS are more degradable in the rumen (nitrogen ruminal degradability calculated with a particle outflow from the rumen of 0.06 h<sup>-1</sup> (ED<sub>6</sub><sub>N</sub>) between 0.70 and 0.81 g/g versus 0.63 g/g for SBM, INRA 2018), decreasing their nutritive value for ruminants. To counteract this, heat-treatments of PS have been developed and have become a well-known solution to reduce the rumen degradability of PS proteins (Cros et al., 1991; Benchaar et al., 1992) and thus to improve their nutritive value.

Our first hypothesis was that raw seeds, compared to SBM, would lead to higher ruminal degradation of proteins and lower dairy performance. Our second hypothesis was that treated PS compared to raw seeds would lead to lower ruminal degradation of proteins and higher dairy performances. To validate these hypotheses, the literature was searched for published data on the digestion of raw or treated PS in dairy cow diets and a meta-analysis performed to highlight the trends and quantify their effects on nitrogen ruminal degradability, nitrogen intestinal true digestibility, ruminal parameters, nitrogen partitioning and milk production and composition.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Selection of articles

Publications of interest were identified by searching Google Scholar, Science Direct, Web of Science and PubMed using the key words “ruminants AND (digestibility OR degradability OR milk production) AND (faba bean OR lupin OR pea)”. Two databases were created, the first gathered *in vivo* results about the addition of raw or heat-treated PS in ruminant diets, and the second collected *in situ* results concerning the seeds ruminal degradability and intestinal true digestibility. Two major axes were studied: comparisons between SBM and PS on the one hand, and between raw and treated PS on the other hand.

To be included in the *in vivo* database, publications were required to have evaluated dairy cows, focused on replacement of all or part of the concentrate protein source by PS (faba bean, lupin or pea), and contain results on milk performance, nitrogen digestion (in the rumen or in the intestine), or nitrogen partition. To be included in the *in situ* database, publications were required to contain results on nitrogen degradability in the rumen and/or nitrogen true digestibility in the intestine for faba bean, lupin or pea. The steps involved in the selection of the publications are summarized in the Prisma flow diagram (Figure 1).

### 2.2 Creation of databases

Two file templates were created with Microsoft Excel software (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA, version 2016), for the *in vivo* and *in situ* experiments, respectively, as methodologies and results differed between the two types of publication. For each publication, an individual sub-file, which gathered the information contained in the publication, was completed using the corresponding template (*in vivo* and/or *in situ*) to be as exhaustive as possible. If one publication contained both *in vivo* and *in situ* results, two individual sub-files (one per template) were completed for this publication. Once all individual sub-files were completed, both databases (*in vivo* and *in situ*) were created by compiling their corresponding individual sub-files. For each database, a homogenization of qualitative terms used for some

data was necessary before coding, and some units were converted when required. Moreover, additional calculations useful for interpretation were performed when not directly reported in the publication. In the *in vivo* database, this concerned mainly the proportion of dietary CP provided by the tested experimental feed (i.e. the proportion of this feed in the diet×CP content of this feed/CP content of the diet). As the calculation of N in milk differed between publications, this variable was systematically recalculated as (milk yield×milk protein content/6.38/0.95) assuming 6.38 g of N in 100 g of milk proteins and 95 g of protein N in 100 g of total milk N (DePeters and Cant, 1992; Spanghero and Kowalski, 1997). Nitrogen balance was systematically recalculated as N intake–(N in milk+N in feces+N in urine), using N in milk calculated with the above-described formula. In the *in situ* database, the effective degradability of N (ED<sub>6</sub>\_N) was calculated using an outflow rate of particles from the rumen fixed at 0.06 h<sup>-1</sup>, to make all values from the different publications comparable. The ED<sub>6</sub>\_N (g/g) was calculated according to Ørskov and McDonald (1979) as:  $ED_{6\_N} = a + (b \times c) / (c + 0.06)$ , with a the soluble fraction (g/g), b the degradable fraction (g/g) and c the rate of degradation of b (h<sup>-1</sup>); or by the “step by step method” from the different points of N degradation kinetics (Kristensen et al., 1982). The content of dietary proteins entering the intestine (PIA<sub>6</sub>) and of dietary proteins truly digestible in the intestine (PDIA<sub>6</sub>) was calculated, respectively, as  $PIA_6 = CP \text{ content of the seed} \times (1 - ED_{6\_N})$  and  $PDIA_6 = PIA_6 \times dr\_N$ , with dr\_N the intestinal true digestibility of N (in g/g).

Finally, coding was carried out using an exhaustive inventory of all the experimental factors, taking into account the PS studied, and the possible technological treatments applied to the seed (e.g. extrusion, toasting...).

### 2.3 Treatment comparisons

For both the *in vivo* and *in situ* data analyses, the PS studied were faba bean (*Vicia faba*), lupin (mainly *Lupinus albus*, and *Lupinus angustifolius*, considered without distinction because the two experiments with *Lupinus angustifolius* gave similar results to those with *Lupinus*

*albus*) and pea (*Pisum sativum*). Only the following comparisons were considered in the present work (tested versus control): raw PS versus SBM; treated PS versus SBM; and treated versus raw for the same PS. This led to a selection from the *in vivo* and *in situ* databases, respectively, of 31 (representing 40 experiments) and 36 articles (plus a non-published study, corresponding to the *in situ* measures on the experimental concentrates used in Mendowski et al. (2019) by Chapoutot et al., personal communication).

Treatments applied to PS were categorized according to their characteristics in order to compare the technological effects on the seeds. The three categories were: heat treatments, i.e. heat but no pressure (which included cooking, i.e. boiling the seeds; steam cooking, i.e. heating the seeds with steam; toasting and roasting, i.e. heating the seeds by conduction with or without steam, respectively); thermo-mechanical treatments, i.e. heat and pressure (which included flaking, i.e. steam cooking combined with flattening; expansion, i.e. heating the seeds with hot air under high pressure; extrusion, i.e. forcing the seeds to pass through a die to induce self-heating and destructuring of the seed cells; autoclaving, i.e. cooking the seeds under high pressure); and other treatments (tanning, i.e. binding the amino function of proteins). Within the “heat treatment” category, roasting and toasting have been grouped together as their description did not allow a proper distinction and their measured effects appeared similar. Seeds treated in this manner are described as “toasted/roasted” seeds in the rest of this article and analyzed together to increase the number of data within each category.

### *2.4 Calculations and statistical analyses*

Statistical analyses were carried out using Minitab 17 software (Minitab Inc., USA, 2017). For each comparison, effects of treatments were assessed using t-tests applied to the difference between the tested versus control treatments (as described above), for each measured or calculated variable of interest (listed in Table 3). The differences were considered significant when below the threshold P-value of 0.05 and a trend was considered at  $0.05 < P\text{-value} < 0.10$ .

When only one comparison was found, the P-value reported in the associated publication was indicated - when available - in the text.

### 3. Results

#### 3.1 *In situ degradation and protein values*

The mean characteristics of all the variables of interest from the *in situ* database are summarized in Table 1. Lupin was the main PS represented, followed by faba bean, and pea. Direct comparisons between PS and SBM were scarce. Only six experiments from five publications simultaneously reported results for CP, ED<sub>6</sub>\_N and dr\_N required for PDIA<sub>6</sub> calculation.

##### 3.1.1 *Raw or treated proteaginous seeds versus soybean meal*

Results of *in situ* degradation of raw or treated PS compared to SBM are summarized in Table 4, and results on ED<sub>6</sub>\_N are represented in Figure 2. The PS contained less CP than SBM (P<0.001), with differences averaging -203, -147 and -248 g/kg DM for faba bean, lupin and pea, respectively. All the raw PS had higher ED<sub>6</sub>\_N than SBM (+0.158, +0.181 and +0.151 g/g for faba bean, lupin and pea, respectively, P<0.004, Figure 2). This led to lower PIA<sub>6</sub> values (-121, -123 and -130 g/kg DM for faba bean, lupin and pea, respectively, P<0.001). Compared to SBM, dr\_N tended to decrease with raw faba bean (-0.273 g/g, P=0.096), but not with lupin. Only one comparison was found for raw pea (Solanas et al., 2005), which concluded that PS were associated with significantly lower dr\_N than SBM (-0.102 g/g, P<0.050).

*In situ* data reporting direct comparisons of treated PS vs. SBM were scarce and variable between studies (Solanas et al., 2005; Aguilera et al., 1992; Chapoutot et al., unpublished data). Briefly, extrusion of faba bean led to significantly lower ED<sub>6</sub>\_N than SBM (-0.009 g/g, P<0.001), and extrusion of PS led to lower PIA<sub>6</sub>, similar dr\_N and lower PDIA<sub>6</sub> than SBM (-70 g/kg DM, -0.03 g/g and -62 g/kg DM on average for all PS) mainly due to the lower CP content of PS. Autoclaving faba bean led to similar ED<sub>6</sub>\_N as SBM, but autoclaving lupin

tended to lower ED<sub>6</sub>\_N (-0.093 g/g, P=0.066). The only comparison found for autoclaving pea led to a lower ED<sub>6</sub>\_N (-0.153 g/g, Aguilera et al., 1992). Finally, roasting PS led to similar ED<sub>6</sub>\_N and PIA<sub>6</sub> as SBM.

### 3.1.2 Treated versus raw proteaginous seeds

The *in situ* degradation results for treated faba bean, lupin and pea compared to the same raw seeds are summarized in Table 5, and results for ED<sub>6</sub>\_N are represented in Figure 3. Treatments did not affect the CP content of PS, except for extrusion of faba bean and lupin (+15 and +10 g/kg DM, P=0.009 and P=0.020, respectively), which was an unexpected finding.

Extrusion of faba bean decreased ED<sub>6</sub>\_N (-0.111 g/g, P=0.001) and consequently increased PIA<sub>6</sub> (+34 g/kg DM, P=0.002), increased dr\_N (+0.179 g/g, P=0.002) and PDIA<sub>6</sub> (+62 g/kg DM, P<0.001). When faba bean was toasted or roasted, the ED<sub>6</sub>\_N decreased by 0.093 g/g compared with raw faba bean (P=0.005). No effect was observed on PIA<sub>6</sub> with toasted/roasted faba bean, whereas dr\_N was increased by 0.051 g/g (P<0.001), and PDIA<sub>6</sub> tended to be increased by 98.7 g/kg DM (P=0.083, Table 5). Only one study comparing autoclaved to raw faba bean was found, which showed that ED<sub>6</sub>\_N decreased by 0.224 g/g, and PIA<sub>6</sub> consequently increased by 76.2 g/kg DM after autoclaving (Aguilera et al., 1992).

The ED<sub>6</sub>\_N was lower in extruded than in raw lupin (-0.155 g/g, P<0.001), and PIA<sub>6</sub>, dr\_N and PDIA<sub>6</sub> were all higher (+55 g/kg DM, P<0.001, +0.324 g/g, P=0.001 and +92 g/kg DM, P=0.020, respectively). Toasting or roasting lupin reduced ED<sub>6</sub>\_N (-0.161 g/g, P<0.001), and increased PIA<sub>6</sub> (+52.0 g/kg DM, P<0.001) and dr\_N (+0.018 g/g, P<0.001), leading to an increase in PDIA<sub>6</sub> (+93.1 g/kg DM, P=0.040). Publications about the effects of other treatments on lupin were scarce. Aguilera et al. (1992) showed that autoclaving lupin reduced ED<sub>6</sub>\_N by 0.313 g/g, thus increasing PIA<sub>6</sub> by 128 g/kg DM. Rodehutschord et al. (1999) observed that cooking or tanning lupin reduced ED<sub>6</sub>\_N by 0.035 and 0.071 g/g, while PIA<sub>6</sub> was increased by 10.8 and 18.9 g/kg DM, respectively.

When pea was treated by extrusion, the decrease in ED<sub>6</sub>\_N was not significant compared with raw pea, but PIA<sub>6</sub> was higher (+47 g/kg DM, P=0.010). Solanas et al. (2005) observed an increase of 0.121 g/g in dr\_N (P<0.050) with extruded pea. Toasting pea reduced ED<sub>6</sub>\_N (-0.190 g/g, P<0.001) and increased PIA<sub>6</sub> (+60 g/kg DM, P=0.017) and dr\_N (+0.033 g/g, P<0.001, Table 5). The only comparison between autoclaved and raw pea concluded that autoclaving reduced ED<sub>6</sub>\_N by 0.323 g/g and consequently increased PIA<sub>6</sub> by 86 g/kg DM (Aguilera et al., 1992).

### 3.2. In vivo responses

Characteristics of the cows' milk production (days in milk and initial milk yield) and diet (nature and quantities of dietary forage, dry matter intake (DMI)) included in the *in vivo* database are summarized in Tables 2 and 3. Among PS, faba bean and lupin were the most represented, particularly in comparisons with SBM. Out of the 110 diets included in the database, 73 were distributed *ad libitum*, 18 were distributed *sub ad libitum*, 2 were distributed in a restricted manner, and 17 were distributed in an unspecified manner. Most of the diets were based on maize silage. None of the publications comparing SBM and PS, or raw and treated PS, except Mendowski et al. (2019 and 2020), indicated whether a methionine supplementation was applied, or provided the digestible methionine content of the diet.

#### 3.2.1 Raw and treated proteaginous seeds versus soybean meal

Results of the *in vivo* effects of feeding raw or treated PS (faba bean, lupin or pea) instead of SBM are summarized in Tables 6 to 8. Replacement of SBM by PS was made in iso-nitrogenous conditions (P>0.100 for all seeds, except for extruded lupin, where the CP content of the diet was 5 g/kg DM higher than with SBM, P=0.030). Moreover, in most cases, the proportion of dietary CP provided by the experimental concentrate (PS or SBM) did not differ between tested and control treatments, except for extruded faba bean (P=0.039, Table 6) and extruded lupin (P=0.060, Table 7) diets, which provided more dietary CP than SBM. Replacement of SBM by PS in the diet did not affect DMI (measured on a majority of *ad libitum*

or *sub ad libitum* diets), except for extruded lupin which tended to decrease DMI by 1.1 kg/d compared to SBM (P=0.077, Table 7). However, it should be noted that three of the four comparisons were performed in *sub ad libitum* conditions.

Compared to SBM, including raw faba bean in dairy cow diets (Table 6) increased NH<sub>3</sub> content (+16.7 mg/L, P=0.039; Figure 4), decreased total volatile fatty acids (VFA) (-6.8 mmol/L, P=0.036), and tended to increase acetate/propionate ratio and branched-chain VFA (BC-VFA) in ruminal fluid (+0.2 mol/mol, P=0.052 and +0.2 mol/100 mol total VFA, P=0.079, respectively). Raw faba bean also tended to decrease milk yield (-0.5 kg/d, P=0.079), decrease milk protein content (MPC; -0.7 g/kg, P=0.018), N secreted in milk (-4.8 g/d, P=0.001), and the N in milk/N intake ratio (from 28.6 to 28.0 g/100 g, P=0.026), but also decreased milk urea content (-30.0 mg/L, P=0.084). With extruded faba bean, the N in milk/N intake ratio decreased (from 29.3 to 28.5 g/100 g, P=0.047) and milk urea tended to decrease (-48.0 mg/L, P=0.079) compared to SBM (Table 6). Few data were available with steam cooked faba bean, but MPC tended to decrease (-0.7 g/kg, P=0.090, Table 6) compared to SBM.

Including raw lupin in the diet instead of SBM increased NH<sub>3</sub> in ruminal fluid (+21.1 mg/L, P=0.032; Figure 4) and decreased MPC (-1.2 g/kg, P<0.001, Table 7). When extruded lupin was used instead of SBM, BC-VFA and MPC decreased (-0.2 mol/100 mol total VFA, P=0.051 and -2.2 g/kg, P<0.001, respectively), and milk urea tended to decrease (-67.0 mg/L, P=0.085) (Table 7). Few data were available with roasted lupin, and no difference compared with SBM was observed on ruminal parameters, milk yield, milk fat and protein content (Table 7). The only publication reporting replacement of SBM by tanned lupin concluded that milk yield, milk fat and protein content and milk N secretion were not modified (Emile et al., 1991).

Replacing SBM by raw pea led to an increase in NH<sub>3</sub> in ruminal fluid (+28.1 mg/L, P=0.020; Figure 4), and a decrease in N balance (-11.0 g/d, P=0.010, Table 8). Only one comparison was found that evaluated duodenal flow, and it showed that non-NH<sub>3</sub> N and microbial N were numerically increased (P>0.050, Khorasani et al., 2000), whereas non-NH<sub>3</sub>

non-microbial N (dietary + endogenous) was numerically decreased ( $P>0.050$ , Khorasani et al., 2000). When pea was extruded, milk fat content (MFC) tended to decrease ( $-1.4$  g/kg,  $P=0.070$ ), but N in milk tended to increase ( $+5.8$  g/d,  $P=0.090$ , Table 8 and Figure 6) compared to SBM. Petit et al. (1997) found that extrusion increased N excreted in urine and N balance ( $P<0.050$ ). When pea was flaked, milk urea was increased ( $+21.9$  mg/L,  $P=0.016$ , Table 8) compared to SBM. When pea was expanded and compared to SBM, no difference was observed on ruminal  $\text{NH}_3$ , milk yield, MFC and MPC (Masoero et al., 2006).

### 3.2.2 Treated versus raw proteaginous seeds

The *in vivo* effects of replacing raw by treated faba bean, lupin and pea are summarized in Tables 9 to 11. Except for raw vs. extruded lupin diets ( $+2.3$  g CP/kg DM,  $P=0.014$ , Table 10), comparisons between raw vs. treated seeds were made in iso-nitrogenous conditions. Likewise, raw and treated seeds contributed the same proportion of CP dietary content. Whatever the PS or the applied treatment, DMI was not changed between raw vs. treated seeds (even when diets were distributed *ad libitum* and *sub ad libitum*), except for toasted or roasted faba bean ( $-0.1$  kg/d,  $P=0.092$ , Table 9).

For faba bean, BC-VFA were lower ( $-0.5$  mol/100 mol total VFA,  $P=0.001$ ), as was MFC ( $-2.7$  g/kg,  $P=0.020$ ), and N in milk tended to be higher ( $+4.1$  g/j,  $P=0.085$ , Table 9 and Figure 7) with extruded than with raw seeds. The only experiment reporting N duodenal flow documented an increase in both microbial and non- $\text{NH}_3$  non-microbial flow ( $P<0.050$ , Benchaar et al., 1994b). When faba bean was toasted or roasted, N intake tended to decrease ( $-7.9$  g N/d,  $P=0.088$ ) as did MFC ( $-1.6$  g/kg,  $P=0.023$ , Table 9) compared to raw faba bean. Only one publication was found about the effects of tanning faba bean, which concluded that tanning increased MPC and N intake ( $P<0.050$ , Pelletier and Bouchard, 1978).

Replacing raw lupin by extruded seeds decreased  $\text{NH}_3$  in ruminal fluid ( $-11.8$  mg/L,  $P=0.040$ , Figure 5), BC-VFA ( $-0.5$  mol/100 mol VFA,  $P=0.022$ ) and MFC ( $-4.7$  g/kg,  $P=0.006$ ), but increased N in milk ( $+4.0$  g/j,  $P=0.033$ , Table 10 and Figure 7); the only experiment

reporting duodenal flow reported that there was an increase in both microbial and non-NH<sub>3</sub> non-microbial N duodenal flow ( $P < 0.050$ , Benchaar et al., 1994a). No difference in *in vivo* results was observed when lupin was toasted or roasted compared to raw lupin. Publications about the effects of expanding, tanning, autoclaving and cooking lupin were scarce. Pieper et al. (2006) concluded that expanding lupin led to better protection of CP, resulting in a better milk yield ( $P < 0.050$ ), but no change in MFC and MPC. Emile et al. (1991) observed a higher milk yield but a lower MFC when lupin was tanned, with no difference in MPC.

For pea, few *in vivo* data were available about the effects of extrusion, flaking, expanding and tanning (Table 11). Focant et al. (1990) concluded that extrusion led to a significant increase in microbial ( $P < 0.010$ ) and a numerical increase in non-NH<sub>3</sub> non-microbial N flow in the duodenum, a decrease in NH<sub>3</sub> content from ruminal fluid ( $P < 0.001$ ), but reported that steam-flaking had no observed effects. No beneficial effect on milk production was observed with extrusion, and Petit et al. (1997) concluded that extrusion decreased N excreted in feces ( $P < 0.050$ ), but increased N balance ( $P < 0.010$ ). Masoero et al. (2006) concluded that expanding had no effects on intake and milk production. Finally, Pelletier and Bouchard (1978) concluded that tanning pea had no effect on milk production, but increased MPC ( $P < 0.050$ ) and had no effect on N partitioning despite an increase in N intake ( $P < 0.050$ ).

#### **4. Discussion**

The aims of this study were twofold: first, to make an inventory of the available data about the *in situ* degradation and the *in vivo* responses of dairy cows fed raw or treated faba bean, lupin and pea; and second, to quantify the main trends related to the substitution of SBM by PS, or the replacement of raw PS by treated PS, on N ruminal degradability and intestinal true digestibility, ruminal parameters, milk production and composition, and N partitioning.

##### *4.1. In situ degradation*

With all PS, the ED<sub>6</sub>\_N was higher for raw seeds (on average 0.778 g/g) than for SBM (on average 0.613 g/g). In this analysis, the ED<sub>6</sub>\_N values for PS were slightly lower than those averaged from larger data sets, and presented in feed tables by INRA (2018) and INRA-CIRAD-AFZ (2017), i.e. 0.82, 0.86 and 0.86 g/g for raw faba bean, lupin and pea, respectively. Most of the treatments significantly decreased the ED<sub>6</sub>\_N: on average -0.100, -0.158 and -0.130 g/g with all treatments for faba bean, lupin and pea, respectively, with the strongest effect with autoclaving, followed by extrusion and finally toasting (Figure 3). The observed reductions in ED<sub>6</sub>\_N confirm that heat and/or pressure treatments can protect N from ruminal degradation, which led on average to an increase of +43 g PIA<sub>6</sub>/kg DM for all PS and treatments. In this study, the ED<sub>6</sub>\_N reductions observed with extrusion were slightly lower than those reported in INRA Feed Tables (2018). This could partly be due to differences in treatment modalities (duration, temperatures reached, intensity of pressure treatments, etc.), which are often poorly described in the literature. For similar treatments (extrusion or other heat treatments except toasting/roasting), the greatest reductions in ED<sub>6</sub>\_N were observed for lupin, which appeared to be the seed the most reactive to treatment. This implies a higher increase in PIA<sub>6</sub> (in g/kg DM) for lupin (+53, n=56) than for faba bean (+18, n=25); pea also appeared reactive (+58, n=6), but there were less available data. This finding was also supported by intra-experiment comparisons: reductions in ED<sub>6</sub>\_N were greater for lupin than for faba bean with autoclaving (Aguilera et al., 1992), extrusion (Chapoutot et al., 2016) and toasting (Goelema, 1999), and greater for lupin than for pea with extrusion (Aufrère et al., 2001) and toasting (Goelema, 1999; Goelema et al., 1998). Fewer data were available for dr\_N than ED<sub>6</sub>\_N, but when PS were heat-treated, dr\_N increased significantly (on average for all treatments: +0.10, +0.12 and +0.04 g/g for faba bean, lupin and pea, respectively). This suggests that the protection of proteins against ruminal degradation is reversible in the abomasum, which allows the absorption of amino acids in the intestine. Some treated PS have similar or lower ED<sub>6</sub>\_N than SBM: autoclaved faba bean, lupin, or pea, and roasted lupin. However, due to their lower CP content, no treated PS reached

a level of PIA<sub>6</sub> comparable to SBM despite the effects of heat treatments: PIA<sub>6</sub> values were on average 60 g/kg DM lower with treated PS than with SBM, and no direct comparison between treated PS and SBM was available for PDIA<sub>6</sub>.

### 4.2. In vivo responses

The PS seem to have a satisfying palatability for dairy cows as, in most cases, DMI was not reduced compared to diets containing SBM (the majority of experiments were conducted with diets distributed *ad libitum*).

According to the observed *in situ* results, a lower valorization of proteins by dairy cows might be expected when SBM is replaced by PS in their diet, and reciprocally a better valuation of proteins with treated PS compared to raw PS. Nevertheless, the expected effects of raw or treated PS were not systematically observed *in vivo*. This could be explained by the fact that differences between treatments on *in vivo* measured N flows were lower than those observed on N balance, which was mainly due to balance default (as a result of methodological limits) in dairy cows (Spanghero and Kowalski, 1997). It should also be noted that only Mendowski et al. (2019, 2020) explicitly reported on supplementation of metabolizable methionine. Thus, in all other studies, the diets containing faba bean and lupin (particularly when extruded) could have provided a supply of digestible methionine lower than current recommendations (2.3% of PDI, INRA, 2018) for MPC and protein secreted in milk. However, this may have been partly offset by the fact that comparisons between PS and SBM were performed with iso-CP diets (PS or SBM providing on average 39 g/100 g of dietary CP).

#### 4.2.1. Effects of substitution of soybean meal by raw proteaginous seeds

Even if the effects on protein degradation in the rumen appeared to follow a general trend when SBM was replaced by raw PS (Vander Pol et al., 2009; Cherif et al., 2018; Mendowski et al., 2019), the effects of these substitutions on milk production and composition were highly variable.

An evaluation of general trends provides a more global picture of the effects of dietary substitutions. When dairy cows were fed raw PS compared to SBM, ruminal NH<sub>3</sub> content increased (on average with all PS: +21 mg/L, n=14), and the higher the proportion of CP provided by raw PS, the higher the NH<sub>3</sub> content in the rumen (as illustrated by the average within-experiment response law, Figure 8). The BC-VFA molar proportion tended to increase with faba bean compared to SBM (on average with all PS: +0.13 mol/100 mol total VFA, n=10). The N in milk/N intake ratio decreased significantly with faba bean and numerically with lupin and pea (on average with all PS: 0.6 g/g, n=28). The MPC decreased significantly with faba bean and lupin (on average -1.0 g/kg), but not with pea. Milk yield and N in milk did not change with lupin or pea, but decreased with raw faba bean by 0.5 kg/d and 5 g/d, respectively. Taken together, these results are consistent with *in situ* observations: the increase in ruminal NH<sub>3</sub>, and the lower MPC and N in milk reflecting higher ruminal N degradation and the induced lower PDIA<sub>6</sub> value. Our first hypothesis, which was that raw seeds compared to soybean meal would lead to lower dairy performance was verified with faba bean, and numerically the same trend was observed with lupin and pea, although it did not reach statistical significance. The N partitioning between urine and feces was not modified when SBM was replaced by raw PS, but very few data were available.

The attenuation observed between *in vivo* and *in situ* responses could partly be explained by the risk of over-estimating the ED<sub>6</sub>\_N of PS due to particle loss during incubation when using the nylon bag technique, which has been reported to be high with PS (Michalet-Doreau and Cerneau, 1992). Consequently, PDI values of PS may have been underestimated, which implies a higher gap in dairy performance between SBM and PS.

The low content of digestible methionine of PS (1.48, 1.44 and 1.72 g/100 PDI for faba bean, lupin and pea, respectively, INRA 2018) should be noted. As no publication, except Mendowski et al. (2019, 2020), reported on supplementation with metabolizable methionine, diets

containing PS could have had lower than recommended levels of digestible methionine, which can impair dairy performance, in particular MPC.

### 4.2.2. *Effects of treatments on proteaginous seeds*

Only a few *in vivo* measures varied significantly following PS treatments. As observed previously for the comparison between raw PS and SBM, the effects on protein degradation in the rumen appeared to follow a general trend when raw PS was replaced by heat-treated PS (Focant et al., 1990; Benchaar et al., 1992; Mendowski et al., 2019), but the effects of these substitutions on milk production and composition were highly variable.

Both raw and treated PS provided on average 29 g/100 g (from 14 to 53g/100 g) of CP in dairy cow diets. With extrusion there was a global decrease in ruminal NH<sub>3</sub>, which was significant for lupin (-12 mg/L) and numerical for faba bean and pea (on average -17 mg/L, n=7 with faba bean and pea), suggesting extrusion protected the proteins against ruminal degradation. This is consistent with observations on ED<sub>6</sub>\_N with extrusion. With treatments other than extrusion, the effects depended on seed and treatment. For toasted/roasted faba bean, there was a decrease in NH<sub>3</sub> in ruminal fluid (the change was not statistically significant, but only two comparisons were found), whereas for toasting/roasting lupin and flaking pea the opposite was observed with an increase in NH<sub>3</sub> in ruminal fluid (only few data available). The main significant zootechnical result on nitrogen utilization concerned extrusion of faba bean and lupin, which led to an increase of N in milk (as also illustrated by the within-experiment response law, Figure 9). However, some heat treatments of faba bean (extrusion and toasting/roasting) and lupin (extrusion) appeared to decrease MFC, and most of the other treatments followed the same trend. This could be explained by a greater availability of fat after extrusion of lupin compared to raw lupin, leading to an inhibition of *de novo* synthesis of fatty acids in the mammary gland by dietary polyunsaturated fatty acids or rumen biohydrogenation intermediates (Chilliard et al., 2009). For extruded faba bean, the five available comparisons

concerned 10:90 linseed:fabia bean blends (Mendowski et al., 2019 and 2020), in which fat could have been released from the linseed during extrusion.

### 4.2.3. *Effects of substitution of soybean meal by treated proteaginous seeds*

At similar dietary CP content, diets containing treated PS rather than SBM had non-significantly higher NH<sub>3</sub> rumen content and milk yield. The MPC was significantly lower with steam cooked fabia bean and extruded lupin, and most other treated PS followed the same trend, so that N in milk tended to be lower than with SBM, but differences were small (-2 g N/day). Urinary or fecal N excretion and N balance values obtained with treated PS were comparable to those measured with SBM. The MFC tended to be lower with treated PS than with SBM, but differences were small (on average -1.2 g/kg, n=16) and non-significant, except for a trend with extruded pea. When treated PS were compared to SBM either no change in values, or lower MFC and MPC values were observed, as reported with steam-cooked fabia bean (-0.7 g/kg protein content, P=0.090), extruded lupin (-2.2 g/kg protein content, P<0.001) and extruded pea (-1.4 g/kg fat content, P=0.070 and -5.8 g/d N in milk, P=0.090). Heat treatments improved the nutritional value of PS, but still did not allow the seeds to reach the value of SBM. At iso-CP comparisons, this can be explained by the lower PDI content of PS compared to SBM, and also by the lack of digestible methionine contained in PS compared to SBM.

## 5. Conclusions

For some treatment comparisons, very few (if any) data were available for dairy cows, and results concerning N partitioning in particular were scarce. However, despite the limited amounts of available data and the great diversity of feeding practices, some general trends appear from this quantitative review. Proteins from raw PS were more degradable in the rumen than proteins from SBM, as revealed both by *in situ* studies and by *in vivo* ruminal NH<sub>3</sub> measurements. This ruminal N degradability was lowered by heat treatments, but even so the amount of PIA<sub>6</sub> did not reach levels obtained with SBM because of the differences in CP

content. Moreover, very few results on dr\_N were available. Evaluations of *in vivo* dairy performance indicated that MPC and milk N secretion were decreased with raw PS compared to SBM. In contrast, no major effect was observed when PS were treated compared to raw PS, except for a decrease in MFC, especially for extruded faba bean and lupin. Finally, at similar CP content, N transfer as protein in milk remained lower with treated PS than with SBM, but differences were small. When SBM was replaced by raw PS, or when raw PS were replaced by treated PS, the observed variability of responses in milk production and composition could partly be explained by the variations specific to each study, and particularly the dietary level of digestible methionine. Moreover, when PS were heat-treated, technological processes were most often not fully described, which led to uncertainty about the intensity of the process the seeds may have undergone. A better description of these heat or pressure treatments would permit a better understanding of their effects on PS, and consequently the effect on performance when these seeds are fed to dairy cows.

### **Acknowledgments**

This work was conducted as part of the PROLEVAL project, supported by Valorex (Combourtillé, France) et financed by bpifrance (Paris, France). The authors thank Jenny Grice (Bieuzy Les Eaux, France) for checking and amending the English text.

### **References**

- Aguilera, J.F., Bustos, M., Molina, E., 1992. The degradability of legume seed meals in the rumen: effect of heat treatment. *Animal Feed Science and Technology* 36, 101–112.
- Aufrère, J., Graviou, D., Melcion, J.P., Demarquilly, C., 2001. Degradation in the rumen of lupin (*Lupinus albus* L.) and pea (*Pisum sativum* L.) seed proteins: Effect of heat treatment. *Animal Feed Science and Technology* 92, 215–236.

- Benchaar, C., Cros, P., Bayourthe, C., 1992. Effect of extruding horsebeans and lupin seeds on in situ rumen degradation and intestinal digestibility of seed protein in non lactating cows. Presented at the 1ère conférence européenne sur les protéagineux, Angers, pp. 501–502.
- Benchaar, C., Moncoulon, R., Bayourthe, C., Vernay, M., 1994a. Effects of a supply of raw or extruded white lupin seeds on protein digestion and amino acid absorption in dairy cows. *Journal of Animal Science* 72, 492–501.
- Benchaar, C., Vernay, M., Bayourthe, C., Moncoulon, R., 1994b. Effects of extrusion of whole horse beans on protein digestion and amino acid absorption in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 77, 1360-1371.
- Chapoutot, P., Dhumez, O., Germain, A., Chesneau, G., 2016. Influence of extrusion on nitrogen degradability of faba bean or lupine blends including urea. Presented at the EAAP, Belfast.
- Cherif, C., Hassanat, F., Claveau, S., Girard, J., Gervais, R., Benchaar, C., 2018. Faba bean (*Vicia faba*) inclusion in dairy cow diets: Effect on nutrient digestion, rumen fermentation, nitrogen utilization, methane production, and milk performance. *Journal of Dairy Science* 101, 8916–8928. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14890>
- Chilliard, Y., Martin, C., Rouel, J., Doreau, M., 2009. Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. *Journal of Dairy Science* 92, 5199–5211. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2375>
- Cros, P., Vernay, M., Moncoulon, R., 1991b. In situ evaluation of the ruminal and intestinal degradability of extruded whole horsebeans. *Reproduction Nutrition Development* 31, 249–256.
- DePeters, E.J., Cant, J.P., 1992. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: a review. *Journal of Dairy Science* 75, 2043–2070. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77964-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77964-8)

- Emile, J.C., Huyghe, C., Huguet, L., 1991. Utilisation du lupin blanc doux pour l'alimentation des ruminants : résultats et perspectives. *Annales de Zootechnie* 40, 31–44.
- Focant, M., Van Hoecke, A., Vanbelle, M., 1990. The effect of two heat treatments (steam flaking and extrusion) on the digestion of *Pisum sativum* in the stomachs of heifers. *Animal Feed Science and Technology* 28, 303–313.
- Goelema, J.O., 1999. Processing of legume seeds: effects on digestive behaviour in dairy cows. Wageningen.
- Goelema, J.O., Spreeuwenberg, M.A.M., Hof, G., Van der Poel, A.F.B., Tamminga, S., 1998. Effect of pressure toasting on the rumen degradability and intestinal digestibility of whole and broken peas, lupin and faba beans and a mixture of these feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology* 76, 35–50.
- Ingalls, J.R., McKirdy, J.A., 1974. Faba bean as a substitute for soybean meal or rapeseed meal in rations for lactating cows. *Canadian Journal of Animal Science* 54, 87–89.
- INRA, 2018. L'alimentation des ruminants: [apports nutritionnels, besoins et réponses des animaux, rationnement, tables des valeurs des aliments]. Quae. Paris, France.
- INRA-CIRAD-AFZ, 2017. INRA-CIRAD-AFZ Feed Tables. URL <https://www.feedtables.com/fr> (accessed 9.28.19).
- Kristensen, E.S., Møller, P.D., Hvelplund, T., 1982. Estimation of the effective protein degradability in the rumen of cows using the nylon bag technique combined with the outflow rate. *Acta Agriculturae Scandinavica* 32, 123–127.  
<https://doi.org/10.1080/00015128209435738>
- Masoero, F., Moschini, M., Fusconi, G., Piva, G., 2006. Raw, extruded and expanded pea (*Pisum sativum*) in dairy cows diets. *Italian Journal of Animal Science* 5, 237–247.  
<https://doi.org/10.4081/ijas.2006.237>
- Mendowski, S., Chapoutot, P., Chesneau, G., Ferlay, A., Enjalbert, F., Cantalapiedra-Hijar, G., Germain, A., Nozière, P., 2019. Effects of replacing soybean meal with raw or extruded

- blends containing faba bean or lupin seeds on nitrogen metabolism and performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 102, 5130–5147. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15416>
- Mendowski, S., Chapoutot, P., Chesneau, G., Ferlay, A., Enjalbert, F., Cantalapiedra-Hijar, G., Germain, A., Nozière, P., 2020. Effects of pretreatment with reducing sugars or an enzymatic cocktail before extrusion of faba bean on nitrogen metabolism and performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 103, 396-409. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17286>
- Michalet-Doreau, B., Cerneau, P., 1992. Influence de la finesse de broyage des aliments sur l'importance des pertes en particules dans la technique in sacco. *Annales de Zootechnie* 41, 13-14.
- Ørskov, E.R., McDonald, I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science* 92, 499. <https://doi.org/10.1017/S0021859600063048>
- Pelletier, G., Bouchard, R., 1978. Evaluation de la féverole et du pois traités ou non-traités à la formaldéhyde comme source de protéines pour la vache laitière. *Canadian Journal of Animal Science* 58, 659–669.
- Petit, H.V., Rioux, R., Ouellet, D.R., 1997. Milk production and intake of lactating cows fed raw or extruded peas. *Journal of Dairy Science* 80, 3377–3385.
- Pieper, R., Gabel, M., Ott, E.M., Pieper, B., 2006. Performance of lactating dairy cows fed raw or expanded lupin seed. Presented at the 11th International Lupin Conference, Mexico, pp. 195–197.
- Puhakka, L., Jaakkola, S., Simpura, I., Kokkonen, T., Vanhatalo, A., 2016. Effects of replacing rapeseed meal with fava bean at 2 concentrate crude protein levels on feed intake, nutrient digestion, and milk production in cows fed grass silage-based diets. *Journal of Dairy Science* 99, 7993–8006. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-10925>

- Rodehutschord, M., Young, P., Phillips, N., White, C.L., 1999. Wool growth in Merino wethers fed lupins untreated or treated with heat or formaldehyde, with and without a supplementation of rumen protected methionine. *Animal Feed Science and Technology* 82, 213–226.
- Solanas, E., Castrillo, C., Balcells, J., Guada, J.A., 2005. In situ ruminal degradability and intestinal digestion of raw and extruded legume seeds and soya bean meal protein. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 89, 166–171.
- Spanghero, M., Kowalski, Z.M., 1997. Critical analysis of N balance experiments with lactating cows. *Livestock Production Science* 52, 113–122.
- Vander Pol, M., Hristov, A.N., Zaman, S., Delano, N., Schneider, C., 2009. Effect of inclusion of peas in dairy cow diets on ruminal fermentation, digestibility, and nitrogen losses. *Animal Feed Science and Technology* 150, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2008.08.009>
- Yu, P., Goelema, J.O., Tamminga, S., 1999. Determination of optimal conditions of pressure toasting on legume seeds for dairy feed industry: I. Effects of pressure toasting on nutritive values of *Lupinus albus* in lactating dairy cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 12, 1205–1214.

Table 1: Descriptive statistics of the main variables of interest in the *in situ* database concerning proteaginous seeds and soybean meal whatever the treatment.

	n	Mean	sd <sup>1</sup>	Min	Max
<b>CP content (g/kg DM)</b>					
Faba bean	57	308	45	246	471
Lupin	111	361	42	283	513
Pea	21	248	17	215	268
Soybean meal	18	503	18	478	541
<b>ED<sub>6</sub>_N (g/g)</b>					
Faba bean	63	0.720	0.134	0.434	0.937
Lupin	112	0.683	0.154	0.370	0.954
Pea	41	0.676	0.129	0.428	0.910
Soybean meal	14	0.600	0.087	0.400	0.769
<b>dr_N (g/g)</b>					
Faba bean	27	0.889	0.082	0.642	0.982
Lupin	24	0.899	0.130	0.500	0.969
Pea	16	0.959	0.029	0.870	0.992
Soybean meal	5	0.970	0.14	0.956	0.987
<b>PIA<sub>6</sub> (g/kg DM)</b>					
Faba bean	45	66	42	19	173
Lupin	94	113	60	17	353
Pea	19	80	36	29	153
Soybean meal	16	208	92	120	499
<b>PDIA<sub>6</sub> (g/kg DM)</b>					
Faba bean	11	58	51	14	170
Lupin	7	91	55	14	171
Pea	4	89	40	48	132
Soybean meal	1	122	-	-	-

<sup>1</sup> standard deviation

Table 2: Mean characteristics of variables of interest analyzed in the *in vivo* database, concerning diets including proteaginous seeds (PS) and soybean meal (SBM) whatever the treatment.

	n	Mean	sd <sup>1</sup>	Min	Max
<b>CP in diet (g/kg) DM</b>					
Faba bean	23	166	13	140	186
Lupin	20	173	18	145	204
Pea	14	154	10	134	169
Soybean meal	19	162	16	138	203
<b>CP provided by SBM or PS (g/100 g dietary CP)</b>					
Faba bean	19	39.7	12.3	13.6	53.4
Lupin	10	38.9	10.9	22.0	50.0
Pea	3	39.4	14.3	22.9	47.7
Soybean meal	9	38.3	6.9	26.8	49.5
<b>DMI (kg/d)</b>					
Faba bean	27	20.7	3.0	16.8	26.0
Lupin	30	20.1	2.0	15.4	23.9
Pea	15	19.3	5.1	8.1	26.3
Soybean meal	26	19.9	4.3	7.8	25.9
<b>Ruminal NH<sub>3</sub> (mg/L)</b>					
Faba bean	20	172.4	42.4	110.5	268.4
Lupin	7	165.1	31.0	125.0	194.2
Pea	9	157.8	38.5	119.0	223.4
Soybean meal	11	139.8	21.8	103.9	168.6
<b>Ruminal total VFA (mmol/L)</b>					
Faba bean	20	105.7	15.6	74.0	129.5
Lupin	7	106.4	5.2	101.0	114.1
Pea	6	96.6	7.9	86.2	104.6
Soybean meal	10	103.2	10.7	83.4	123.0
<b>Ruminal acetate/propionate (mol/mol)</b>					
Faba bean	20	3.3	0.8	1.7	4.9
Lupin	7	2.9	0.1	2.7	3.1
Pea	6	3.9	0.5	3.0	4.5
Soybean meal	10	2.9	0.6	1.6	3.7
<b>Ruminal BC-VFA<sup>2</sup> (% mol of total VFA)</b>					
Faba bean	15	2.4	0.8	0.9	3.6
Lupin	7	2.7	0.4	2.3	3.5
Pea	3	2.5	0.3	2.3	2.9
Soybean meal	9	2.3	0.7	1.0	3.4
<b>Rumen protein balance (g/kg DMI)</b>					
Faba bean	10	18.8	21.7	-22.6	51.0
Lupin	2	5.0	28.3	-15.0	25.1
Pea	1	48.8	-	-	-

## Resultats

Soybean meal	1	47.0	-	-	-
Non-NH <sub>3</sub> N duodenal flow (g/d)					
Faba bean	6	194.6	149.8	94.5	408.7
Lupin	2	414.4	81.0	357.1	471.7
Pea	4	214.9	126.6	136.0	401.7
Soybean meal	1	383.3	-	-	-
Microbial N duodenal flow (g/d)					
Faba bean	2	205.2	15.6	194.2	216.2
Lupin	2	206.1	3.1	203.9	208.3
Pea	4	123.8	88.5	68.0	254.1
Soybean meal	1	221.4	-	-	-
NANM N duodenal flow <sup>3</sup> (g/d)					
Faba bean	2	182.4	14.5	172.1	192.6
Lupin	2	208.2	77.9	153.1	263.3
Pea	4	91.2	38.1	68.0	147.6
Soybean meal	1	161.9	-	-	-
Milk yield (kg/d)					
Faba bean	27	26.9	5.0	19.1	36.0
Lupin	28	29.5	4.2	23.9	37.7
Pea	15	28.3	6.1	19.6	35.6
Soybean meal	29	27.4	5.5	20.2	37.9
Milk fat content (g/kg)					
Faba bean	27	37.5	6.0	24.5	46.1
Lupin	28	36.7	4.2	27.0	43.0
Pea	15	36.0	3.4	28.5	40.8
Soybean meal	29	36.1	3.8	23.3	42.6
Milk protein content (g/kg)					
Faba bean	27	32.6	2.7	28.1	37.5
Lupin	28	30.0	1.6	27.0	33.7
Pea	15	31.6	1.9	28.6	35.1
Soybean meal	29	32.3	2.0	29.1	35.3
Milk urea (mg/L)					
Faba bean	17	230.8	53.9	123.0	329.3
Lupin	7	262.4	134.9	102.0	416.0
Pea	7	239.0	67.1	154.0	322.9
Soybean meal	11	267.6	88.9	148.0	403.0
N intake (g/d)					
Faba bean	30	485.4	181.7	110.7	714.2
Lupin	24	565.3	86.0	394.2	717.6
Pea	13	530.2	94.6	343.0	656.0
Soybean meal	22	542.9	85.8	383.0	673.4
N in milk (g/d)					
Faba bean	27	143.9	28.0	94.6	201.3
Lupin	28	145.2	19.6	112.4	185.4

## Résultats

Pea	15	147.4	31.9	94.8	196.3
Soybean meal	29	145.3	26.3	112.4	206.2
N in urine (g/d)					
Faba bean	12	165.3	47.7	86.0	232.0
Lupin	3	127.7	5.9	120.9	132.1
Pea	7	183.6	58.8	100.0	256.0
Soybean meal	7	179.8	51.2	122.0	238.0
N in feces (g/d)					
Faba bean	16	155.9	78.4	31.9	237.3
Lupin	3	154.9	8.5	147.9	164.4
Pea	7	168.3	26.1	136.0	201.0
Soybean meal	7	180.3	23.7	156.0	224.0
N balance (g/d)					
Faba bean	12	37.6	32.1	-8.4	93.7
Lupin	3	36.9	8.4	29.3	46.0
Pea	7	28.1	27.2	-3.8	67.7
Soybean meal	7	23.7	25.7	-10.4	58.8
N in milk / N intake ratio					
Faba bean	24	0.27	0.03	0.23	0.32
Lupin	22	0.26	0.04	0.20	0.34
Pea	13	0.28	0.03	0.22	0.34
Soybean meal	22	0.28	0.04	0.22	0.34

<sup>1</sup> standard deviation

<sup>2</sup> branched-chain VFA (isobutyrate and isovalerate)

<sup>3</sup> non-NH<sub>3</sub> and non-microbial N duodenal flow

Table 3: Description of cow milk production and diets in the *in vivo* database.

	n	Mean	sd <sup>1</sup>	Min	Max
Cows					
Days in milk (d)	92	93.7	45.0	21	200
Initial milk yield (kg/d)	49	31.5	4.7	21.6	41
Main forage offered (g/100 g dietary DM)	110	41.5	15.5	17.9	84.0
Maize silage	59	41.3	15.0	17.9	74.6
Grass silage	23	44.2	18.8	25.0	84.0
Hay	23	44.1	2.4	25.0	70.0
Straw	3	24.4	0.2	24.3	24.6
Cut grass	2		<i>Ad libitum</i>		
Concentrate (g/100 g dietary DM)	96	42.8	14.2	16.1	75.7

<sup>1</sup> standard deviation

## Résultats

Table 4: *In situ* parameters and protein value of raw or treated proteaginous seeds (PS) compared to soybean meal (SBM).

PS	Treatment	Variable (unit)	n	Mean SBM	Mean PS	$\Delta$ PS - SBM <sup>1</sup>	SE <sup>2</sup> $\Delta$	P-value	
Faba bean	Raw	CP (g/kg DM)	10	500	297	-203	9.4	<0.001	
		ED <sub>6</sub> _N (g/g)	10	0.629	0.787	0.153	0.023	<0.001	
		PIA <sub>6</sub> (g/kg DM)	10	185	64	-121	7.4	<0.001	
		dr_N (g/g)	2	0.956	0.684	-0.273	0.042	0.096	
		PDIA <sub>6</sub> (g/kg DM)	2	156	24	-131	4.8	0.023	
	Extrusion	CP (g/kg DM)	5	521	299	-222	7.0	<0.001	
		ED <sub>6</sub> _N (g/g)	5	0.687	0.678	-0.009	0.090	<0.001	
		PIA <sub>6</sub> (g/kg DM)	5	163	96	-67	3.4	<0.001	
		dr_N (g/g)	5	0.956	0.915	-0.041	0.013	0.038	
		PDIA <sub>6</sub> (g/kg DM)	5	156	88	-68	4.0	<0.001	
	Autoclaving	CP (g/kg DM)	1	478	341	-138	-	-	
		ED <sub>6</sub> _N (g/g)	3	0.543	0.549	0.006	0.045	0.905	
		PIA <sub>6</sub> (g/kg DM)	1	201	171	-29	-	-	
	Lupin	Raw	CP (g/kg DM)	10	503	356	-147	17.7	<0.001
			ED <sub>6</sub> _N (g/g)	9	0.593	0.773	0.181	0.044	0.003
PIA <sub>6</sub> (g/kg DM)			9	206	83	-123	21.6	<0.001	
dr_N(g/g)			2	0.964	0.752	-0.213	0.070	0.201	
PDIA <sub>6</sub> (g/kg DM)			1	156	16	-139	-	-	
Extrusion		CP (g/kg DM)	4	515	367	-147	27.6	0.013	
		ED <sub>6</sub> _N (g/g)	3	0.644	0.700	0.557	0.074	0.529	
		PIA <sub>6</sub> (g/kg DM)	3	185	111	-74	23.6	0.089	
		dr_N (g/g)	3	0.961	0.961	-0.001	0.008	0.940	
		PDIA <sub>6</sub> (g/kg DM)	2	156	109	-47	2.9	0.039	
Autoclaving		CP (g/kg DM)	1	478	407	-71	-	-	

## Résultats

		ED <sub>6</sub> _N (g/g)	3	0.543	0.450	-0.093	0.025	0.066
		PIA <sub>6</sub> (g/kg DM)	1	200	229	29	-	-
	Roasting	CP (g/kg DM)	2	525	362	-163	60.0	0.224
		ED <sub>6</sub> _N (g/g)	2	0.512	0.537	0.025	0.112	0.860
		PIA <sub>6</sub> (g/kg DM)	2	258	168	-90	86.9	0.487
Pea	Raw	CP (g/kg DM)	6	492	244	-248	11.2	<0.001
		ED <sub>6</sub> _N (g/g)	5	0.617	0.769	0.151	0.021	0.002
		PIA <sub>6</sub> (g/kg DM)	5	187	57	-130	8.0	<0.001
		dr_N (g/g)	1	0.972	0.870	-0.102	-	-
	Extrusion	dr_N (g/g)	1	0.972	0.991	0.019	-	-
	Autoclaving	CP (g/kg DM)	1	478	268	-211	-	-
		ED <sub>6</sub> _N (g/g)	1	0.561	0.428	-0.153	-	-
		PIA <sub>6</sub> (g/kg DM)	1	201	153	-48	-	-

<sup>1</sup> difference between proteaginous seed (PS) and soybean meal (SBM)

<sup>2</sup> standard error

Table 5: *In situ* parameters and protein value of raw proteaginous seeds (PS) compared to treated PS

PS	Treatment	Variable (unit)	n	Mean raw	Mean treated	$\Delta$ Treated – raw <sup>1</sup>	SE <sup>2</sup> $\Delta$	P-value	
Faba bean	Extrusion	CP (g/kg DM)	13	307	322	15	4.9	0.009	
		ED <sub>6</sub> _N (g/g)	14	0.876	0.765	-0.111	0.025	0.001	
		PIA <sub>6</sub> (g/kg DM)	12	33	67	34	8.7	0.002	
		dr_N (g/g)	7	0.735	0.913	0.179	0.034	0.002	
		PDIA <sub>6</sub> (g/kg DM)	6	24	87	62	5.2	<0.001	
	Autoclaving	CP (g/kg DM)	1	341	341	0	-	-	
		ED <sub>6</sub> _N (g/g)	1	0.721	0.497	-0.224	-	-	
		PIA <sub>6</sub> (g/kg DM)	1	95	171	76	-	-	
	Toasting/ roasting	CP (g/kg DM)	13	310	311	1	1.5	0.703	
		ED <sub>6</sub> _N (g/g)	33	0.737	0.644	-0.093	0.031	0.005	
		PIA <sub>6</sub> (g/kg DM)	12	124	121	-3	20.7	0.879	
		dr_N (g/g)	12	0.868	0.919	0.051	0.007	<0.001	
		PDIA <sub>6</sub> (g/kg DM)	2	59	157	99	12.9	0.083	
	Lupin	Extrusion	CP (g/kg DM)	20	372	382	10	3.9	0.020
			ED <sub>6</sub> _N (g/g)	19	0.931	0.776	-0.155	0.026	<0.001
PIA <sub>6</sub> (g/kg DM)			16	28	83	55	11.1	<0.001	
dr_N (g/g)			6	0.622	0.946	0.324	0.047	0.001	
PDIA <sub>6</sub> (g/kg DM)			2	16	109	92	2.9	0.020	
Autoclaving		CP (g/kg DM)	1	407	407	0	-	-	
		ED <sub>6</sub> _N (g/g)	1	0.750	0.437	-0.313	-	-	
		PIA <sub>6</sub> (g/kg DM)	1	102	229	128	-	-	
Toasting/ roasting		CP (g/kg DM)	37	355	357	3	1.8	0.169	
		ED <sub>6</sub> _N (g/g)	47	0.773	0.611	-0.161	0.016	<0.001	
		PIA <sub>6</sub> (g/kg DM)	37	83	135	52	6.9	<0.001	
		dr_N (g/g)	12	0.938	0.956	0.018	0.001	<0.001	
		PDIA <sub>6</sub> (g/kg DM)	2	72	165	93	5.9	0.040	
Cooking		CP (g/kg DM)	1	302	304	2	-	-	

## Résultats

		ED <sub>6</sub> _N (g/g)	1	0.938	0.903	-0.035	-	-
		PIA <sub>6</sub> (g/kg DM)	1	19	30	11	-	-
	Tanning	CP (g/kg DM)	1	302	283	-19	-	-
		ED <sub>6</sub> _N (g/g)	1	0.938	0.867	-0.071	-	-
		PIA <sub>6</sub> (g/kg DM)	1	19	38	19	-	-
Pea	Extrusion	CP (g/kg MS)	4	237	237	0	2.5	0.904
		ED <sub>6</sub> N (g/g)	7	0.782	0.708	-0.074	0.046	0.159
		PIA <sub>6</sub> (g/kg DM)	3	29	76	47	4.8	0.010
		dr_N (g/g)	1	0.870	0.991	0.121	-	-
	Autoclaving	CP (g/kg DM)	1	268	268	0	-	-
		ED <sub>6</sub> _N (g/g)	1	0.751	0.428	-0.323	-	-
		PIA <sub>6</sub> (g/kg DM)	1	67	153	86	-	-
	Toasting	CP (g/kg DM)	2	261	261	0	0	-
		ED <sub>6</sub> _N (g/g)	11	0.783	0.593	-0.190	0.027	<0.001
		PIA <sub>6</sub> (g/kg DM)	2	66	126	60	10.3	0.017
		dr_N (g/g)	11	0.932	0.964	0.033	0.004	<0.001
		PDIA <sub>6</sub> (g/kg DM)	2	63	123	60	9.7	0.103
	Expansion	ED <sub>6</sub> _N (g/g)	2	0.604	0.536	-0.068	0.021	0.191
	Tanning	ED <sub>6</sub> _N (g/g)	2	0.910	0.895	-0.014	0.004	0.195

<sup>1</sup> difference between treated proteaginous seed (PS) raw PS

<sup>2</sup> standard error

Table 6: Effects of replacing soybean meal (SBM) by raw or treated faba bean seed on *in vivo* parameters in dairy cows

Treatment	Variable (unit)	n	Mean SBM	Mean PS	$\Delta$ PS – SBM <sup>1</sup>	SE <sup>2</sup> $\Delta$	P-value
Raw	Diet CP (g/kg DM)	8	159	159	0	0.4	0.718
	CP provided by SBM or PS (g/100 g CP)	4	35	41	6	2.8	0.104
	DM intake (kg/d)	10	20.4	20.4	0.0	0.07	0.875
	NH <sub>3</sub> (mg/L)	8	144.9	161.6	16.7	6.59	0.039
	Total VFA (mmol/L)	8	105.4	98.6	-6.8	2.61	0.036
	Acetate/propionate (mol/mol)	8	2.7	2.9	0.2	0.10	0.052
	BC-VFA <sup>3</sup> (mol/100 mol VFA)	5	2.3	2.5	0.2	0.10	0.079
	Milk yield (kg/d)	10	26.8	26.3	-0.5	0.23	0.079
	Milk fat (g/kg)	10	33.3	33.9	0.6	0.67	0.424
	Milk protein (g/kg)	10	33.2	32.6	-0.7	0.23	0.018
	Milk urea (mg/L)	2	217.0	187.0	-30.0	4.00	0.084
	N intake (g/d)	9	522.8	519.8	-3.0	3.13	0.370
	N milk (g/d)	10	146.4	141.6	-4.8	1.00	0.001
	N urine (g/d)	4	182.6	179.5	-3.1	4.96	0.572
	N feces (g/d)	4	197.9	194.4	-3.5	2.79	0.296
	N balance (g/d)	4	2.9	10.1	7.2	3.12	0.104
	N milk/N intake (g/100 g)	9	28.6	28.0	-0.7	0.24	0.026
Extrusion	Diet CP (g/kg DM)	2	144	144	0	4.3	0.953
	CP provided by SBM or PS (g/100 g CP)	2	40	48	8	0.5	0.039
	DM intake (kg/d)	2	21.6	21.8	0.3	0.11	0.256
	NH <sub>3</sub> (mg/L)	2	112.0	131.0	19.0	5.00	0.164
	Total VFA (mmol/L)	2	101.0	102.0	1.0	7.00	0.910
	Acetate/propionate (mol/mol)	2	3.1	3.1	0.08	0.17	0.713
	BC-VFA <sup>3</sup> (mol/100 mol VFA)	2	2.6	2.2	-0.4	0.13	0.183
	Milk yield (kg/d)	2	29.7	30.2	0.5	1.30	0.778

## Résultats

	Milk fat (g/kg)	2	31.6	29.7	-1.8	1.16	0.359
	Milk protein (g/kg)	2	30.6	29.1	-1.5	0.26	0.107
	Milk urea (mg/L)	2	177.0	129.0	-48.0	6.00	0.079
	N intake (g/d)	2	499.9	506.5	6.6	19.70	0.794
	N milk (g/d)	2	146.5	144.1	-2.4	5.28	0.729
	N urine (g/d)	2	148.5	155.7	7.2	4.28	0.343
	N feces (g/d)	2	184.7	180.6	-4.1	0.80	0.123
	N balance (g/d)	2	20.3	26.1	5.8	11.00	0.688
	N milk/N intake (g/100 g)	2	29.3	28.5	-0.9	0.06	0.047
Steam	Milk yield (kg/d)	2	21.2	21.3	0.1	0.08	0.425
cooking	Milk fat (g/kg)	2	38.4	37.5	-0.9	1.20	0.590
	Milk protein (g/kg)	2	34.5	33.8	-0.7	0.10	0.090
	Milk urea (mg/L)	2	309.7	281.9	-27.8	11.40	0.246
	N milk (g/d)	2	120.4	119.6	-0.8	0.83	0.500

<sup>1</sup> difference between proteaginous seed (PS) and soybean meal (SBM)

<sup>2</sup> standard error

<sup>3</sup> branched-chain VFA (isobutyrate and isovalerate)

Table 7: Effects of replacing soybean meal (SBM) by raw or treated lupin seed on *in vivo* parameters in dairy cows.

Treatment	Variable (unit)	n	Mean SBM	Mean PS	$\Delta$ PS – SBM <sup>1</sup>	SE <sup>2</sup> $\Delta$	P-value
Raw	Diet CP (g/kg DM)	9	176	173	-3	3.1	0.389
	CP provided by SBM or PS (g/100 g CP)	4	41	40	-2	3.5	0.656
	DM intake (kg/d)	13	20.5	20.4	-0.2	0.34	0.658
	NH <sub>3</sub> (mg/L)	2	144.3	165.4	21.1	1.07	0.032
	Total VFA (mmol/L)	2	111.0	106.1	-5.0	1.05	0.133
	Acetate/propionate (mol/mol)	2	2.9	2.9	0.03	0.07	0.706
	BC-VFA <sup>3</sup> (mol/100 mol VFA)	2	2.4	2.5	0.0	0.13	0.852
	Milk yield (kg/d)	13	28.5	28.8	0.3	0.35	0.400
	Milk fat (g/kg)	13	36.5	37.1	0.6	0.53	0.266
	Milk protein (g/kg)	13	31.2	30.0	-1.2	0.20	<0.001
	Milk urea (mg/L)	3	325.0	303.7	-21.3	17.20	0.340
	N intake (g/d)	11	577.7	574.6	-3.1	11.90	0.799
	N milk (g/d)	13	146.2	142.6	-3.5	2.11	0.119
	N urine (g/d)	1	139.0	132.0	-7.2	-	-
	N feces (g/d)	1	171.0	148.0	-22.6	-	-
	N balance (g/d)	1	40.0	36.0	-4.1	-	-
N milk/N intake (g/100 g)	11	26.2	26.0	-0.2	-	-	
Extrusion	Diet CP (g/kg DM)	3	145	150	5	0.8	0.030
	CP provided by SBM or PS (g/100 g CP)	2	40	43	3	0.3	0.060
	DM intake (kg/d)	4	20.5	19.4	-1.1	0.42	0.077
	NH <sub>3</sub> (mg/L)	2	120.0	129.0	9.0	4.00	0.266
	Total VFA (mmol/L)	2	108.0	101.0	-7.0	0	-
	Acetate/propionate (mol/mol)	2	2.7	2.9	0.2	0.12	0.337
	BC-VFA <sup>3</sup> (mol/100 mol VFA)	2	2.5	2.3	-0.2	0.02	0.051

## Résultats

	Milk yield (kg/d)	4	29.2	30.7	1.5	0.72	0.135
	Milk fat (g/kg)	4	34.4	31.2	-3.2	1.47	0.119
	Milk protein (g/kg)	4	30.5	28.4	-2.2	0.07	<0.001
	Milk urea (mg/L)	2	178.0	111.0	-67.0	9.00	0.085
	N intake (g/d)	3	503.2	484.3	-18.9	16.80	0.378
	N milk (g/d)	4	146.1	143.2	-2.9	2.52	0.339
	N urine (g/d)	2	139.3	125.5	-13.8	4.55	0.202
	N feces (g/d)	2	170.5	158.4	-12.2	6.02	0.293
	N balance (g/d)	2	39.6	37.7	-2.0	8.35	0.854
	N milk/N intake (g/100 g)	3	30.8	31.2	0.5	0.36	0.310
Roasting	DM intake (kg/d)	2	23.7	22.5	-1.2	0.34	0.169
	NH <sub>3</sub> (mg/L)	1	168.6	194.2	25.6	-	-
	Total VFA (mmol/L)	1	114.0	114.1	0.1	-	-
	Acetate/propionate (mol/mol)	1	3.1	2.9	-0.2	-	-
	BC-VFA <sup>3</sup> (mol/100 mol VFA)	1	2.4	2.2	-0.2	-	-
	Milk yield (kg/d)	2	31.8	31.9	0.1	0.90	0.926
	Milk fat (g/kg)	2	37.8	38.0	0.2	0.95	0.900
	Milk protein (g/kg)	2	32.8	31.6	-1.2	-	-
	N intake (g/d)	2	611.2	584.8	-26.4	-	-
	N milk (g/d)	2	168.3	162.5	-5.8	-	-
	N milk/N intake (g/100 g)	2	27.6	28.1	0.5	-	-
Tanning	DM intake (kg/d)	1	18.2	18.6	0.4	-	-
	Milk yield (kg/d)	1	25.2	26.9	1.7	-	-
	Milk fat (g/kg)	1	42.6	41.1	-1.5	-	-
	Milk protein (g/kg)	1	30.2	29.6	-0.6	-	-
	N milk (g/d)	1	125.6	130.7	5.1	-	-

<sup>1</sup> difference between proteaginous seed (PS) and soybean meal (SBM)

<sup>2</sup> standard error

<sup>3</sup> branched-chain VFA (isobutyrate and isovalerate)

Table 8: Effects of replacing soybean meal (SBM) by raw or treated pea seed on *in vivo* parameters in dairy cows.

Treatment	Variable (unit)	n	Mean SBM	Mean PS	$\Delta$ PS – SBM <sup>1</sup>	SE <sup>2</sup> $\Delta$	P-value
Raw	Diet CP (g/kg DM)	8	160	158	-2	5.4	0.779
	CP provided by SBM or PS (g/100 g CP)	3	37	39	2	11.4	0.857
	DM intake (kg/d)	8	22.0	21.8	-0.2	0.38	0.616
	NH <sub>3</sub> (mg/L)	4	125.5	153.7	28.1	6.24	0.020
	Total VFA (mmol/L)	3	99.5	102.5	2.9	1.79	0.243
	Acetate/propionate (mol/mol)	3	3.3	3.4	0.2	0.11	0.267
	BC-VFA <sup>3</sup> (mol/100 mol VFA)	3	2.3	2.4	0.1	0.09	0.217
	Rumen protein balance (g/kg DMI)	1	47.0	48.8	1.8	-	-
	Non-NH <sub>3</sub> N duodenal flow (g/d)	1	383.3	401.7	18.4	-	-
	Microbial N duodenal flow (g/d)	1	221.4	254.1	32.7	-	-
	Non-NH <sub>3</sub> non-microbial N duodenal flow (g/d)	1	161.9	147.6	-14.3	-	-
	Milk yield (kg/d)	8	30.6	29.4	-1.2	0.72	0.151
	Milk fat (g/kg)	8	37.2	37.2	0.0	0.50	0.903
	Milk protein (g/kg)	8	31.7	31.5	-0.2	0.13	0.170
	Milk urea (mg/L)	4	219.0	203.6	-15.5	33.20	0.673
	N intake (g/d)	8	563.0	555.2	-7.8	19.10	0.694
	N milk (g/d)	8	156.8	150.1	-6.7	3.58	0.104
	N urine (g/d)	4	213.0	223.5	10.5	14.30	0.515
	N feces (g/d)	4	170.0	177.0	7.0	11.20	0.578
	N balance (g/d)	4	40.8	29.8	-11.0	1.90	0.010
N milk/N intake (g/100 g)	8	28.0	27.1	-0.9	0.58	0.167	
Extrusion	Diet CP (g/kg DM)	2	161	154	-7	7.9	0.530
	DM intake (kg/d)	2	20.7	21.4	0.7	0.50	0.395
	NH <sub>3</sub> (mg/L)	1	143.8	136.3	-7.4	-	-

## Résultats

	Milk yield (kg/d)	2	34.1	34.5	0.5	0.65	0.614
	Milk fat (g/kg)	2	37.1	35.7	-1.4	0.15	0.070
	Milk protein (g/kg)	2	31.8	32.2	0.4	0.60	0.626
	Milk urea (mg/L)	1	186.2	234.2	48.1	-	-
	N intake (g/d)	2	540.9	585.7	44.8	37.20	0.441
	N milk (g/d)	2	176.5	182.3	5.8	0.83	0.090
	N urine (g/d)	1	148.0	180.0	32.0	-	-
	N feces (g/d)	1	196.0	181.0	-15.0	-	-
	N balance (g/d)	1	9.3	67.7	58.4	-	-
	N milk/N intake (g/100 g)	2	32.6	31.2	-1.4	1.81	0.582
Flaking	Milk yield (kg/d)	2	23.0	22.6	-0.4	0.24	0.364
	Milk fat (g/kg)	2	36.6	35.6	-1.0	0.55	0.307
	Milk protein (g/kg)	2	34.3	33.0	-1.3	0.30	0.144
	Milk urea (mg/L)	2	290.4	312.3	21.9	0.55	0.016
	N milk (g/d)	2	143.5	132.8	-10.7	2.47	0.144
Expansion	Diet CP (g/kg DM)	1	159	159	1	-	-
	DM intake (kg/d)	1	22.3	22.7	0.4	-	-
	NH <sub>3</sub> (mg/L)	1	143.8	138.2	-5.6	-	-
	Milk yield (kg/d)	1	34.4	34.4	-0.01	-	-
	Milk fat (g/kg)	1	36.7	36.0	-0.7	-	-
	Milk protein (g/kg)	1	34.0	33.2	-0.8	-	-
	N intake (g/d)	1	566.9	578.1	11.2	-	-
	N milk (g/d)	1	191.4	186.4	-5.0	-	-
	N milk/N intake (g/100 g)	1	33.8	32.2	-1.5	-	-

<sup>1</sup> difference between proteaginous seed (PS) and soybean meal (SBM)

<sup>2</sup> standard error

<sup>3</sup> branched-chain VFA (isobutyrate and isovalerate)

Table 9: Effects of replacing raw by treated faba bean seed on *in vivo* parameters in dairy cows.

Treatment	Variable (unit)	n	Mean raw	Mean treated	$\Delta$ Treated – raw <sup>1</sup>	SE <sup>2</sup> $\Delta$	P-value
Extrusion	Diet CP (g/kg DM)	6	160	161	1	1.6	0.430
	CP provided by faba bean (g/100 g CP)	6	24	24	0	0.3	0.223
	DM intake (kg/d)	6	21.3	21.5	0.2	0.17	0.248
	NH <sub>3</sub> (mg/L)	6	168.3	160.0	-8.3	9.37	0.418
	Total VFA (mmol/L)	6	109.5	112.9	3.4	2.25	0.191
	Acetate/propionate (mol/mol)	6	3.1	3.2	0.1	0.09	0.449
	BC-VFA <sup>3</sup> (mol/100 mol VFA)	6	2.6	2.1	-0.5	0.06	0.001
	Rumen protein balance (g/kg DMI)	1	-3.5	-22.6	-19.2	-	-
	Non-NH <sub>3</sub> N duodenal flow (g/d)	1	365.5	408.7	43.2	-	-
	Microbial N duodenal flow (g/d)	1	194.2	216.2	22.0	-	-
	Non-NH <sub>3</sub> non-microbial N duodenal flow (g/d)	1	172.1	192.6	20.5	-	-
	Milk yield (kg/d)	5	30.2	31.2	1.0	0.48	0.106
	Milk fat (g/kg)	5	38.0	35.2	-2.7	0.73	0.020
	Milk protein (g/kg)	5	30.2	30.1	-0.2	0.11	0.211
	Milk urea (mg/L)	5	213.2	213.6	0.4	7.81	0.962
	N intake (g/d)	6	541.9	549.0	7.0	7.43	0.388
	N milk (g/d)	5	150.4	154.4	4.1	1.78	0.085
	N urine (g/d)	5	175.6	175.5	-0.1	3.08	0.977
	N feces (g/d)	5	213.8	209.9	-3.9	3.66	0.344
	N balance (g/d)	5	43.1	60.6	17.5	11.50	0.204
N milk/N intake (g/100 g)	5	26.1	26.4	0.3	0.29	0.360	
Toasting/ roasting	Diet CP (g/kg DM)	4	181	179	-2	1.5	0.267
	CP provided by faba bean (g/100 g CP)	4	28	25	-3	2.1	0.310
	DM intake (kg/d)	4	21.4	21.3	-0.1	0.04	0.092

## Résultats

	NH <sub>3</sub> (mg/L)	2	227.7	209.5	-18.2	9.71	0.312
	Total VFA (mmol/L)	2	117.0	98.0	-19.0	9.00	0.282
	Acetate/propionate (mol/mol)	2	4.1	4.9	0.8	0.33	0.262
	Rumen protein balance (g/kg DMI)	4	29.8	23.7	-6.1	2.87	0.126
	Non-NH <sub>3</sub> N duodenal flow (g/d)	2	99.2	97.5	-1.8	0.59	0.205
	Milk yield (kg/d)	4	27.0	27.4	0.4	0.30	0.275
	Milk fat (g/kg)	4	46.1	44.5	-1.6	0.37	0.023
	Milk protein (g/kg)	4	35.6	35.4	-0.2	0.37	0.630
	Milk urea (mg/L)	4	234.2	238.6	4.4	10.50	0.707
	N intake (g/d)	6	455.0	447.0	-7.9	3.74	0.088
	N milk (g/d)	4	155.5	157.6	2.1	2.17	0.397
	N feces (g/d)	2	34.6	35.2	0.6	1.60	0.772
	N milk/N intake (g/100 g)	4	25.3	26.1	0.8	0.41	0.160
Tanning	DM intake (kg/d)	1	17.0	17.1	0.1	-	-
	Milk yield (kg/d)	1	20.4	19.8	-0.6	-	-
	Milk fat (g/kg)	1	32.5	32.6	0.1	-	-
	Milk protein (g/kg)	1	28.1	29.5	1.4	-	-
	N intake (g/d)	1	357.0	379.0	22.0	-	-
	N milk (g/d)	1	94.6	96.4	1.8	-	-
	N urine (g/d)	1	86.0	109.0	23.0	-	-
	N feces (g/d)	1	143.0	148.0	5.0	-	-
	N balance (g/d)	1	33.4	25.6	-7.8	-	-
	N milk/N intake (g/100 g)	1	26.5	25.4	-1.1	-	-

<sup>1</sup> difference between treated proteaginous seed (PS) and raw PS

<sup>2</sup> standard error

<sup>3</sup> branched-chain VFA (isobutyrate and isovalerate)

Table 10: Effects of replacing raw by treated lupin seed on *in vivo* parameters in dairy cows.

Treatment	Variable (unit)	n	Mean raw	Mean treated	$\Delta$ Treated – raw <sup>1</sup>	SE <sup>2</sup> $\Delta$	P-value
Extrusion	Diet CP (g/kg DM)	3	149	151	2	0.3	0.014
	CP provided by lupin (g/100 g CP)	3	44	46	1	0.6	0.195
	DM intake (kg/d)	5	18.8	18.6	-0.1	0.21	0.611
	NH <sub>3</sub> (mg/L)	3	157.7	145.9	-11.8	2.44	0.040
	Total VFA (mmol/L)	3	103.5	103.9	0.4	1.43	0.791
	Acetate/propionate (mol/mol)	3	2.8	2.9	0.1	0.08	0.215
	BC-VFA <sup>3</sup> (mol/100 mol VFA)	3	2.9	2.4	-0.5	0.07	0.022
	Rumen protein balance (g/kg DMI)	1	25.1	-15.0	-40.1	-	-
	Non-NH <sub>3</sub> N duodenal flow (g/d)	1	357.1	471.7	114.6	-	-
	Microbial N duodenal flow (g/d)	1	203.9	208.3	4.4	-	-
	Non-NH <sub>3</sub> non-microbial N duodenal flow (g/d)	1	153.1	263.3	110.2	-	-
	Milk yield (kg/d)	4	27.9	28.8	1.0	0.58	0.199
	Milk fat (g/kg)	4	37.0	32.3	-4.7	0.69	0.006
	Milk protein (g/kg)	4	28.9	28.9	-0.0	0.23	0.975
	Milk urea (mg/L)	3	209.0	193.0	-16.0	14.00	0.371
	N intake (g/d)	3	447.0	453.9	6.9	5.06	0.306
	N milk (g/d)	4	133.6	137.6	4.0	1.06	0.033
	N urine (g/d)	2	132.1	125.5	-6.6	4.55	0.383
	N feces (g/d)	2	147.9	158.4	10.5	6.02	0.333
	N balance (g/d)	3	-6.3	36.1	42.4	40.60	0.405
N milk/N intake (g/100 g)	2	30.9	31.0	0.1	0.23	0.774	
Expansion	Diet CP (g/kg DM)	1	177	177	0	-	-

## Résultats

	CP provided by lupin (g/100 g CP)	1	22	22	0	-	-
	DM intake (kg/d)	1	21.1	21.3	0.2	-	-
	Milk yield (kg/d)	1	32.6	35.2	2.6	-	-
	Milk fat (g/kg)	1	36.5	34.9	-1.6	-	-
	Milk protein (g/kg)	1	29.5	29.4	-0.1	-	-
	N intake (g/d)	1	597.6	603.2	5.6	-	-
	N milk (g/d)	1	158.7	170.7	12.1	-	-
	N milk/N intake (g/100 g)	1	26.6	28.3	1.8	-	-
Toasting/ roasting	Diet CP (g/kg DM)	1	204	204	0	-	-
	DM intake (kg/d)	3	22.1	21.7	-0.4	0.398	0.405
	NH <sub>3</sub> (mg/L)	1	190.8	194.2	3.4	-	-
	Total VFA (mmol/L)	1	110.1	114.1	4.0	-	-
	Acetate/Propionate (mol/mol)	1	3.1	2.9	-0.2	-	-
	BC-VFA <sup>3</sup> (mol/100 mol VFA)	1	2.3	2.2	-0.1	-	-
	Milk yield (kg/d)	3	28.8	29.8	1.0	0.79	0.322
	Milk fat (g/kg)	3	39.1	38.9	-0.2	0.32	0.597
	Milk protein (g/kg)	3	32.0	31.8	-0.3	0.15	0.208
	N intake (g/d)	3	618.1	608.6	-9.6	11.3	0.484
	N milk (g/d)	3	148.8	152.7	3.9	3.86	0.418
	N milk/N intake (g/100 g)	3	24.6	25.5	0.9	0.94	0.438
Tanning	DM intake (kg/d)	1	18.2	18.6	0.4	-	-
	Milk yield (kg/d)	1	25.4	26.9	1.5	-	-
	Milk fat (g/kg)	1	43.0	41.1	-1.9	-	-
	Milk protein (g/kg)	1	29.1	29.6	0.5	-	-
	N milk (g/d)	1	121.8	130.7	8.9	-	-

<sup>1</sup> difference between treated proteaginous seed (PS) and raw PS

<sup>2</sup> standard error

<sup>3</sup> branched-chain VFA (isobutyrate and isovalerate)

Table 11: Effects of replacing raw by treated pea seed on *in vivo* parameters in dairy cows

Treatment	Variable (unit)	n	Mean raw	Mean treated	$\Delta$ Treated – raw <sup>1</sup>	SE <sup>2</sup> $\Delta$	P-value	
Extrusion	Diet CP (g/kg DM)	3	154	151	-3	9.0	0.807	
	DM intake (kg/d)	2	21.6	21.4	-0.2	0.13	0.395	
	NH <sub>3</sub> (mg/L)	2	183.1	127.7	-55.4	13.8	0.155	
	Total VFA (mmol/L)	1	87.3	98.5	11.2	-	-	
	Acetate/propionate (mol/mol)	1	4.5	4.0	-0.5	-	-	
	Non-NH <sub>3</sub> N duodenal flow (g/d)	1	136.0	185.0	49.0	-	-	
	Microbial N duodenal flow (g/d)	1	68.0	104.0	36.0	-	-	
	Non-NH <sub>3</sub> non-microbial N duodenal flow (g/d)	1	68.0	81.0	13.0	-	-	
	Milk yield (kg/d)	2	34.3	34.6	-0.3	0.99	0.821	
	Milk fat (g/kg)	2	36.2	35.7	-0.5	0.75	0.656	
	Milk protein (g/kg)	2	31.7	32.2	0.6	0.35	0.361	
	Milk urea (mg/L)	1	222.2	234.2	12.0	-	-	
	N intake (g/d)	2	567.0	585.7	18.7	19.30	0.509	
	N milk (g/d)	2	177.4	182.3	5.0	3.30	0.374	
	N urine (g/d)	1	194.0	180.0	-14.0	-	-	
	N feces (g/d)	1	201.0	181.0	-20.0	-	-	
	N balance (g/d)	1	-2.6	67.7	70.4	-	-	
	N milk/N intake (g/100 g)	2	31.3	31.2	-0.1	1.54	0.968	
	Steam-flaking	Diet CP (g/kg DM)	1	134	140	6	-	-
		NH <sub>3</sub> (mg/L)	1	188.2	223.4	35.2	-	-
Total VFA (mmol/L)		1	87.3	86.2	-1.1	-	-	
Acetate/propionate (mol/mol)		1	4.5	4.4	-0.1	-	-	

## Résultats

Expanding	Diet CP (g/kg DM)	1	159	159	0	-	-
	DM intake (kg/d)	1	22.6	22.7	0.1	-	-
	NH <sub>3</sub> (mg/L)	1	178.0	138.2	-39.8	-	-
	Milk yield (kg/d)	1	34.2	34.4	0.2	-	-
	Milk fat (g/kg)	1	36.4	36.0	-0.4	-	-
	Milk protein (g/kg)	1	33.6	33.2	-0.4	-	-
	N intake (g/d)	1	575.1	578.1	3.0	-	-
	N milk (g/d)	1	188.1	186.4	-1.6	-	-
	N milk/N intake (g/100 g)	1	32.7	32.2	-0.5	-	-
Tanning	Diet CP (g/kg DM)	1	17	16	-1	-	-
	Milk yield (kg/d)	1	20.1	19.6	-0.5	-	-
	Milk fat (g/kg)	1	32.9	31.1	-1.8	-	-
	Milk protein (g/kg)	1	28.6	30.2	1.6	-	-
	N intake (g/d)	1	343.0	359.0	16.0	-	-
	N milk (g/d)	1	94.8	97.7	2.8	-	-
	N urine (g/d)	1	111.0	100.0	-11.0	-	-
	N feces (g/d)	1	141.0	148.0	7.0	-	-
	N balance (g/d)	1	-3.8	13.3	17.2	-	-
	N milk/N intake (g/100 g)	1	27.7	27.2	-0.4	-	-

<sup>1</sup> difference between treated proteaginous seed (PS) and raw PS

<sup>2</sup> standard error

Fig. 1. Prisma flow diagram

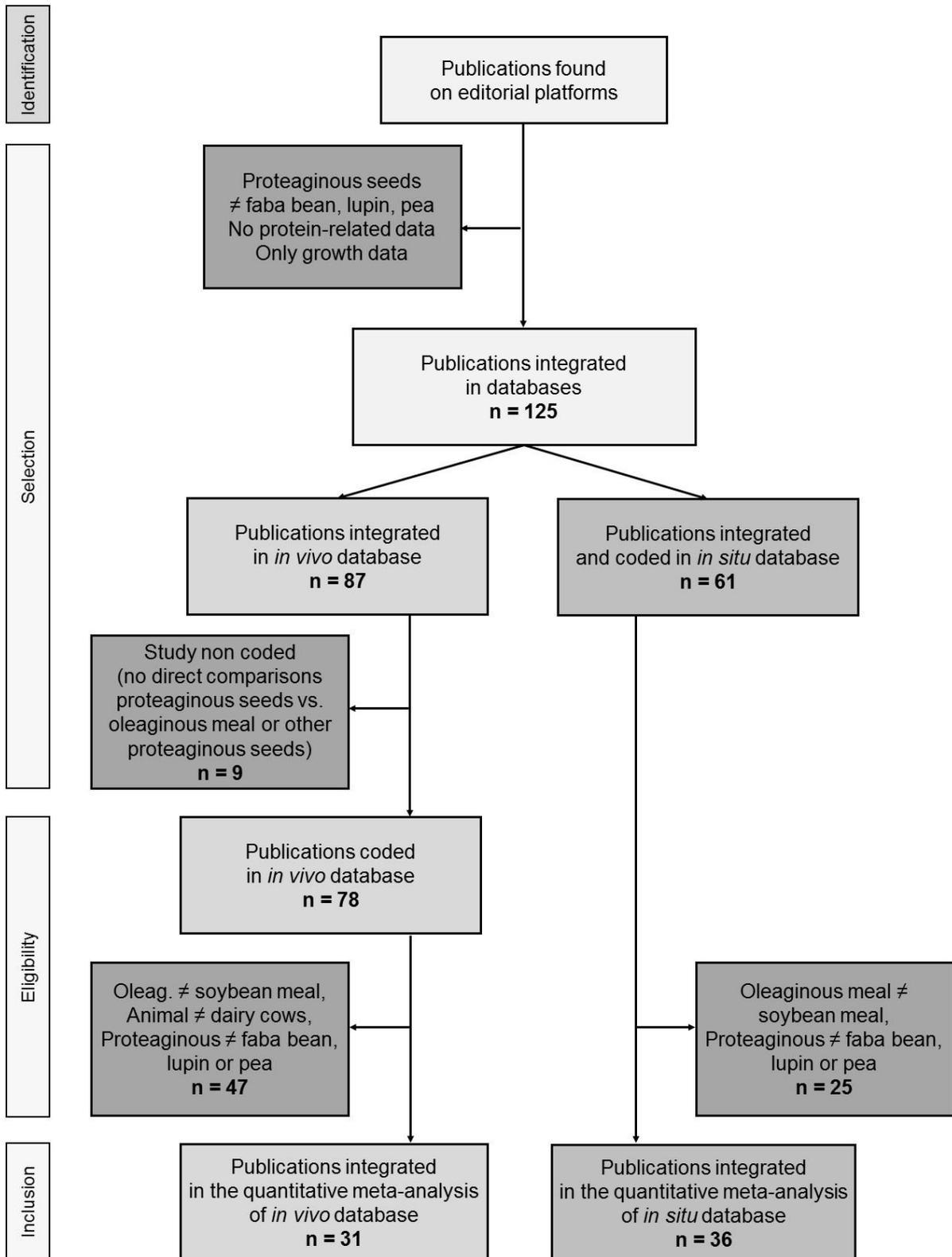


Fig 2. The variations in *in situ* effective degradability of N (ED<sub>6</sub>\_N) with raw or treated proteaginous seeds (PS) compared to soybean meal (SBM).

White dots represent each comparison within each publication, and black dots represent the average. Horizontal bars are standard error of the mean

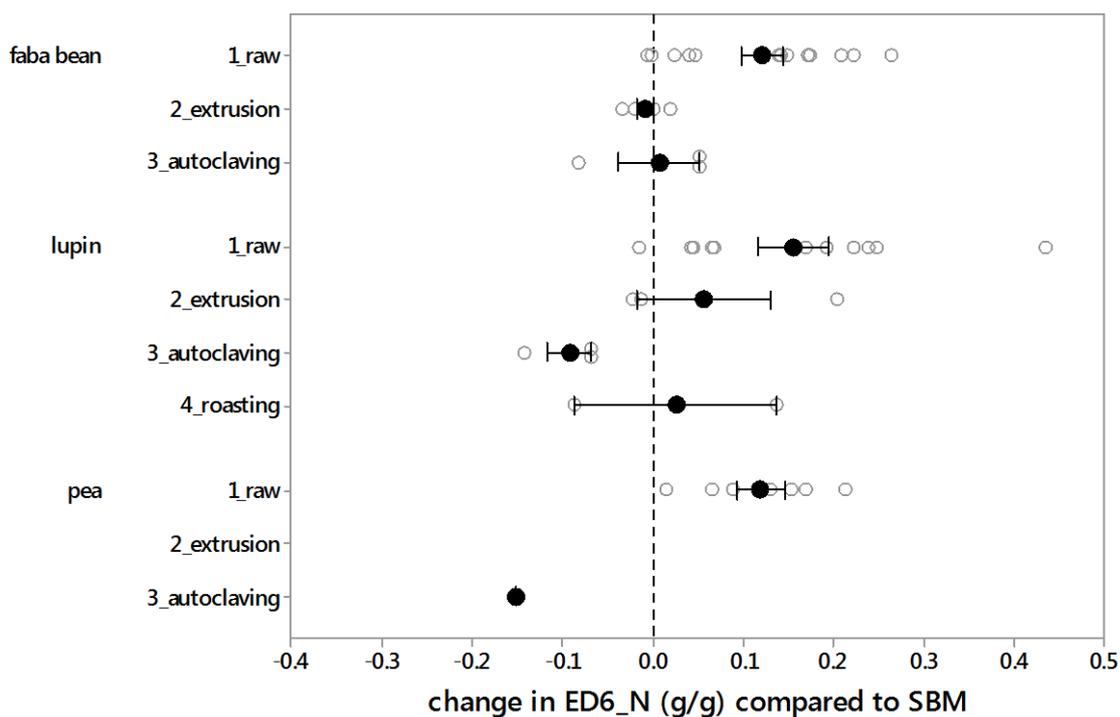


Fig 3. The variations in *in situ* effective degradability of N (ED<sub>6</sub>\_N) with treated proteaginous seeds (PS) compared to raw PS

White dots represent each comparison within each publication, and black dots represent the average. Horizontal bars are standard error of the mean

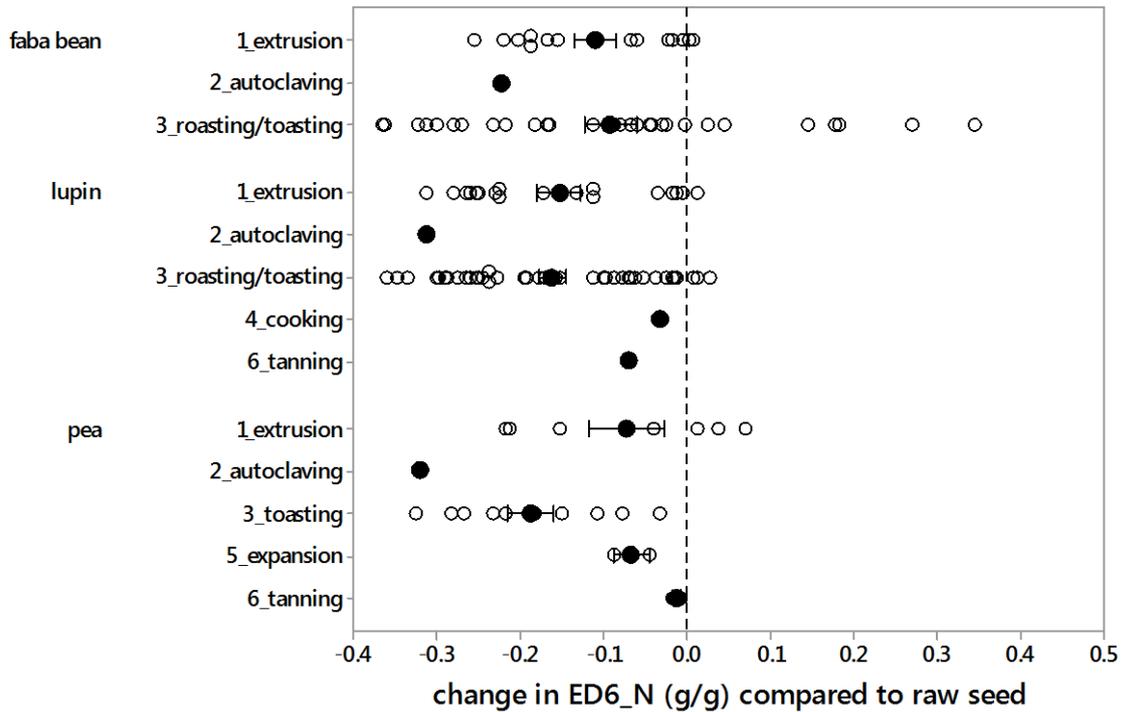


Fig 4. The variations of ammonia (NH<sub>3</sub>) in ruminal fluid with raw or treated proteaginous seeds (PS) compared to soybean meal (SBM)

White dots represent each comparison within each publication, and black dots represent the average. Horizontal bars are standard error of the mean

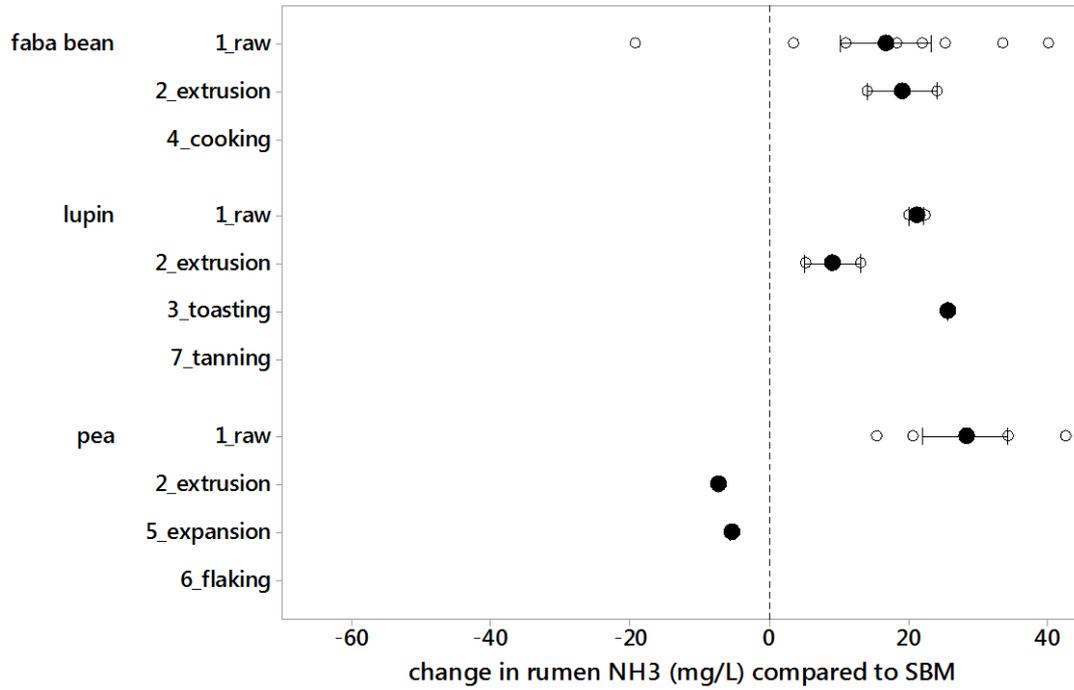


Fig 5. The variations of ammonia (NH<sub>3</sub>) in ruminal fluid with treated proteaginous seeds (PS) compared to raw PS

White dots represent each comparison within each publication, and black dots represent the average. Horizontal bars are standard error of the mean

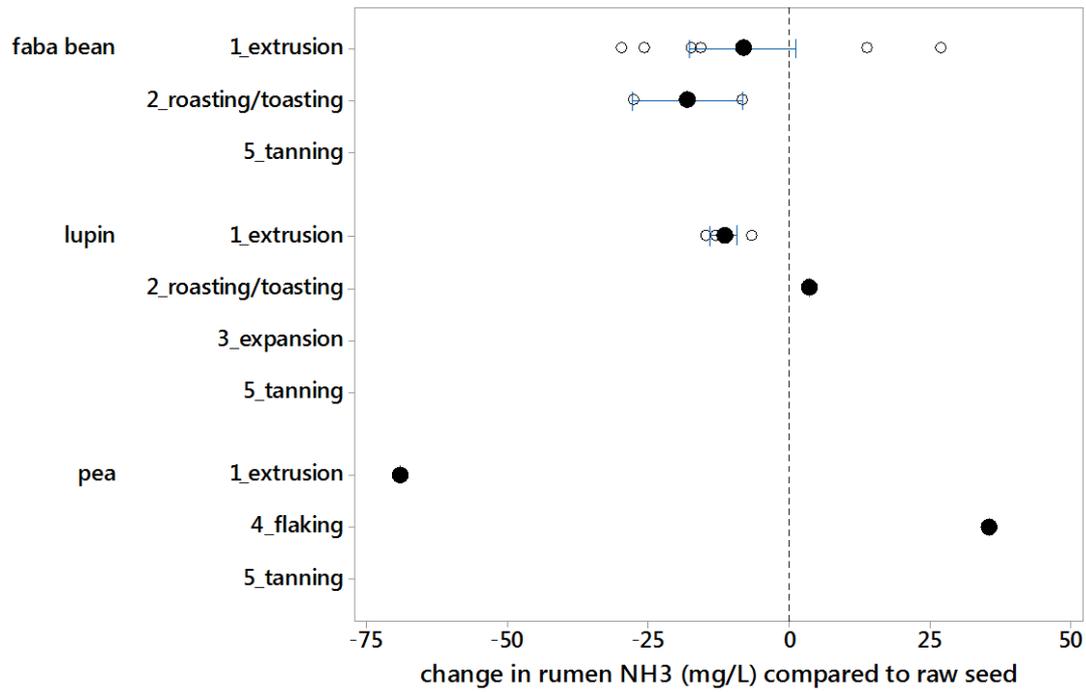


Fig 6. The variations in milk nitrogen secretion in dairy cows fed with raw or treated proteaginous seeds (PS) compared to soybean meal (SBM)

White dots represent each comparison within each publication, and black dots represent the average. Horizontal bars are standard error of the mean

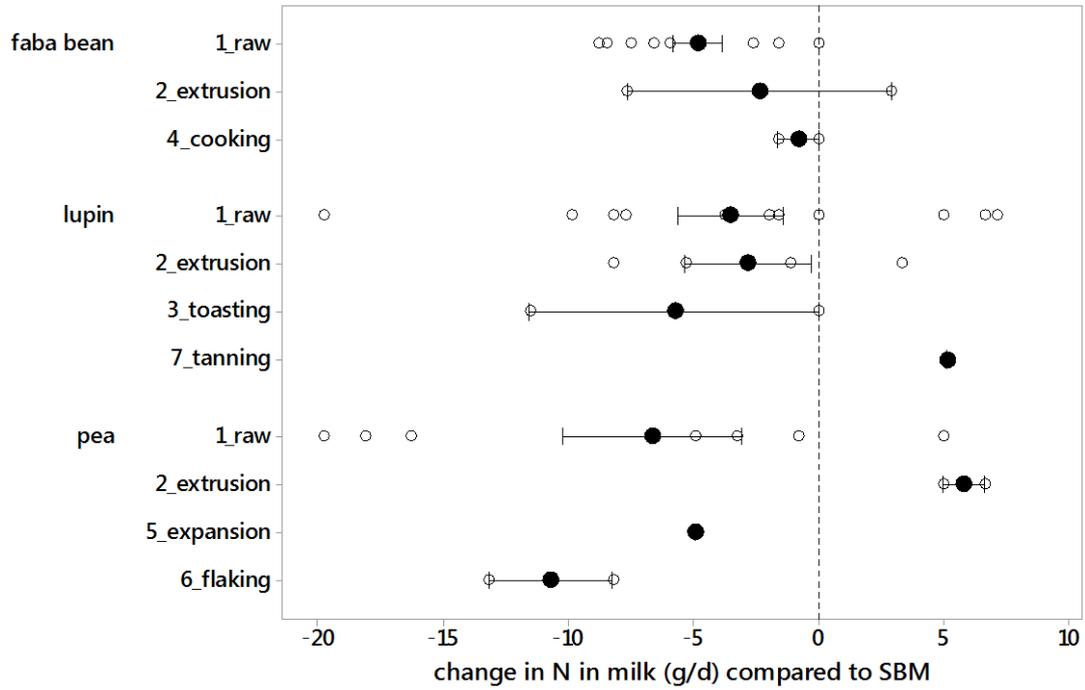


Fig 7. The variations in milk nitrogen secretion in dairy cows fed with treated proteaginous seeds (PS) compared to raw PS

White dots represent each comparison within each publication, and black dots represent the average. Horizontal bars are standard error of the mean

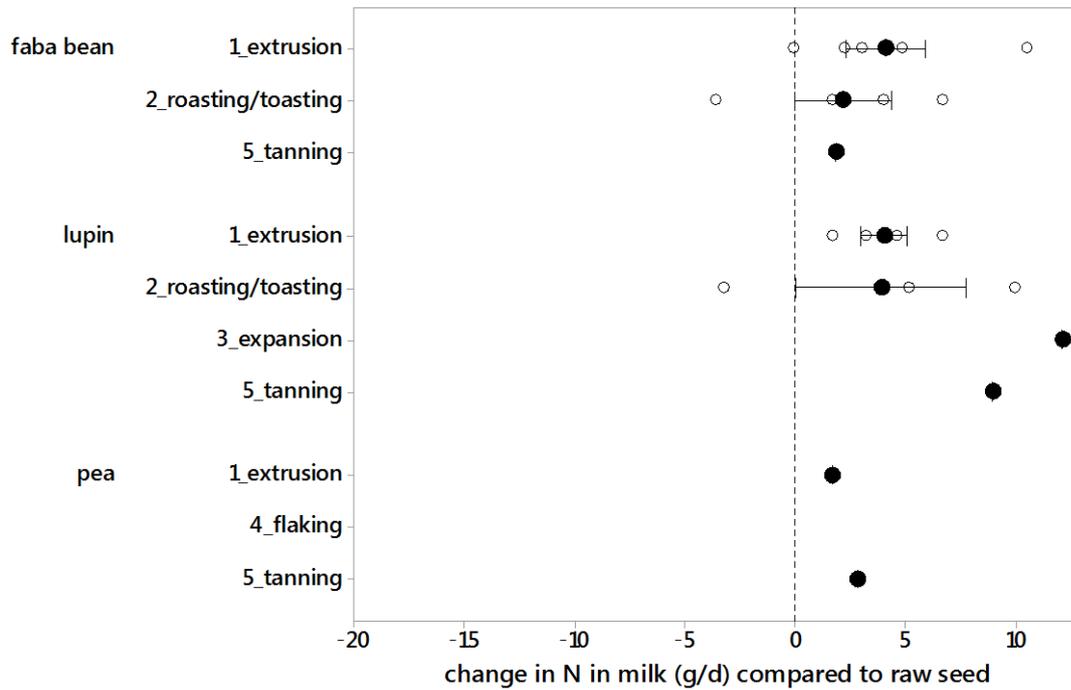


Fig 8. Within-experiment response law of NH<sub>3</sub> in ruminal fluid to iso-crude protein substitution of soybean meal (SBM) by raw proteaginous seeds (PS).  $Y=143+0.80X$ ;  $n=10$ ,  $n_{\text{exp}}=5$ ,  $\text{rmse}=5.7$ ;  $P=0.001$ . Data corrected for experiment effect, with experiment considered as fixed effect.

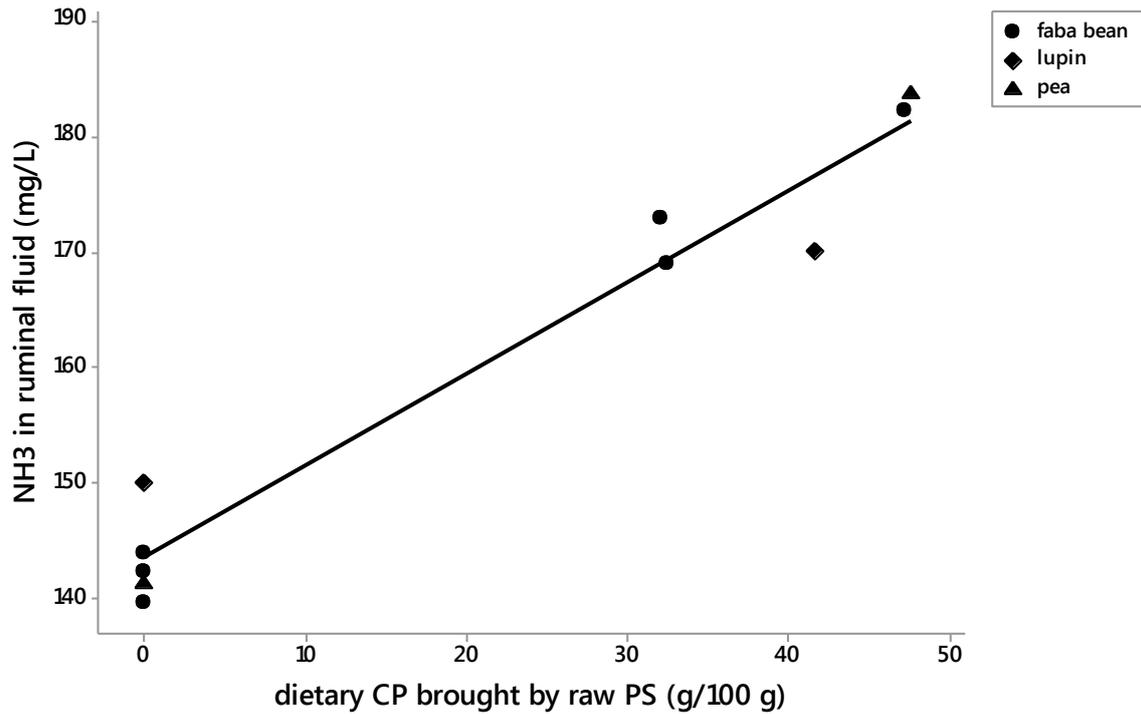
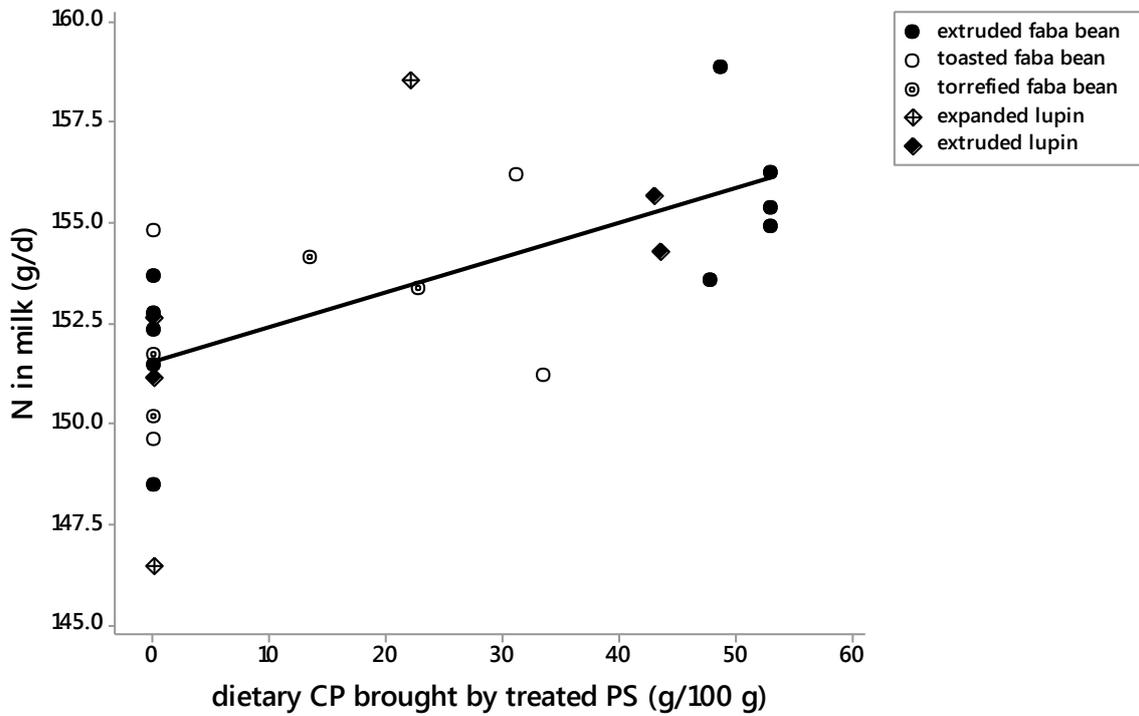


Fig 9. Within-experiment response law of N in milk to iso-crude protein substitution of raw by treated proteaginous seeds (PS).  $Y=152+0.086X$ ;  $n=24$ ,  $n_{exp}=12$ ,  $rmse=3.3$ ,  $P = 0.024$ . Data corrected for experiment effect, with experiment considered as fixed effect.



## Supplementary material

List of publications whose data are included in the databases analyzed in this work

### In situ database

Aguilera, J.F., Bustos, M., Molina, E., 1992. The degradability of legume seed meals in the rumen: effect of heat treatment. *Animal Feed Science and Technology* 36, 101–112.

Aufrère, J., Graviou, D., Melcion, J.P., Demarquilly, C., 2001. Degradation in the rumen of lupin (*Lupinus albus* L.) and pea (*Pisum sativum* L.) seed proteins: Effect of heat treatment. *Animal Feed Science and Technology* 92, 215–236.

Barchiesi-Ferrari, C., Anrique, R., 2011. Ruminant degradability of dry matter and crude protein from moist dehulled lupin and extruded rapeseed meal. *Chilean Journal of Agricultural Research* 71, 430.

Benchaar, C., Cros, P., Bayourthe, C., 1992. Effect of extruding horsebeans and lupin seeds on in situ rumen degradation and intestinal digestibility of seed protein in non lactating cows. Presented at the 1ère conférence européenne sur les protéagineux, Angers, pp. 501–502.

Benchaar, C., Moncoulon, R., Bayourthe, C., Vernay, M., 1994a. Effects of a supply of raw or extruded white lupin seeds on protein digestion and amino acid absorption in dairy cows. *Journal of Animal Science* 72, 492–501.

Benchaar, C., Vernay, M., Bayourthe, C., Moncoulon, R., 1994b. Effects of extrusion of whole horse beans on protein digestion and amino acid absorption in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 77, 1360–1371.

Chapoutot, P., Dhumez, O., Germain, A., Chesneau, G., 2016. Influence of extrusion on nitrogen degradability of faba bean or lupine blends including urea. Presented at the EAAP, Belfast.

Cherif, C., Hassanat, F., Claveau, S., Girard, J., Gervais, R., Benchaar, C., 2018. Faba bean (*Vicia faba*) inclusion in dairy cow diets: Effect on nutrient digestion, rumen fermentation,

- nitrogen utilization, methane production, and milk performance. *Journal of Dairy Science* 101, 8916–8928. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14890>
- Cros, P., 1992. Effet de la cuisson-extrusion sur la digestibilité des protéines des graines de soja, de lupin et de féverole. Etude in situ chez la vache laitière. Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse.
- Cros, P., Benchaar, C., Bayourthe, C., Vernay, M., Moncoulon, R., 1991a. In situ evaluation of the ruminal and intestinal degradability of extruded whole lupin seed nitrogen. *Reproduction Nutrition Development* 31, 575–583.
- Cros, P., Moncoulon, R., Bayourthe, C., Vernay, M., 1992. Effect of extrusion on ruminal and intestinal disappearance of amino acids in white lupin seed. *Canadian Journal of Animal Science* 72, 89–96.
- Cros, P., Vernay, M., Bayourthe, C., Moncoulon, R., 1992b. Influence of extrusion on ruminal and intestinal disappearance of amino acids in whole horsebean. *Canadian Journal of Animal Science* 72, 359–366.
- Cros, P., Vernay, M., Moncoulon, R., 1991b. In situ evaluation of the ruminal and intestinal degradability of extruded whole horsebeans. *Reproduction Nutrition Development* 31, 249–256.
- Goelema, J.O., 1999. Processing of legume seeds: effects on digestive behaviour in dairy cows. Wageningen.
- Goelema, J.O., Spreuwenberg, M.A.M., Hof, G., Van der Poel, A.F.B., Tamminga, S., 1998. Effect of pressure toasting on the rumen degradability and intestinal digestibility of whole and broken peas, lupins and faba beans and a mixture of these feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology* 76, 35–50.

- Guillaume, B., Otterby, D.E., Linn, J.G., Stern, M.D., Johnson, D.G., 1987. Comparison of sweet lupin seeds with soybean meal as a protein supplement for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 70, 2339–2348.
- Khorasani, G.R., Okine, E.K., Corbett, R.R., Kenelly, J.J., 2001. Nutritive value of peas for lactating dairy cattle. *Canadian Journal of Animal Science* 81, 541–551.
- Kibelolaud, A.R., Vernay, M., Bayourthe, C., Moncoulon, R., 1993. Effect of extruding on ruminal disappearance and lower gastrointestinal tract digestion of white lupin seeds. *Canadian Journal of Animal Science* 73, 571–579.
- Lund, P., Weisbjerg, M.R., Hvelplund, T., 2008. Profile of digested feed amino acids from untreated and expander treated feeds estimated using in situ methods in dairy cows. *Livestock Science* 114, 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.04.012>
- Mogensen, L., Vestergaard, J.S., Fretté, X., Lund, P., Weisbjerg, M.R., Kristensen, T., 2010. Effect of toasting field beans and of grass-clover: Maize silage ratio on milk production, milk composition and sensory quality of milk. *Livestock Science* 128, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2009.11.011>
- Moss, A., Allison, R., Stroud, A., Collins, C., 2000. Evaluation of heat-treated lupins, beans, and rapeseed meal as protein sources for dairy cows (No. OS45).
- Petit, H.V., Rioux, R., Ouellet, D.R., 1997. Milk production and intake of lactating cows fed raw or extruded peas. *Journal of Dairy Science* 80, 3377–3385.
- Pieper, R., Gabel, M., Ott, E.M., Pieper, B., 2006. Performance of lactating dairy cows fed raw or expanded lupin seed. Presented at the 11th International Lupin Conference, Mexico, pp. 195–197.
- Poncet, C., Rémond, D., 2002. Rumen digestion and intestinal nutrient flows in sheep consuming pea seeds: the effect of extrusion or chestnut tannin addition. *Animal Research* 51, 201–216. <https://doi.org/10.1051/animres:2002021>

- Rémond, D., Le Guen, M.P., Poncet, C., 2003. Degradation in the rumen and nutritional value of lupin (*Lupinus albus* L.) seed proteins effect of extrusion. *Animal Feed Science and Technology* 105, 55–70. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00040-3](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00040-3)
- Robinson, P.H., McNiven, M.A., 1993. Nutritive value of raw and roasted sweet white lupins (*Lupinus albus*) for lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 43, 275–290.
- Rodehutschord, M., Young, P., Phillips, N., White, C.L., 1999. Wool growth in Merino wethers fed lupins untreated or treated with heat or formaldehyde, with and without a supplementation of rumen protected methionine. *Animal Feed Science and Technology* 82, 213–226.
- Rotger, A., Ferret, A., Calsamiglia, S., Manteca, X., 2006. In situ degradability of seven plant protein supplements in heifers fed high concentrate diets with different forage to concentrate ratio. *Animal Feed Science and Technology* 125, 73–87. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.05.017>
- Singh, C.K., Robinson, P.H., McNiven, M.A., 1995. Evaluation of raw and roasted lupin seeds as protein supplements for lactating cows. *Animal Feed Science and Technology* 52, 63–76.
- Solanas, E., Castrillo, C., Balcells, J., Guada, J.A., 2005. In situ ruminal degradability and intestinal digestion of raw and extruded legume seeds and soya bean meal protein. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 89, 166–171.
- Titze, N., Krieg, J., Steingass, H., Rodehutschord, M., 2019. Variation of lupin protein degradation in ruminants studied in situ and using chemical protein fractions. *Animal* 13, 709–717. <https://doi.org/10.1017/S1751731118002124>
- Walhain, P., Foucart, M., Théwis, A., 1992. Influence of extrusion on ruminal and intestinal disappearance in sacco of pea (*Pisum sativum*) proteins and starch. *Animal Feed Science and Technology* 38, 43–55.

- Yu, P., 2005. Potential protein degradation balance and total metabolizable protein supply to dairy cows from heat-treated faba beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 1268–1274. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2093>
- Yu, P., Egan, A.R., Leury, B.J., 1999a. In sacco evaluation of rumen protein degradation characteristics and in vitro enzyme digestibility of dry roasted whole lupin seeds (*Lupinus albus*). *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 12, 358–365.
- Yu, P., Egan, A.R., Leury, B.J., 1999b. Influence of dry roasting of whole faba beans (*Vicia faba*) and whole lupin seeds (*Lupinus albus*) on rumen disappearance and estimated intestinal digestion of CP using the optimal three-step in vitro technique in dairy cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 12, 1054–1062.
- Yu, P., Goelema, J.O., Tamminga, S., 1999. Determination of optimal conditions of pressure toasting on legume seeds for dairy feed industry: I. Effects of pressure toasting on nutritive values of *Lupinus albus* in lactating dairy cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 12, 1205–1214.
- Yu, P., Leury, B.J., Sprague, M., Egan, A.R., 2001. Effect of the DVE and OEB value changes of grain legumes (lupin and faba beans) after roasting on the performance of lambs diet. *Animal Feed Science and Technology* 94, 89–102.
- Zagorakis, K., Liamadis, D., Milis, C., Dotas, V., Dotas, D., 2015. Nutrient digestibility and in situ degradability of alternatives to soybean meal protein sources for sheep. *Small Ruminant Research* 124, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.01.002>

In vivo database

- Bayourthe, C., Moncoulon, R., Enjalbert, F., 1998. Effect of extruded lupin seeds as a protein source on lactational performance of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 72, 121–131.

- Benchaar, C., Cros, P., Bayourthe, C., 1992. Effect of extruding horsebeans and lupin seeds on in situ rumen degradation and intestinal digestibility of seed protein in non lactating cows. Presented at the 1ère conférence européenne sur les protéagineux, Angers, pp. 501–502.
- Benchaar, C., Moncoulon, R., Bayourthe, C., Vernay, M., 1994a. Effects of a supply of raw or extruded white lupin seeds on protein digestion and amino acid absorption in dairy cows. *Journal of Animal Science* 72, 492–501.
- Benchaar, C., Bayourthe, C., Moncoulon, R., Vernay, M., 1991. Digestion ruminale et absorption intestinale des protéines du lupin extrudé chez la vache laitière. *Reproduction Nutrition Development* 31, 655-665.
- Brunschwig, P., Lamy, J.-M., Weill, P., Lepage, E., Nerrière, P., 2003. Le lupin broyé ou extrudé comme correcteur unique de rations pour vaches laitières. Presented at the Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants, Paris, p. 383.
- Cherif, C., Hassanat, F., Claveau, S., Girard, J., Gervais, R., Benchaar, C., 2018. Faba bean (*Vicia faba*) inclusion in dairy cow diets: Effect on nutrient digestion, rumen fermentation, nitrogen utilization, methane production, and milk performance. *Journal of Dairy Science* 101, 8916–8928. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14890>
- Emile, J.C., Huyghe, C., Huguet, L., 1991. Utilisation du lupin blanc doux pour l'alimentation des ruminants : résultats et perspectives. *Annales de Zootechnie* 40, 31–44.
- Focant, M., Van Hoecke, A., Vanbelle, M., 1990. The effect of two heat treatments (steam flaking and extrusion) on the digestion of *Pisum sativum* in the stomachs of heifers. *Animal Feed Science and Technology* 28, 303–313.
- Froidmont, E., Bartiaux-Thill, N., 2004. Suitability of lupin and pea seeds as a substitute for soybean meal in high-producing dairy cow feed. *Animal Research* 53, 475–487. <https://doi.org/10.1051/animres:2004034>

- Guillaume, B., Otterby, D.E., Linn, J.G., Stern, M.D., Johnson, D.G., 1987. Comparison of sweet lupin seeds with soybean meal as a protein supplement for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 70, 2339–2348.
- Hoden, A., Delaby, L., Marquis, B., 1992. Pois protéagineux comme concentré unique pour vaches. *INRA Productions Animales* 5, 37–42.
- Ingalls, J.R., McKirdy, J.A., 1974. Faba bean as a substitute for soybean meal or rapeseed meal in rations for lactating cows. *Canadian Journal of Animal Science* 54, 87–89.
- Ingalls, J.R., McKirdy, J.A., Sharma, H.R., 1980. Nutritive value of faba beans in the diets of young Holstein calves and lactating dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science* 60, 689–698.
- Khorasani, G.R., Okine, E.K., Corbett, R.R., Kenelly, J.J., 2001. Nutritive value of peas for lactating dairy cattle. *Canadian Journal of Animal Science* 81, 541–551.
- Masoero, F., Moschini, M., Fusconi, G., Piva, G., 2006. Raw, extruded and expanded pea (*Pisum sativum*) in dairy cows diets. *Italian Journal of Animal Science* 5, 237–247. <https://doi.org/10.4081/ijas.2006.237>
- May, M.G., Otterby, D.E., Linn, J.G., Hansen, W.P., Johnson, D.G., Putnam, D.H., 1993. Lupins (*Lupinus albus*) as a protein supplement for lactating Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* 76, 2682–2691.
- McMeniman, N.P., Armstrong, D.G., 1979. The flow of amino acids into the small intestine of cattle when fed heated and unheated beans (*Vicia faba*). *The Journal of Agricultural Science* 93, 181. <https://doi.org/10.1017/S0021859600086263>
- Mendowski, S., Chapoutot, P., Chesneau, G., Ferlay, A., Enjalbert, F., Cantalapiedra-Hijar, G., Germain, A., Nozière, P., 2019. Effects of replacing soybean meal with raw or extruded blends containing faba bean or lupin seeds on nitrogen metabolism and performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 102, 5130–5147. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15416>

- Mendowski, S., Chapoutot, P., Chesneau, G., Ferlay, A., Enjalbert, F., Cantalapiedra-Hijar, G., Germain, A., Nozière, P., 2020. Effects of pretreatment with reducing sugars or an enzymatic cocktail before extrusion of faba bean on nitrogen metabolism and performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 103, 396-409. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17286>
- Mogensen, L., Lund, P., Kristensen, T., Weisbjerg, M.R., 2008. Effects of toasting blue lupins, soybeans or barley as supplement for high-yielding, organic dairy cows fed grass-clover silage ad libitum. *Livestock Science* 115, 249–257. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.08.011>
- Mogensen, L., Vestergaard, J.S., Fretté, X., Lund, P., Weisbjerg, M.R., Kristensen, T., 2010. Effect of toasting field beans and of grass-clover: maize silage ratio on milk production, milk composition and sensory quality of milk. *Livestock Science* 128, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2009.11.011>
- Pelletier, G., Bouchard, R., 1978. Evaluation de la féverole et du pois traités ou non-traités à la formaldéhyde comme source de protéines pour la vache laitière. *Canadian Journal of Animal Science* 58, 659–669.
- Petit, H.V., Rioux, R., Ouellet, D.R., 1997. Milk production and intake of lactating cows fed raw or extruded peas. *Journal of Dairy Science* 80, 3377–3385.
- Pieper, R., Gabel, M., Ott, E.M., Pieper, B., 2006. Performance of lactating dairy cows fed raw or expanded lupin seed. Presented at the 11th International Lupin Conference, Mexico, pp. 195–197.
- Ramin, M., Höjer, A., Hetta, M., 2017. The effects of legume seeds on the lactation performance of dairy cows fed grass silage-based diets. *Agricultural and Food Science* 26, 129–137.
- Robinson, P.H., McNiven, M.A., 1993. Nutritive value of raw and roasted sweet white lupins (*Lupinus albus*) for lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 43, 275–290.

- Singh, C.K., Robinson, P.H., McNiven, M.A., 1995. Evaluation of raw and roasted lupin seeds as protein supplements for lactating cows. *Animal Feed Science and Technology* 52, 63–76.
- Tufarelli, V., Khan, R.U., Laudadio, V., 2012. Evaluating the suitability of field beans as a substitute for soybean meal in early-lactating dairy cow: production and metabolic responses: field beans in early-lactating dairy cows. *Animal Science Journal* 83, 136–140. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2011.00934.x>
- Vander Pol, M., Hristov, A.N., Zaman, S., Delano, N., 2008. Peas can replace soybean meal and corn grain in dairy cow diets. *Journal of Dairy Science* 91, 698–703. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0543>
- Vander Pol, M., Hristov, A.N., Zaman, S., Delano, N., Schneider, C., 2009. Effect of inclusion of peas in dairy cow diets on ruminal fermentation, digestibility, and nitrogen losses. *Animal Feed Science and Technology* 150, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2008.08.009>
- Volpelli, L.A., Comellini, M., Masoero, F., Moschini, M., Lo Fiego, D.P., Scipioni, R., 2009. Pea (*Pisum sativum*) in dairy cow diet: effect on milk production and quality. *Italian Journal of Animal Science* 8, 245–257. <https://doi.org/10.4081/ijas.2009.245>
- Volpelli, L.A., Comellini, M., Masoero, F., Moschini, M., Pietro Lo Fiego, D., Scipioni, R., 2010. Faba beans (*Vicia faba*) in dairy cow diet: effect on milk production and quality. *Italian Journal of Animal Science* 9, e27. <https://doi.org/10.4081/ijas.2010.e27>

# Discussion générale

---

L'objectif de ce travail de thèse était de déterminer quelles combinaisons « graine protéagineuse × traitement technologique d'extrusion » étaient les plus intéressantes pour alimenter les vaches laitières, c'est-à-dire présentant des dégradabilités ruminales des protéines faibles tout en maintenant une bonne digestibilité intestinale. Pour ce faire, des phases de screening *in vitro* et *in sacco* (non décrites dans ce travail) ont préalablement permis de définir 7 combinaisons « graines × traitements » (5 combinaisons pour la graine de féverole et 2 combinaisons pour la graine de lupin), qui ont ensuite été testées au cours de deux essais *in vivo* sur vaches laitières.

Ce chapitre a pour objectif de discuter les résultats obtenus dans la thèse, les aspects innovants développés dans ce travail mais également les limites des techniques de mesures utilisées. Enfin, les perspectives de cette étude seront présentées.

## I. Les principales conclusions

### 1. Effets de la substitution du tourteau de soja par de la féverole et du lupin, crus ou extrudés

Les valeurs PDIA<sub>6</sub> (calculées comme dans la partie 4 des Résultats à partir de la dr<sub>N</sub> mesurée *in sacco* et des PIA<sub>6</sub>, elles-mêmes calculées à partir de la teneur en MAT des graines et de la DT<sub>6N</sub> mesurée *in sacco*) des aliments crus à base de féverole et de lupin testés pendant la thèse ont été moindres que celles du tourteau de soja (-133 g/kg de MS en moyenne). Ceci est tout à fait cohérent avec les hypothèses initiales de ce travail, à savoir que les graines protéagineuses crues avaient une moins bonne valeur protéique que le tourteau de soja. Cependant, après extrusion de ces graines protéagineuses, cet écart a été réduit à -62 g/kg de MS en moyenne. Ceci est à nouveau cohérent avec les hypothèses établies, c'est-à-dire que l'extrusion augmenterait la valeur protéique des graines protéagineuses. Toutefois, l'extrusion dans nos conditions expérimentales n'a pas permis d'obtenir une aussi bonne valeur nutritionnelle de ces graines que celle du tourteau de soja. Cela s'explique facilement par la teneur en MAT plus faible des graines protéagineuses par rapport au tourteau de soja (plus de 140 g de MAT/kg de MS d'écart entre le tourteau de soja et les protéagineux).

Aucune autre comparaison directe que celles produites dans cette thèse n'a pu être trouvée dans la littérature sur les valeurs PDIA<sub>6</sub> de graines de féverole, lupin ou pois (quel que soit le traitement subi) comparées à celles du tourteau de soja, rendant impossible toute comparaison de nos résultats à la bibliographie. Cependant, compte tenu des valeurs PIA<sub>6</sub> calculées à partir des données de la bibliographie, qui sont systématiquement inférieures avec les graines

protéagineuses (traitées ou non) qu'avec le tourteau de soja, les PDIA<sub>6</sub> obtenues à partir de ces données seraient là aussi inférieures avec les graines protéagineuses qu'avec le tourteau de soja.

Dans les essais sur vaches laitières de la thèse, conduits avec des rations iso-MAT, la teneur en NH<sub>3</sub> du jus de rumen a été plus élevée avec les graines protéagineuses distribuées crues qu'avec le tourteau de soja. Ce résultat, cohérent là aussi avec les hypothèses présentées au début de ce travail, est confirmé par notre méta-analyse des données de la littérature scientifique. Par ailleurs, lorsque ces aliments ont été extrudés, la teneur en NH<sub>3</sub> du jus de rumen est restée numériquement supérieure à celle observée avec du tourteau de soja, sans pour autant être différente statistiquement. Ceci est similaire à ce qui est observé dans notre méta-analyse : les graines protéagineuses traitées conduisent à une teneur en NH<sub>3</sub> numériquement plus élevée qu'avec le tourteau de soja.

Avant de discuter les principales conclusions de ce travail de thèse sur l'azote sécrété dans le lait, il convient de rappeler que le lait contient une grande majorité d'azote protéique, sous forme de caséines ou d'autres protéines (Figure 20). Les protéines non-caséiques sont solubles. Quant à l'azote non protéique, soluble également, il s'agit essentiellement de l'urée du lait.

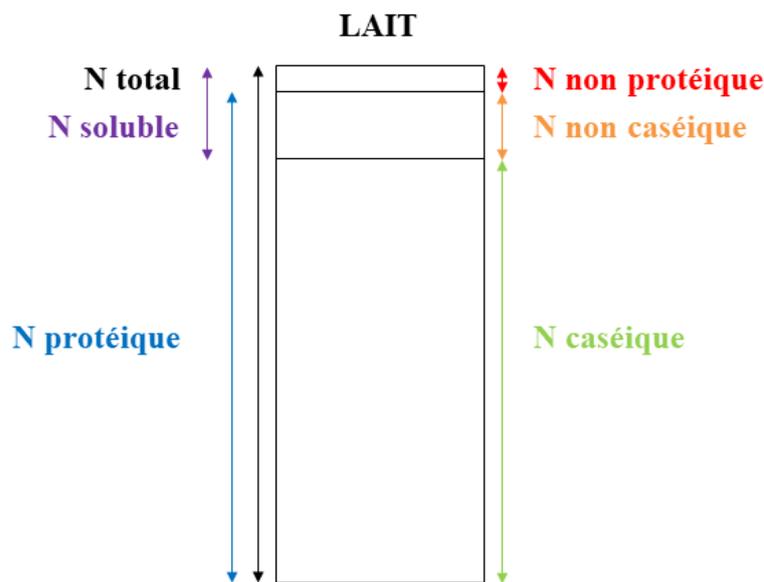


Figure 20 : les différentes fractions azotées dans le lait

Dans le cadre des essais *in vivo*, les fractions azotées du lait analysées (par infra-rouge) sur l'ensemble de la période de mesures, ont été : le taux protéique (TP) (qui correspond à l'N protéique avec une hypothèse de 6,38 g de protéines/g d'N protéique), et l'urée. La proportion d'azote soluble dans l'azote total a été déterminée par la méthode de Kjeldhal sur une seule traite/période, et l'azote caséique a été déterminé par différence. Dans cette discussion, l'accent sera porté sur l'azote total, facilement calculable à partir du TP mesuré et également systématiquement indiqué dans la bibliographie.

Concernant les performances de production obtenues lors de nos essais, la production de lait n'a pas été modifiée lorsque les protéagineux (crus et extrudés) ont remplacé le tourteau de soja

dans la ration des vaches laitières de façon iso-MAT et sans limitation en méthionine, exceptée avec la féverole extrudée à 140°C (tendance à une augmentation de +1,8 kg/j). En revanche, la quantité d'N sécrétée dans le lait a été plus faible avec les graines de féverole et de lupin crues qu'avec le tourteau de soja (-7 et -10 g/j pour la féverole et le lupin, respectivement), ce qui était attendu compte tenu des différences de valeurs PDI (plus faibles avec les protéagineux crus qu'avec le tourteau de soja). Pour rappel, l'hypothèse initiale était que la sécrétion d'N dans le lait serait moindre avec les protéagineux crus qu'avec le tourteau de soja, ce qui s'est effectivement vérifié dans nos essais. Par ailleurs, il est possible d'estimer les diminutions de la quantité d'N sécrétée dans le lait qui pouvaient être attendues dans nos essais selon les lois de réponses des animaux en termes d'efficacité d'utilisation des PDI (Sauvant et al., 2018a). En prenant l'exemple du carré latin lupin du premier essai *in vivo*, l'écart de PDI ingérées par les animaux entre le régime témoin tourteau de soja et le régime lupin cru était de 408 g PDI/j. Cet écart de PDI disponible, utilisé avec une efficacité marginale de 19 % pour la synthèse des protéines du lait, en faisant l'hypothèse que les animaux sont à leur potentiel, conduirait à 77,5 g/j de matière protéique sécrétée dans le lait, soit 12 g d'N sécrété/j. Ainsi, le résultat observé de -10 g/j est très proche des -12 g/j auxquels nous pouvions nous attendre.

Lorsque les graines ont été traitées, la quantité d'N sécrétée dans le lait est restée inférieure à celle sécrétée avec du tourteau de soja (entre -7 et -9 g/j selon la graine et la température d'extrusion), sauf avec la féverole extrudée à 140°C. L'hypothèse initiale selon laquelle les traitements thermiques allaient permettre de « rattraper » les performances obtenues avec le tourteau de soja n'est pas donc pas vérifiée.

Les variations de quantités d'N sécrétées dans le lait ont été plus traduites par des variations de teneur en N (ou de taux protéique) du lait que par des quantités de lait produites. Le TB en revanche n'a pas été modifié par le remplacement du tourteau de soja par des graines protéagineuses, qu'elles soient traitées ou non.

L'utilisation des graines protéagineuses crues conduit donc à une augmentation de la dégradation des protéines dans le rumen par rapport au tourteau de soja, ce qui n'affecte pas la quantité de lait produite mais entraîne une diminution de la sécrétion d'azote dans le lait.

## **2. Effets des procédés technologiques sur la valorisation de la féverole et du lupin**

Les valeurs PDIA<sub>6</sub> des aliments testés dans la thèse (calculées à partir des données *in sacco* mesurées) ont été plus élevées avec les graines extrudées qu'avec les graines crues : le gain de PDIA<sub>6</sub> a été en moyenne de +64 g/kg MS pour la féverole et de +92 g/kg MS pour le lupin. Cette augmentation des valeurs PDIA<sub>6</sub>, en accord avec nos hypothèses initiales, a été confirmée par les résultats issus de l'analyse de la bibliographie : les PDIA<sub>6</sub> augmentent avec le traitement thermique, quelle que soit la graine protéagineuse et quel que soit le traitement. Cette augmentation n'a toutefois pas été systématiquement statistiquement significative.

Dans nos essais *in vivo*, la teneur en  $\text{NH}_3$  du jus de rumen a été diminuée lorsque les graines étaient extrudées (excepté pour la féverole extrudée après maturation avec ajout de sucres réducteurs ou ajout d'un cocktail enzymatique), mais les différences n'ont pas été significatives. Ce résultat est en accord avec ce qui est observé dans la littérature scientifique. En effet, l'analyse des données bibliographiques montre que la teneur en  $\text{NH}_3$  du jus de rumen diminue lorsque les graines sont traitées par rapport aux graines crues, cependant ces différences n'apparaissent pas statistiquement significatives, excepté pour le lupin extrudé (-11,8 mg de  $\text{NH}_3/\text{L}$ ,  $P = 0,040$ , voir partie IV des résultats). Le fait que la teneur en  $\text{NH}_3$  dans le jus de rumen diminue avec le traitement thermique des graines est cohérent vis-à-vis des hypothèses formulées au début de ce travail, mais est toutefois moins marqué que ce qui pouvait être espéré.

Dans nos essais *in vivo*, le traitement thermique des graines n'a pas entraîné de différence de quantité de lait produite, excepté l'extrusion à  $140^\circ\text{C}$  de la féverole dans l'essai 1 qui a conduit à une meilleure production laitière (+2,8 kg/j). Il n'y a pas eu non plus d'effet ni sur le TP, ni sur la quantité d'azote sécrétée dans le lait. Dans la littérature scientifique, aucun effet sur le TP n'a été constaté, pourtant une légère augmentation de la quantité d'azote sécrétée dans le lait a pu être observée suite aux analyses des données issues de la littérature. Cette augmentation de la quantité d'azote sécrétée dans le lait va dans le sens de notre hypothèse initiale, mais est toutefois moins marquée que ce qui était espéré. Par exemple, de la même façon que dans le paragraphe précédent, les augmentations de la quantité d'N sécrétée dans le lait qui pouvaient être attendues dans nos essais selon les lois de réponses des animaux en termes d'efficacité d'utilisation des PDI (Sauvant et al., 2018a) ont été estimées. Pour le carré latin féverole du premier essai *in vivo*, l'écart de PDI ingérées par les animaux entre le régime féverole crue et le régime féverole extrudée à  $160^\circ\text{C}$  était de 458 g PDI/j, ce qui conduirait à 87 g/j de matière protéique sécrétée dans le lait, soit 13,6 g d'N sécrété/j en plus. Or, le résultat observé est rigoureusement identique entre le régime féverole crue et féverole extrudée à  $160^\circ\text{C}$ , donc notre essai n'a pas permis de mettre en évidence les +13,6 g/j auxquels nous pouvions nous attendre.

En revanche, dans nos essais, le TB a été diminué lorsque les graines de lupin ont été extrudées quel que soit le traitement, et lorsque les graines de féverole ont été extrudées sans condition de maturation particulière, ou bien maturées avec des sucres réducteurs (2<sup>ème</sup> essai). Cette diminution est également observée dans la littérature, quelle que soit la graine et quel que soit le traitement (sauf pour les graines de féverole tannées et de pois extrudées), et peut être significative ou non. Cela peut s'expliquer facilement pour le lupin ayant subi des traitements thermomécaniques, car l'action mécanique couplée à la chaleur détruit en partie les structures cellulaires et rend ainsi les lipides contenus dans le lupin (98 g/kg MS en moyenne pour le lupin blanc, INRA-CIRAD-AFZ, 2017 ; INRA, 2018) plus accessibles aux bactéries du rumen (Chilliard et al., 2009). Ceci conduit à augmenter le flux d'acides gras intermédiaires de la biohydrogénation au niveau duodénal. Ces acides gras peuvent exercer un effet inhibiteur sur la synthèse *de novo* des acides gras au niveau de la mamelle, ce qui réduirait la quantité de matière grasse exportée dans le lait. En ce qui concerne l'influence de la féverole extrudée, les seules données disponibles sur la production et la composition laitière ont été celles produites

lors des deux essais *in vivo* de cette thèse, aucune autre donnée n'ayant été trouvée dans la littérature scientifique. Dans la thèse, l'association de la féverole à 10 % de graine de lin, graine riche en matière grasse (373 g/kg MS, INRA-CIRAD-AFZ, 2017 ; INRA, 2018), a pu entraîner le même phénomène qu'avec le lupin lors de l'extrusion. Les diminutions de TB observées dans la littérature sont en revanche moins faciles à expliquer avec les traitements uniquement thermiques, ou avec la graine de pois, très pauvre en matière grasse (13 g/kg MS, INRA-CIRAD-AFZ, 2017 ; INRA, 2018). En effet, l'analyse des données bibliographiques a écarté l'hypothèse d'une chute de TB due à une réduction de la MS ingérée. De plus, dans la majorité des essais, les rations contenaient une proportion de fourrages importante (plus de 50 %, voire 60 %), ce qui écarte l'hypothèse d'un apport excessif de concentrés pouvant conduire à des situations de sub-acidose et entraîner une chute de TB. Enfin, l'analyse des données bibliographiques a également écarté l'hypothèse d'une chute de TB due à une modification du profil des AGV dans le rumen, puisque qu'aucune modification du rapport acétate/propionate n'a été constatée (donc pas d'augmentation de la concentration en acétate, qui est à l'origine de la synthèse *de novo* de la matière grasse dans la glande mammaire).

Ainsi, l'extrusion a donc des effets sur les paramètres digestifs, bien que leurs conséquences ne soient pas très visibles sur les performances zootechniques des VL (hormis sur le TB) ni sur la partition de l'azote. De plus, ces effets varient selon la nature du traitement et les conditions de mise en place de ce traitement (température, durée, etc.).

### 3. Limitation en méthionine

Les protéagineux, notamment la féverole et le lupin, sont des graines dont les protéines sont pauvres en méthionine, ce qui leur confère une faible teneur en méthionine digestible (MetDI) : 1,48 ; 1,44 et 1,72 % des PDI pour la féverole colorée, le lupin blanc et le pois, respectivement (INRA, 2018). Un trop faible apport alimentaire de MetDI peut défavoriser l'exportation de protéines dans le lait. Ainsi, Vander Pol et al. (2008) ont conclu sur la nécessité d'une supplémentation en méthionine lorsque le pois se substitue au tourteau de soja dans l'alimentation des vaches laitières hautes productrices. De même, plusieurs auteurs se sont accordés sur le fait que la méthionine est limitante dans les régimes à base de féverole (Ingalls et al., 1980 ; Ramin et al., 2017 ; Cherif et al., 2018) ou à base de pois (Ramin et al., 2017). En outre, Bayourthe et al. (1998) ont conclu que la méthionine est le premier AA limitant avec un régime à base de lupin extrudé. Pour autant, à notre connaissance, aucune publication scientifique ne rapporte la prise en compte d'une complémentation en méthionine pour étudier les effets des graines protéagineuses dans les rations des vaches laitières, contrairement à ce qui a été fait dans les deux essais *in vivo* de cette thèse.

Ainsi, la faible teneur des graines protéagineuses en MetDI peut conduire à un apport de méthionine inférieur aux recommandations, et donc être à l'origine des diminutions de TP observées, ou bien masquer une réponse positive des animaux sur les performances laitières lorsque ces graines remplacent le tourteau de soja dans les rations pour VL (bien que cette

deuxième hypothèse soit moins probable puisque les protéagineux ne permettent pas d’atteindre le niveau d’apports PDI obtenu avec le tourteau de soja).

De ce fait, pour éviter toute limitation des réponses des animaux, les régimes des deux essais *in vivo* réalisés durant cette thèse ont été complétés en méthionine protégée (MetaSmart® Dry), à hauteur de 50 g/j/vache dans le 1<sup>er</sup> essai et 85 g/j/vache dans le 2<sup>nd</sup> essai. Les valeurs MetDI des régimes avant et après supplémentation sont présentées dans le Tableau 8. La recommandation étant de 2,4 % des PDI pour la MetDI (Sauvant et al., 2018a), tous les régimes ont permis, une fois supplémentés, un niveau d’apport suffisant en méthionine (sauf les régimes FE1 et LE2, très légèrement en-dessous des recommandations).

Tableau 8 : Valeurs de méthionine digestible des régimes expérimentaux avant et après supplémentation en méthionine protégée

Essai <i>in vivo</i>	Régime	MetDI avant supplémentation <sup>1</sup> , % PDI	MetDI après supplémentation, % PDI
1	Féverole FC	1,99	2,62
	Féverole FE1	1,74	2,38
	Féverole FE2	1,74	2,29
	Lupin LC	2,01	2,67
	Lupin LE1	1,82	2,42
	Lupin LE2	1,84	2,31
	Tourteau de soja	1,94	2,53
2	Féverole CRU	1,93	3,29
	Féverole EXT	1,65	2,73
	Féverole SUC	1,66	2,75
	Féverole ENZ	1,67	2,77

<sup>1</sup>valeurs calculées pour chaque aliment expérimental grâce à Systool Web ([www.systoolweb.fr](http://www.systoolweb.fr)) avec la DT<sub>6</sub> de l’azote calculée à partir des valeurs DE1

Les graines protéagineuses sont pauvres en méthionine, et leur distribution aux vaches laitières peut pénaliser le TP si les régimes ne sont pas suffisamment complétés en méthionine digestible.

## II. Les aspects innovants de la thèse

### 1. L’analyse des composés de Maillard

*a. L’extrusion conduit à des réactions de Maillard dont la nature et la quantité des produits sont difficiles à prévoir*

Les différents travaux réalisés dans la thèse ont confirmé que l’extrusion entraînait l’apparition de composés de Maillard, qui reflètent la protection des protéines. En revanche, selon les conditions d’extrusion, les profils des aliments en composés de Maillard ont varié. La

teneur en CML a augmenté dans les aliments avec le degré d'intensité de l'extrusion, que ce soit pour les graines de féverole ou de lupin. En revanche, les effets de l'extrusion ont été moins systématiques sur les autres composés de Maillard étudiés : la quantité d'acrylamide a augmenté avec l'intensité du traitement pour le lupin, mais pas pour la féverole ; le HMF a été détecté uniquement dans l'aliment lupin extrudé à 160°C ; et enfin la furosine (composé précoce) a augmenté avec l'intensité du traitement pour le lupin mais ses variations restent peu prédictibles pour la féverole. Ces résultats diffèrent de ceux trouvés par Žilić et al., (2014), pour qui les teneurs en acrylamide, HMF et furosine augmentaient avec l'augmentation de la température d'extrusion pour des graines de soja extrudées entre 100°C et 140°C. Les niveaux d'acrylamide produits ont été similaires entre la féverole extrudée à 140°C dans nos conditions expérimentales et le soja extrudé à 140°C présenté dans leurs travaux (69 et < 32 ng/g de MS pour la féverole extrudée à 140°C de l'essai 1 et de l'essai 2, respectivement, contre 62 ng/g de MS pour le soja extrudé à 140°C), mais ont été supérieurs pour le lupin extrudé à 140°C dans nos conditions expérimentales (175 ng/g de MS). Les niveaux de HMF ont été plus faibles dans nos essais que dans celui de Žilić et al. (2014) toujours avec des graines extrudées à 140°C (< 3 et < 9 µg/g de MS pour la féverole et le lupin, respectivement contre 11 µg/g de MS pour le soja). Enfin, les niveaux de furosine ont été largement plus élevés pour la féverole extrudée selon nos conditions que pour le soja extrudé à 140°C (de 128 à 1917 µg/g de MS pour la féverole contre 67 µg/g pour le soja). Quant au tourteau de soja utilisé dans notre essai, il ne contenait pas assez d'acrylamide et de HMF pour que ces composés soient quantifiés, contrairement au soja extrudé dans les travaux de Žilić et al. (2014).

Ces différences de quantité de composés de Maillard obtenus ne sont pas seulement dues au procédé technologique (extrusion ou trituration), mais également à la nature de la matière première végétale extrudée. En effet, la féverole, le lupin et le soja sont des matrices végétales différentes, et ont donc une réactivité différente face aux conditions d'extrusion. C'est l'interaction « matrice végétale × conditions d'extrusion » qui va déterminer le profil en composés de Maillard obtenu.

### *b. Les CML sont peu dégradables dans le rumen mais très digestibles dans l'intestin*

#### *α. Digestibilité apparente dans l'ensemble du tube digestif*

Les valeurs de digestibilité apparente de la CML dans l'ensemble du tube digestif ont été mesurées sur la ration totale dans le 2<sup>ème</sup> essai conduit dans cette thèse, et sont présentées dans la 2<sup>ème</sup> partie des Résultats de ce manuscrit. La digestibilité apparente de la fraction de CML provenant de la ration de base, et celle provenant des aliments expérimentaux, ont été calculées par régression selon la méthode proposée par Giger et Sauvant (1983), sur les données individuelles des 8 vaches en digestibilité du 2<sup>ème</sup> essai *in vivo*, en faisant l'hypothèse d'une relation linéaire entre la digestibilité de la CML de la ration (en ordonnées) et la proportion de CML apportée par l'aliment expérimental dans la ration (en abscisses, de 13 à 41% en moyenne pour les 4 régimes, [Figure 21](#)). Les valeurs de digestibilité apparente de la CML des aliments expérimentaux, calculées pour X = 100 %, soit  $\text{digApp}_{\text{CML}} = \text{pente} \times 100 + \text{ordonnée à l'origine}$ ,

ont été en moyenne  $\pm$  écart-type de  $88 \pm 8 \%$ ,  $89 \pm 14 \%$ ,  $85 \pm 13 \%$  et  $91 \pm 8 \%$  dans les régimes CRU, EXT, SUC et ENZ respectivement. De même, la digestibilité apparente de la CML de la ration de base (mélange de fourrages, pulpe de betterave et mélasse de betterave), calculée pour  $X = 0 \%$ , a été en moyenne de  $61 \pm 5 \%$ . Ainsi, la digestibilité apparente de la CML issue des mélanges féverole-lin est plus importante que la CML issue de la ration de base. Par ailleurs, il n'y a pas eu de différence de digestibilité apparente de la CML entre la féverole crue et la féverole extrudée, quel que soit le traitement d'extrusion.

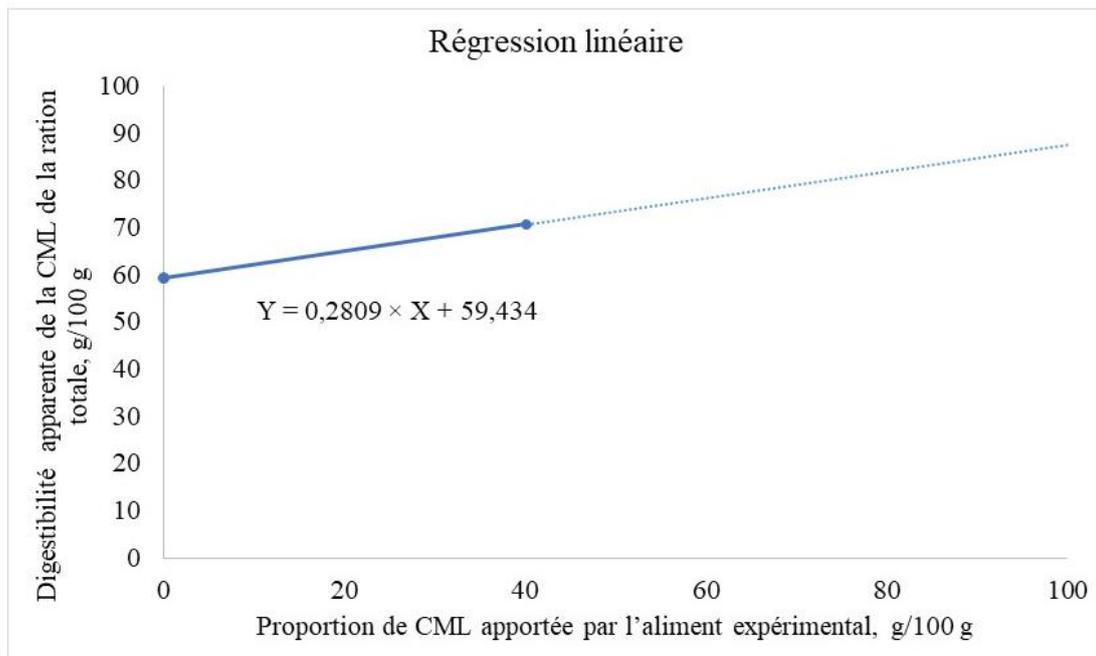


Figure 21 : estimation de la digestibilité apparente de la CML des aliments expérimentaux à partir de la proportion de CML apportée par l'aliment expérimental dans la ration, et la digestibilité apparente de la CML totale dans la ration.

Exemple pour une vache ayant reçu le régime ENZ en dernière période.

Toutefois, cette démarche n'a été possible qu'avec les résultats du 2<sup>nd</sup> essai *in vivo* car la ration de base entre les différents traitements du 1<sup>er</sup> essai n'était pas tout à fait identique (proportion variable de protéagineux et de maïs pour garantir une même teneur en MAT entre tous les régimes). De plus, lors de ce 1<sup>er</sup> essai, la contribution des aliments expérimentaux à l'apport total de CML dans la ration était plus faible que lors du 2<sup>ème</sup> essai (de 6 à 26 %) en raison d'une proportion de protéagineux plus faible dans les régimes et d'une teneur en CML du mélange de fourrages plus important dans le 1<sup>er</sup> essai (de 74 % à 94 % selon les régimes) que dans le 2<sup>ème</sup> (de 59 % à 87 % selon les régimes). L'approche était donc nettement moins précise sur le 1<sup>er</sup> essai que sur le 2<sup>nd</sup>, c'est pourquoi les résultats ne sont pas présentés ici.

Concernant la part de la CML provenant d'autres aliments que les aliments expérimentaux extrudés, l'unique dosage réalisé sur l'ensemble de la ration de base n'a pas permis de savoir de quel(s) aliment(s) elle venait. En effet, la CML est un composé de Maillard qui ne nécessite pas forcément des températures très élevées pour être formé. Elle a donc pu provenir de la pulpe de betterave lors de la déshydratation et la granulation, du maïs broyé lors du séchage des grains,

ou de l'ensilage d'herbe et/ou de maïs suite à la fermentation dans le(s) silo(s). Il s'ensuit que la ration de base a apporté plus de CML que les aliments expérimentaux (mélanges graines protéagineuses + graine de lin).

### *β. Partition de la digestion entre le rumen et l'intestin*

Pour rappel, les mesures de la dégradation de la CML après 15 h d'incubation dans le rumen n'ont pas permis de montrer un effet du traitement d'extrusion ni du type d'aliments, même si le tourteau de soja présentait des valeurs supérieures à celles observées pour le lupin et la féverole (Tableau 7). Ces valeurs, relativement basses et surtout très variables selon les aliments, semblent refléter un faible niveau de dégradation de ce composé dans le rumen pour les graines de féverole et de lupin. En revanche, les valeurs de  $dr$  de la CML ont été assez élevées (en moyenne 89 % pour la féverole, 87 % pour le lupin et 93 % pour le tourteau de soja) révélant une forte digestibilité dans l'intestin.

La variabilité des résultats au niveau du rumen ne semble pas être due à des problèmes de pertes particulières lors des mesures *in sacco*, puisque le diamètre des mailles des sachets utilisés a été vérifié et est bien standardisé autour de 50  $\mu$ m. De plus, les résultats de disparition de la lysine (Tableau 6), obtenus sur les mêmes résidus d'incubation lors des mêmes essais, ne montrent pas de forte variabilité inter-aliment. Dans le cas des CML, les faibles teneurs des aliments et les faibles niveaux de disparition pourraient expliquer l'hétérogénéité de valeurs de disparition *in sacco*.

En conclusion, nous avons constaté une digestibilité apparente de la CML élevée dans le TD, une dégradation non différente de zéro dans le rumen, mais des valeurs de  $dr_{CML}$  élevées, ce qui signifie que la digestion de la CML dans l'ensemble du TD est surtout due à la fraction intestinale.

### *c. La lysine est un indicateur de la protection des protéines dans le rumen*

Nous nous sommes intéressés au devenir de la lysine totale dans les réactions de Maillard. En effet, bien que n'étant pas un composé de Maillard au sens strict, la lysine est l'un des AA les plus sensibles aux réactions de Maillard, du fait de ses deux groupements amines, dont l'un est libre et donc susceptible de pouvoir réagir avec un sucre à la chaleur. La teneur en lysine totale, c'est-à-dire à la fois libre et sous forme peptidique, peut être vue comme un « témoin » de l'avancée et de l'intensité des réactions de Maillard.

Les plus faibles valeurs de dégradation ruminale de la lysine observées pour les graines extrudées par rapport aux crues (66 % contre 89 % pour la féverole et 43 % contre 91 % pour le lupin, Tableau 6) ont souligné la protection de la lysine dans le rumen - et par extension celle des protéines - liée au traitement d'extrusion. Pour comparaison, les traitements thermiques subis par le tourteau de soja lors de son obtention en trituration ont conduit à une protection moindre que l'extrusion, avec une dégradation ruminale de la lysine (84 %), intermédiaire entre les graines protéagineuses extrudées et les graines crues. Par ailleurs, les valeurs de  $dr$  de la lysine ont été plus importantes pour les produits extrudés que pour les crus (97 % contre 88 %

pour la féverole et 98 % contre 81 % pour le lupin, [Tableau 6](#)) révélant une digestibilité d'autant plus importante dans l'intestin pour les graines extrudées. Là encore, le tourteau de soja a conduit à une valeur intermédiaire (97 %).

La protection apportée par l'extrusion a donc été particulièrement intéressante, puisqu'elle permet de diminuer la dégradabilité de la lysine dans le rumen sans pour autant pénaliser sa digestibilité dans l'intestin, voire même en l'améliorant, comme l'ont montré les accroissements de teneurs en lysine absorbable dans l'intestin. Ce dernier résultat est toutefois nuancé dans la partie III de cette Discussion, qui présente les limites des méthodologies utilisées.

La même démarche de calculs par régression pour estimer la digestibilité apparente de la CML provenant des concentrés expérimentaux et de la ration de base de l'essai 2 a été appliquée pour la lysine. Contrairement à la CML, la lysine a été majoritairement apportée par les aliments expérimentaux (de 71 % à 78 % selon les régimes). Cette démarche de calcul par régression a conduit à des valeurs de digestibilité apparente de la lysine issue des aliments expérimentaux de  $85 \pm 31\%$ ,  $89 \pm 30\%$ ,  $86 \pm 32\%$  et  $85 \pm 36\%$  pour la féverole CRU, EXT, SUC et ENZ, respectivement, tandis qu'elle a été de  $-37 \pm 108\%$  pour la ration de base (autrement dit une digestibilité apparente négative et non significativement différente de zéro). Les valeurs de digestibilité apparente de la lysine de la féverole sont globalement cohérentes avec celles de la CML pour ces mêmes graines, et également cohérentes avec la digestibilité apparente de la MAT de la féverole donnée dans les Tables INRA (2018) (79 %). Cependant, la valeur de digestibilité apparente négative pour la ration de base, associée aux écarts-types importants, soulignent l'incertitude de l'approche. Il y a notamment un effet individu marqué, puisque 2 des 8 vaches présentent de façon systématique des digestibilités apparentes de la lysine issue du concentré supérieures à 100 %. De même, l'effet individu semble très marqué pour le calcul de la digestibilité apparente de la lysine issue de la ration de base.

Pour autant, de même que pour la CML, aucun effet du traitement n'a été mis en évidence sur la digestibilité apparente de la lysine des concentrés expérimentaux.

Les réactions de Maillard, induites par l'extrusion des graines protéagineuses, sont fonction de l'interaction entre la matière première extrudée et les conditions d'extrusion. Dans nos essais, ces réactions de Maillard ont permis la protection des protéines dans le rumen, comme l'ont montré les résultats de dégradabilité et de digestibilité de la lysine. De plus, la CML formée dans les aliments expérimentaux était plus digestible que celle de la ration de base, et bien que la dégradation ruminale de la CML soit proche de zéro, la digestibilité intestinale est élevée. Ces travaux sont originaux et apportent de nouveaux éléments sur la compréhension des effets de l'extrusion sur la protection des protéines. En revanche, le devenir des composés de Maillard digérés n'a pas été évalué, ce qui nécessiterait un travail complémentaire à ce sujet.

## 2. Analyse des conditions d'extrusion

Outre l'étude des composés de Maillard, une autre originalité de ce travail de thèse a été l'étude et la description des paramètres mis en œuvre pour obtenir les produits extrudés utilisés lors des essais. En effet, dans la littérature, les procédés technologiques utilisés sont nommés, mais restent généralement très mal décrits, voire pas du tout exprimés de façon quantitative. Si la température du traitement est souvent mentionnée (mais pas systématiquement), la durée du traitement, la pression, le débit ou encore l'indice d'énergie mécanique ne sont fournis qu'épisodiquement. De plus, au sein d'une même publication, seuls certains des critères ci-dessus sont parfois indiqués, limitant la mise en relation de ces différents paramètres.

L'ajout de graine de lin dans les mélanges utilisés lors des deux essais *in vivo* a été nécessaire pour faciliter l'extrusion des graines de féverole et de lupin. En effet, du fait de sa haute teneur en lipides (373 g/kg MS, INRA-CIRAD-AFZ, 2017 ; INRA, 2018), la graine de lin a diminué la viscosité du mélange, donc augmenté sa fluidité, lorsqu'il a circulé dans les fûts des extrudeurs. Sans cet apport de matière grasse pour fluidifier ces matrices (notamment la féverole), le traitement d'extrusion aurait été vraiment trop contraignant, et donc difficile à mettre en œuvre sur les machines dont nous disposons. Cependant, cela a aussi impliqué d'ajuster les paramètres de l'extrudeur pour obtenir un traitement thermomécanique à la fois réalisable sur les machines mais également suffisant pour conduire à un niveau correct de protection des protéines. Cet ajustement a été encore plus nécessaire pour atteindre la température cible de 160°C (essai 1) avec le lupin, qui contient déjà de la matière grasse, contrairement à la féverole.

Toutefois, malgré un relevé fin des paramètres d'entrée et de sortie des machines, il est difficile de reproduire un traitement d'extrusion rigoureusement identique sur une matière première de même nature entre deux séries. Ainsi, lors de nos deux essais *in vivo*, deux traitements d'extrusion similaires avec la même température cible de 140°C ont été mis en place pour deux mélanges de composition apparemment identiques : 90 % de féverole associés à 10 % de lin. Les paramètres d'entrée des extrudeurs étaient identiques (même rapport longueur/diamètre des fûts, même surface de sortie du produit, même niveau de compression). Cependant, les paramètres de sortie ont révélé que le traitement d'extrusion avait été moins intense pour le second traitement (essai 2) que pour le premier (essai 1) : les températures du produit de l'essai 2 ont été inférieures à celles du produit de l'essai 1 (125°C contre 143°C dans la dernière section) et l'intensité d'extrusion et la puissance mécanique déployée ont été plus faibles avec le produit de l'essai 2 qu'avec le produit de l'essai 1 (70 % contre 92 % d'intensité, et 79 kW contre 103 kW de puissance mécanique, respectivement). Cette difficulté à obtenir des traitements rigoureusement identiques sur deux séries différentes a pu être due à une différence de composition chimique entre les deux mélanges (teneurs en protéines, amidon et matière grasse), à une modification différente de l'amidon, ou bien aux différents taux d'usures des pièces des extrudeurs utilisés (bien que l'effet de ce dernier point soit moins connu que les deux autres). Ces trois paramètres influent sur le comportement rhéologique de la matière extrudée, et par conséquent sur la soumission aux forces de cisaillement et de compression.

Concernant les différences de composition chimique, le mélange féverole + lin de l'essai 2 était plus riche en amidon et en protéines que le mélange de l'essai 1 (318 contre 290 g d'amidon/kg MS<sup>3</sup> et 314 contre 285 g de MAT/kg de MS<sup>4</sup>, respectivement).

De surcroît, la gélatinisation de l'amidon entraîne la fluidification de la matrice (Colonna et al., 1984 ; Lai et Kokini, 1991), et donc une soumission aux forces de cisaillement réduite. Lors de nos essais, l'amidon a réagi aux traitements d'extrusion son niveau de gélatinisation a été plus élevé dans le mélange de l'essai 1 que dans celui de l'essai 2 (87 % contre 79 %). Ce dernier résultat est donc surprenant, puisque cela a contribué à rendre le mélange de l'essai 1 plus fluide que celui de l'essai 2, et pourtant l'intensité d'extrusion a été plus forte pour l'essai 1. Cependant la gélatinisation n'est pas le seul phénomène de changement de nature de l'amidon lors de la cuisson-extrusion, puisque les forces de cisaillement et la chaleur qui en résulte entraînent également la fragmentation de l'amidon par exemple (Lai et Kokini, 1991).

Quant à l'usure des différentes pièces des extrudeurs, elle était de 50 % de l'usure maximale tolérée avant changement des pièces pour l'extrudeur de l'essai 1, de 45 % de l'usure maximale tolérée pour l'un des deux extrudeurs de l'essai 2 et les pièces avaient été changées la veille pour l'autre extrudeur de l'essai 2. Toutefois, l'effet de l'usure des pièces sur l'intensité de l'extrusion n'est pas encore bien connu, il est donc difficile de conclure quant à un effet plus intense ou plus faible d'une pièce neuve par rapport à une pièce usée.

Les modifications induites par l'extrusion sur les constituants chimiques de la matière première extrudée dépendent des interactions « matrice végétale × réglages de la machine ». Or, chacun de ces deux critères est très variable. C'est pourquoi il est primordial de mesurer les paramètres d'extrusion et de les prendre en compte pour comprendre les effets de l'extrusion obtenus à la fois sur la matrice végétale, et à la fois sur le métabolisme azoté des animaux qui consomment ces produits extrudés.

### III. Les limites des approches utilisées

#### 1. Les mesures *in vivo*

Les mesures *in vivo* sont indispensables pour disposer de valeurs de référence (car à ce jour il n'y a pas d'alternatives connues) mais elles sont contraignantes à mettre en place, du fait de leur coût et de la logistique associée (autorisations éthiques à obtenir pour expérimenter sur les animaux, conduites des animaux, prise et gestion des échantillons...). Ces différents arguments, associés à la pression expérimentale sur les animaux de la station expérimentale de l'INRA de

---

<sup>3</sup>Résultats obtenus sur les lots en sortie d'usine, ce qui explique la teneur en amidon du mélange de l'essai 2 différente de 10 g/kg MS par rapport à celle présentée dans la partie II des résultats de cette thèse, mesurée sur le lot utilisé dans l'essai *in vivo*

<sup>4</sup>Résultats obtenus sur les lots utilisés dans les essais *in vivo* (donc identiques à ceux présentés dans les parties I et II des résultats de cette thèse)

Theix, nous ont limités à l'utilisation de 8 animaux seulement pour le 1<sup>er</sup> essai. Compte tenu du protocole mis en place (2 carrés latins  $4 \times 4$  en parallèle), cela a entraîné une faible puissance statistique des analyses, ce qui peut en partie expliquer le fait que très peu de différences observées se sont révélées statistiquement significatives. Pour espérer observer des différences significatives dans cet essai entre les traitements sur la quantité d'azote sécrétée dans le lait, il aurait fallu disposer de 24 animaux. En effet, en prenant un écart entre deux traitements de 10 g/j d'N sécrété dans le lait (cette donnée est valable pour les deux carrés latins), dans le cas d'un test unilatéral (avec un risque de première espèce égal à 0,05 et une puissance de 0,8), il aurait fallu 3 animaux par groupe, soit 12 animaux par carré latin, soit 24 animaux pour l'ensemble de l'essai, ce qui n'était pas possible du fait du nombre d'animaux disponibles.

Par ailleurs, nous n'avons pu, pour aucun des deux essais, disposer d'animaux munis de canules duodénales. Cela a rendu impossible la mesure des flux digestifs, initialement prévue dans le projet de thèse. Nous nous sommes donc servis d'indicateurs indirects pour estimer la dégradation des protéines dans le rumen (la teneur en  $\text{NH}_3$  du jus de rumen) et l'absorption intestinale des protéines (les teneurs en AA plasmatiques). Toutefois, l'utilisation de la teneur en  $\text{NH}_3$  du jus de rumen comme indicateur de la dégradation des protéines dans le rumen n'est pas sans biais, puisque cette teneur ne dépend pas seulement de la production de  $\text{NH}_3$  à partir des protéines alimentaires hydrolysées et désaminées par les microorganismes du jus de rumen, mais dépend aussi de son utilisation par les microorganismes, des échanges avec l'urée à travers la paroi du rumen et le recyclage par la salive, ainsi que des phénomènes de transit dans le tube digestif. De même, la teneur en AA plasmatiques est la résultante de l'équilibre en AA absorbés via la paroi intestinale et en AA utilisés par le métabolisme de l'animal (métabolisation par le foie, par les tissus périphériques, par les membranes plasmiques, etc.).

Enfin, une limite à l'étude scientifique à l'emploi des protéagineux comme à la valorisation de ces travaux a été la dose de féverole et de lupin nécessaire à introduire dans les rations des vaches pour optimiser la réponse des animaux, et ainsi s'assurer d'effets visibles de leur incorporation dans les rations. La féverole a été apportée à hauteur de 25 % et 30 % de la MS selon l'essai, et le lupin a été apporté à hauteur de 18,5 % de la MS dans le 1<sup>er</sup> essai. D'une part, même si ces rations étaient équilibrées, ces quantités sont difficilement atteignables en conditions d'élevage de terrain du fait du coût de ces aliments à l'heure actuelle, ce qui pénalise la valorisation de ces résultats en condition d'élevage. Effectivement, en 2019, la conjoncture économique n'est pas favorable à l'achat de féverole. D'autre part, il serait très difficile d'augmenter le niveau d'incorporation de ces graines dans les rations pour maximiser les réponses des animaux et observer des effets zootechniques significatifs. En effet, bien qu'il n'y ait eu aucun problème d'ingestion ni de santé avec des rations contenant 25 % de féverole et 18,5 % de lupin, la ration contenant 30 % de féverole a nécessité d'augmenter la part de foin dans la ration (en substitution pour moitié à l'ensilage de maïs et pour moitié à l'ensilage d'herbe) pour éviter les risques d'acidose, et dans le cadre de cet essai du bicarbonate de sodium a été distribué de façon systématique pour tamponner le milieu ruminal afin de contrebalancer ce niveau d'ingestion élevé d'amidon.

Bien que les essais mis en place dans ce travail aient été réalisés en conditions *in vivo*, les contraintes imposées par la rigueur méthodologique des essais scientifiques ne permettent pas de se placer dans des conditions habituelles d'élevage, ce qui limite partiellement la valorisation de ces résultats en conditions de terrain.

## 2. Les méthodes d'estimation de la valeur azotée des protéagineux

### a. Mesure de la dégradabilité théorique de l'azote dans le rumen

L'estimation de la valeur PDI des aliments nécessite de connaître la valeur de  $DT_N$  de l'azote de ces aliments. Pour déterminer cette  $DT_N$ , deux méthodes ont pu être utilisées dans ce travail : l'estimation de la  $DT_N$  à partir de la mesure de la dégradabilité enzymatique (DE1) de l'azote (Aufrère et al., 1989, 1991) et le calcul de la  $DT_N$  à partir des mesures d'incubation des aliments dans le rumen, en intégrant des hypothèses sur leur taux de transit. Classiquement, un taux de renouvellement particulière constant égal à 6 %/h ( $DT_{6N}$ ) est appliqué (Michalet-Doreau et al., 1987 ; INRA, 2007, 2010). Dans la révision récente du système PDI (INRA, 2018), la variabilité des taux de passage des fractions solubles et particulières en fonction des caractéristiques de la ration est prise en compte (INRA, 2018). Toutefois, par souci de simplification, nous nous sommes intéressés uniquement à la  $DT_{6N}$  dans cette discussion générale, notamment car c'est la  $DT_{6N}$  qui est calculée à partir de la DE1, ou encore qui est le plus souvent indiquée dans les publications scientifiques.

La comparaison entre les deux approches utilisées dans ce travail est présentée dans le [Tableau 9](#) et illustrée dans la [Figure 22](#).

Tableau 9 : comparaison des différentes méthodes d'évaluation de la  $DT_{6N}$

Essai <i>in vivo</i>	Aliment	DE1, %	$DT_{6N}$ prédite à partir de la DE1, %	$DT_{6N}$ mesurée, %	$DT_{6N}$ Tables <sup>1</sup> , %
1	Féverole FC	81,2	92,5	83,5	82
	Féverole FE1	35,5	66,4	66,6	65
	Féverole FE2	34,6	66,1	67,9	65
	Lupin LC	83,6	93,4	92,6	86
	Lupin LE1	47,4	70,7	67,3	67
	Lupin LE2	53,1	72,7	66,5	67
	Tourteau de soja	27,6	61,4	68,7	63
2	Féverole CRU	81,8	92,7	90,9	82
	Féverole EXT	38,7	67,5	65,2	65
	Féverole SUC	39,8	67,9	68,7	65
	Féverole ENZ	46,0	70,2	70,5	65

<sup>1</sup>INRA, 2018

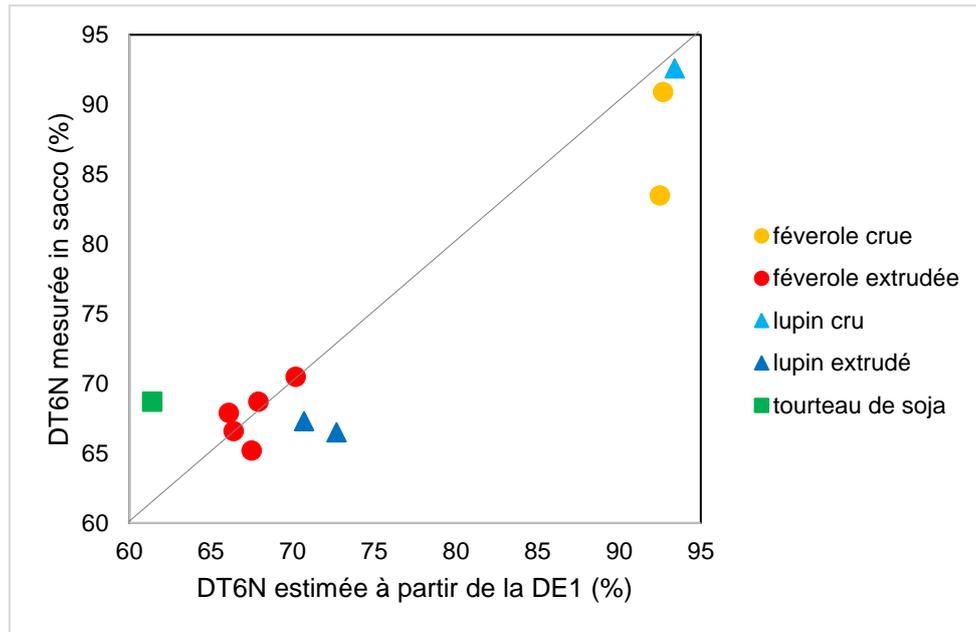


Figure 22 : comparaison méthodologique : DT<sub>6N</sub> issue des mesures *in sacco* en fonction de la DT<sub>6N</sub> estimée par la DE1

Comme classiquement observé pour tous les aliments dans le modèle d'Aufrère et al. (1989 et 1991), les valeurs de DT<sub>6N</sub> sont plus élevées que les valeurs de DE1 utilisées pour les prédire. Les valeurs de DT<sub>6N</sub> obtenues à partir des mesures *in sacco* sont très proches des valeurs de DT<sub>6N</sub> estimées par la DE1 pour la graine de féverole (sauf pour la féverole crue de l'essai 1), mais apparaissent supérieures pour le tourteau de soja et inférieures pour le lupin, notamment quand il est extrudé (Figure 22). Cela confirme que le modèle d'Aufrère et al. (1989 et 1991) est pertinent pour prédire la DT<sub>6N</sub> à partir de la DE1, en particulier pour la graine de féverole.

L'exactitude de cette prévision dépend toutefois de la qualité de la mesure de la DT<sub>6N</sub> par la méthode des sachets de nylon. En effet, il y a un risque de surestimation de la DT<sub>6N</sub>, cette méthode semblant moins appropriée aux graines protéagineuses qu'à d'autres matières premières, en raison de la solubilité de leur fraction azotée (Rémond et al., 2003) mais aussi du fait de leur granulométrie particulière qui présente une proportion importante de fines particules, comme l'ont observé Maaroufi et al. (2000) sur le pois. Ces fines particules sont effectivement susceptibles de conduire à des pertes particulières lors des incubations *in sacco* (Lund et al., 2008). Dans le calcul de la DT<sub>6N</sub>, cette fraction perdue à travers les mailles des sachets est classiquement considérée comme totalement dégradée, augmentant ainsi artificiellement la fraction « a » (au détriment de la fraction « b ») du modèle d'Ørskov et McDonald (1979) et surestimant de ce fait la valeur de DT<sub>6N</sub> en cas de pertes particulières importantes. Il est de ce fait primordial de s'assurer de la qualité des sachets de nylon utilisés, et notamment de la régularité des mailles, afin que les pores ne soient pas trop grands et ne laissent ainsi pas s'échapper trop de matière.

Pour illustrer ce dernier point, il faut noter que suite à des mesures *in sacco* préliminaires de DT<sub>6N</sub> sur les produits étudiés dans cette thèse, qui aboutissaient à des résultats systématiquement supérieurs à ceux prédits par la DE1, des travaux ont été engagés dans le

cadre du projet PROLEVAL, mais en dehors du périmètre de cette thèse, afin de quantifier ces pertes particulières, notamment sur les aliments à base de féverole et de lupin étudiés dans ce travail. Pour ce faire, plusieurs essais ont été mis en place avec l'aide de la société Improve (Dury, 80480, France) sous la responsabilité de Patrick Chapoutot (Motte, 2019, non publié). Ils ont consisté en 3 phases : la mesure de la granulométrie des particules insérées dans les sachets de nylon suite à différentes modalités de broyage, et ce en milieu sec ou humide ; la caractérisation morpho-granulométrique des pores des sachets utilisés pour les incubations dans le rumen ; et la quantification des pertes particulières par agitation, en milieu sec et en milieu liquide. Les agitations en milieu sec simulaient les pertes pendant les phases de transport et de manipulation des sachets, tandis que celles en milieu liquide représentaient les pertes lors de l'incubation des sachets dans le rumen et leur lavage en sortie de rumen. Les premières conclusions de ces différents travaux sont présentées ci-dessous.

Les profils granulométriques en milieu sec des échantillons ont varié selon leurs conditions de broyage. La vitesse de rotation du broyeur a plus influencé la taille des particules de l'échantillon que le diamètre des vides de la grille du broyeur, une vitesse de broyage plus élevée favorisant l'apparition de particules fines. Les mesures de granulométrie en milieu liquide ont montré que l'extrusion entraîne des particules plus fines, et que les particules de féverole sont plus agglomérées que celles du lupin.

Les mesures réalisées *a posteriori* sur les sachets de nylon employés dans ces essais préliminaires, de la marque Ankom classiquement utilisée par l'UMR MoSAR, ont montré que les pores étaient plutôt centrés sur un diamètre de 80  $\mu\text{m}$  environ et les plus grandes mailles pouvaient dépasser 100  $\mu\text{m}$  de largeur. Ces résultats ont, hélas, révélé une non-conformité des sachets par rapport aux garanties commerciales du fabricant (sachets supposés être calibrés sur  $50 \pm 10 \mu\text{m}$ ). Les résultats préliminaires obtenus surestimaient donc réellement les valeurs de  $DT_{6N}$  des produits étudiés, ce qui a nécessité de mesurer à nouveaux ces valeurs, avec des sachets d'une autre marque, SEFAR, dont le vide de maille était conforme à ce qui était annoncé par le fabricant (48  $\mu\text{m}$ ).

La quantification des pertes particulières a montré que les pertes particulières en voie sèche, correspondant à des pertes physiques, ont varié de 20 à près de 50 % selon les aliments expérimentaux et les paramètres de broyage (plus de pertes pour la féverole que pour le lupin, pour les aliments extrudés que pour les aliments crus, avec une vitesse de broyage élevée). Par ailleurs, les pertes en milieu liquide (pertes physiques et de solubilisation) ont également pu atteindre 45 % de la MS, dont l'essentiel correspond aux pertes physiques). Le fait qu'il y ait eu plus de pertes particulières avec les aliments extrudés est cohérent avec le fait que les particules étaient plus fines avec les graines extrudées, et expliquent les écarts entre les  $DT_{6N}$  issue des DE1 et les  $DT_{6N}$  calculées à partir des mesures *in sacco* qui étaient plus marqués avec les produits extrudés.

Ces résultats montrent que la mesure de la  $DT_N$  par la méthode des sachets de nylon - telle qu'elle est appliquée actuellement - n'est pas parfaitement adaptée dans le cas des graines protéagineuses crues et surtout extrudées, en raison de leur teneur importante en azote soluble, de leur granulométrie particulièrement fine et de l'impact de cette forme de présentation sur les

pertes de particules hors des sachets. Cependant, les résultats présentés dans cette thèse, soit obtenus à partir de mesures expérimentales sur nos aliments, soit obtenus à partir de l'analyse des résultats issus de la bibliographie, montrent que le classement des graines crues contre les graines extrudées reste permis par la méthode des sachets de nylon. Il faudrait toutefois prendre en compte ces pertes particulières pour corriger le calcul des valeurs de  $DT_{6N}$  à partir des mesures *in sacco* et ainsi en améliorer la précision.

Enfin, les valeurs de  $DT_{6N}$  des aliments à base de protéagineux présentées dans le [Tableau 9](#) et sur la [Figure 22](#) sont parfois supérieures aux valeurs Tables (INRA, 2018). Le fait que les valeurs de  $DT_{6N}$  des aliments à base de protéagineux soient supérieures aux valeurs Tables étaye également l'hypothèse que la  $DT_{6N}$  issue de la méthode des sachets de nylon a été légèrement surestimée, bien que, par construction, les valeurs Tables sont basées sur un nombre de données beaucoup plus large, avec une importante variabilité du fait de la diversité des méthodes de mesure utilisées qui diffèrent parfois de la méthodologie standardisée.

La dégradation de la lysine dans le rumen a été inférieure à celle des MAT, et cet écart est plus important pour les graines extrudées que pour les graines crues ([Tableau 5](#) et [Tableau 6](#)). Inversement, la dr de la lysine a été systématiquement supérieure à celle de l'azote ([Tableau 5](#) et [Tableau 6](#)). Ces résultats sont contraires aux hypothèses retenues pour l'élaboration du système AADI (Acides aminés Digestibles dans l'Intestin), puisqu'il est supposé que la dégradabilité de chacun des AA est identique à celle des MAT, et que leur digestibilité réelle est identique à celle des protéines by-pass (Rulquin et al., 2001). Inversement, Lund et al. (2008) rapportent que la DT de la lysine est égale à la  $DT_N$  avec du pois expansé à 115°C mais que cette DT de la lysine est supérieure à la  $DT_N$  avec du pois cru ou du pois expansé à 130°C. De même, Benchaar et al. (1994) ont observé une plus forte disparition de la lysine dans le rumen et une plus faible disparition intestinale par rapport aux AA totaux avec du lupin extrudé, mais n'ont pas observé de différences entre la lysine et les AA totaux avec du lupin crus. L'ensemble de ces résultats, menant à des conclusions contradictoires, ne permet pas de proposer une alternative aux hypothèses du système AADI.

Cependant, ces résultats suggèrent que le flux de lysine digestible a été sous-estimé par la valeur LysDI (exprimée en % des PDI) de la ration dans nos essais. Les teneurs calculées en lysine digestible (LysDI) de l'essai 1 étaient supérieures aux recommandations (7 % des PDI, Sauvant et al., 2018a) pour les régimes à base de féverole (entre 7,09 et 7,18 % des PDI selon le traitement) mais légèrement inférieures pour les régimes à base de tourteau de soja (6,82 % des PDI) et de lupin (entre 6,44 et 6,85 % des PDI selon le traitement), mais elles étaient supérieures aux recommandations pour l'essai 2 (entre 7,2 et 7,3 % des PDI selon le traitement). D'après les lois de réponses de la sécrétion de MP du lait à des apports de LysDI (Savant et al., 2018a), pour le régime tourteau de soja de l'essai 1, cet apport limité en LysDI n'aurait eu probablement qu'un impact négligeable sur les MP du lait ; pour le régime lupin extrudé à 140°C, l'impact attendu aurait été de l'ordre de -15 g de protéines (2,5 g d'N) par jour.

Pour autant, lors des deux essais *in vivo*, les teneurs en lysine plasmatique n'ont pas varié entre les traitements.

*b. Mesure de la digestibilité réelle intestinale de l'azote*

La digestibilité de l'N dans l'intestin a été calculée par différence à partir des mesures en sachets mobiles dans le rumen et l'intestin (Michalet-Doreau et al., 1987 ; INRA, 2018). Les aliments crus ont présenté une plus forte dégradabilité de l'N dans le rumen, mais à l'inverse une digestibilité de l'N dans le duodénum plus faible que les aliments extrudés. En effet, les valeurs dr de l'N des graines crues ont été entre 20 et 30 points inférieures à celles des graines extrudées, mais restent cohérentes avec les valeurs Tables (Baumont et al., 2018c). De plus, cette mesure de digestibilité de l'N dans le duodénum n'a pas permis de discriminer les différents traitements d'extrusion.

Cependant, la dégradabilité de l'azote dans le rumen et sa digestibilité dans le duodénum ne sont pas totalement indépendantes. En effet, lorsque la dégradation dans le rumen est importante, le faible flux de protéines alimentaires qui arrive au duodénum pourrait exacerber l'impact d'une éventuelle contamination microbienne des particules alimentaires sortant du rumen, en proportion relative plus importante que dans le cas des produits extrudés, et expliquer ainsi les plus faibles valeurs de digestibilité de l'N dans l'intestin (Figure 23). Ce biais a également été visible pour la disparition de la CML et de la lysine dans le duodénum, qui a été plus faible avec les produits crus qu'avec les produits extrudés, et qui ne permet pas de discriminer les différents traitements d'extrusion.

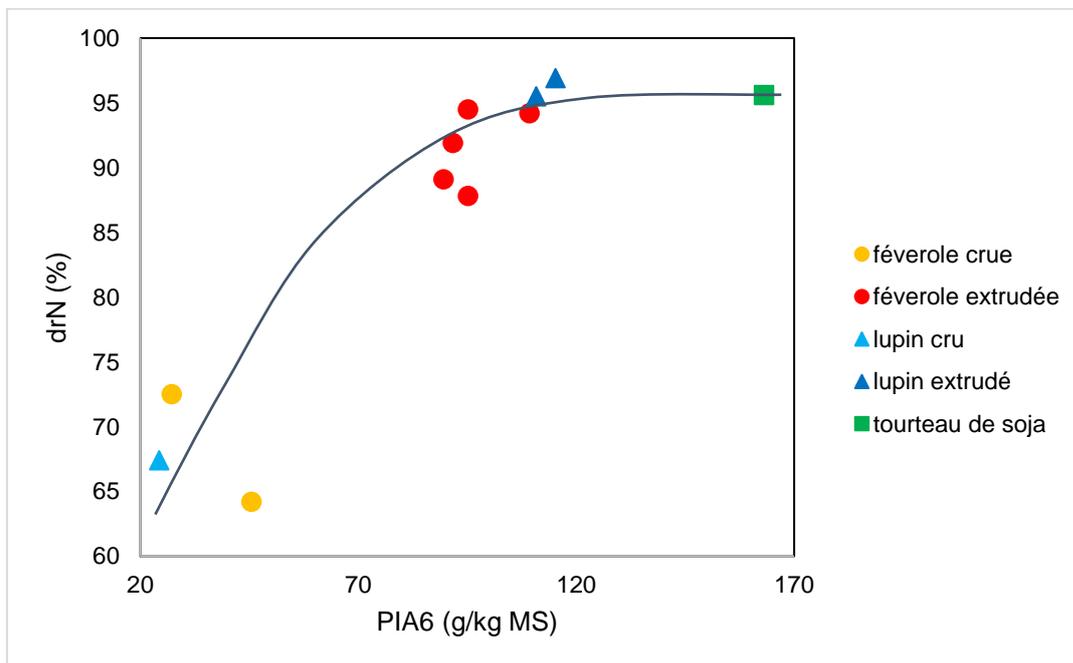


Figure 23 : dr<sub>N</sub> en fonction des PIA<sub>6</sub> calculée à partir des mesures *in sacco*

Ces résultats ne permettent pas de trancher entre les deux hypothèses suivantes : soit les protéines des graines crues sont réellement moins digestibles dans l'intestin et l'extrusion améliore cette efficacité d'utilisation digestive, soit la disparition de l'N dans le duodénum calculée ici a pu être un peu biaisée par la contamination microbienne des fractions alimentaires, et cette mesure représente en fait une valeur de digestibilité apparente - et non réelle - des protéines alimentaires, qui est fortement dépendante de leur flux au duodénum (comme constaté

chez les monogastriques). Des mesures de composés marqueurs de l'N microbien dans les résidus de la digestion intestinale permettraient de préciser leur éventuelle contamination bactérienne.

Une piste pourrait également être la partition de la digestion des protéines entre le rumen et l'intestin. Lorsque les graines sont crues, les protéines alimentaires sont très dégradées dans le rumen, donc il reste peu de protéines alimentaires qui arrivent dans l'intestin, où elles y sont peu digestibles. En revanche, lorsque les graines sont extrudées, les protéines alimentaires sont protégées d'une trop forte dégradabilité dans le rumen, plus de protéines alimentaires arrivent dans l'intestin, où elles y sont plus digestibles.

Par ailleurs, le fait que la  $dr_N$  n'ait pas permis de distinguer les différents traitements d'extrusion peut s'expliquer soit par le fait qu'il n'y a réellement pas de différence due aux modalités technologiques appliqués aux aliments, soit par le fait que les différences ne peuvent pas être mises en évidence par le dispositif expérimental.

### *c. Synthèse protéique microbienne*

Tout le travail de cette thèse a été mené sur les valeurs PDI et notamment les valeurs PDIA des aliments, c'est-à-dire sur les protéines d'origine alimentaire (apportées soit par le tourteau de soja, soit par les graines protéagineuses extrudées ou non). En revanche, aucune mesure directe n'a été faite pour évaluer l'effet de l'utilisation des graines protéagineuses, et de leur extrusion, sur les flux de protéines microbiennes et donc sur les valeurs PDIM des aliments. En effet, l'hypothèse initiale à ce propos était que l'extrusion n'aurait pas d'effet sur la synthèse microbienne. Pour vérifier cette hypothèse, une approche indirecte a été mise en place sur les échantillons du 1<sup>er</sup> essai *in vivo* : différents composés dérivés des bases puriques, à savoir l'acide urique et l'allantoïne, ont été dosés dans les urines. Ces composés sont issus de l'utilisation par l'animal des bases nucléiques des microorganismes du rumen. Si la synthèse protéique dans le rumen augmente, le flux de protéines microbiennes absorbées au duodénum devrait augmenter et plus de dérivés des bases puriques pourraient se retrouver dans les urines. Les résultats, présentés ici car les dosages n'ont pas pu être faits à temps pour permettre leur inclusion dans la première publication (présentée en partie I des Résultats de ce manuscrit), sont rassemblés dans le [Tableau 10](#). Il n'y a eu aucune différence sur les flux urinaires des dérivés des bases puriques, ni entre le tourteau de soja et les graines de féverole et de lupin, ni entre les graines crues et les graines extrudées. L'hypothèse initiale a donc été vérifiée : l'utilisation des graines protéagineuses, qu'elles soient crues ou extrudées, dans l'alimentation des vaches laitières, ne semble pas avoir eu d'effet sur la synthèse protéique microbienne dans le rumen et ne modifierait pas le flux de PDIM pour l'animal.

Tableau 10 : effets de l'extrusion sur les dérivés des bases puriques

	TxS	Graine			SE	P Trt	P (Contrastes)		
		Crue	E1	E2			TxS vs graine	Crue vs extrudée	E1 vs E2
mmol/j									
<i>Féverole</i>									
Acide urique	34,8	34,3	37,8	39,0	5,86	0,380	0,384	0,156	0,709
Allantoïne	474,2	466,6	466,2	400,4	40,20	0,418	0,462	0,440	0,206
Somme	509,0	500,9	504,1	439,4	44,2	0,475	0,505	0,506	0,224
<i>Lupin</i>									
Acide urique	33,9	32,7	29,4	35,6	4,68	0,653	0,751	0,958	0,252
Allantoïne	402,3	345,9	317,7	358,3	51,32	0,652	0,293	0,894	0,559
Somme	436,2	378,6	347,1	393,8	54,3	0,649	0,304	0,895	0,522

La méthode de détermination de la DT<sub>6N</sub>, bien que validées par des méthodes *in vivo*, ne semble pas parfaitement adaptée aux graines protéagineuses, en partie du fait de pertes particulières responsables d'une surestimation de leur DT<sub>6N</sub>. De même, la mesure de la dr<sub>N</sub> sur ces graines pourrait être sensible à la contamination microbienne.

#### IV. Perspectives

Les perspectives de ce travail sont multiples. En effet, même si des traitements innovants d'extrusion ont pu être testés et validés pour remplacer le tourteau de soja dans l'alimentation des vaches laitières, plusieurs suites peuvent être envisagées au sein de ce projet de recherche.

L'analyse des bases de données construites durant la thèse a permis de dégager des grandes tendances sur les effets de l'utilisation des graines protéagineuses, traitées ou non, dans l'alimentation des VL. Cependant, les analyses présentées dans la partie IV des Résultats n'ont concerné que les graines de féverole, lupin et pois, ainsi que le tourteau de soja. De plus, pour les résultats *in vivo*, seules les vaches laitières ont été prises en compte. Or, la construction des bases permettrait dès aujourd'hui d'élargir ces travaux aux autres ruminants laitiers (brebis et chèvres, bien qu'il y ait moins de données disponibles sur les petits ruminants), ainsi que de comparer les graines protéagineuses au tourteau de colza, bien représenté dans les données disponibles. Ces bases pourraient également être élargies aux autres graines protéagineuses (comme la vesce, la gesse, le haricot, la lentille, etc.) même s'il y a peu de données disponibles sur ces graines. Ces graines sont pour le moment faiblement représentées dans les bases, du fait d'une sélection en priorité des travaux étudiant la féverole, le lupin ou le pois. Enfin, aucun travail n'a été fait sur les animaux non laitiers, mais il pourrait être intéressant d'étudier l'effet de l'incorporation des graines protéagineuses dans les rations des bovins et ovins en croissance et à l'engrais.

Les suites possibles à ce travail, présentées dans cette ultime partie de ce manuscrit de thèse, concernent dans un premier temps l'influence des traitements technologiques, suivi de l'évaluation de la valeur PDI des mélanges à base de graines protéagineuses, et enfin des aspects économiques de l'utilisation des graines protéagineuses produites en France dans les rations pour vaches laitières.

## 1. Influence des traitements technologiques

Ce travail de thèse a apporté des éléments nouveaux sur la connaissance et la compréhension des composés issus des réactions de Maillard en alimentation des ruminants. Cependant, comme vu précédemment, certains composés ont une apparition difficilement prévisible en fonction des traitements d'extrusion appliqués aux graines de féverole et de lupin. Mieux caractériser les paramètres d'extrusion, et notamment les paramètres de maturation avant extrusion, pourrait favoriser la compréhension de l'apparition des composés de Maillard. De plus, il serait intéressant d'étudier les conséquences des réactions de Maillard sur les profils en AA des graines protéagineuses, c'est-à-dire sur leur disponibilité et leur vitesse de dégradation individuelles.

Lors de cette thèse, bien que plusieurs essais aient été réalisés à l'échelle laboratoire au préalable, une seule dose d'un seul type de sucre, ainsi qu'une seule dose d'enzymes ont été testées *in vivo* lors de l'ajout à de la féverole avant extrusion à 140°C. La poursuite d'essais pour déterminer la combinaison optimale « nature du sucre réducteur × dose de sucre réducteur » pourrait être intéressante afin d'obtenir une protection optimale des protéines de la féverole dans le rumen sans pour autant diminuer leur digestibilité intestinale. De même, un travail reste à faire sur l'adaptation des procédés d'extrusion à la présence d'enzymes dans la matière première, en raison de l'ajout d'eau nécessaire au maintien de leur efficacité. Cet ajout d'eau implique de repenser les procédés d'extrusion pour obtenir le même niveau de contraintes qu'un procédé d'extrusion sans apport d'eau supplémentaire.

Dans le cadre de ce travail de thèse, seuls les aspects concernant les protéines ont été étudiés et analysés. Cependant, à l'exception du lupin, les graines protéagineuses sont également riches en amidon, et valoriser cet amidon représente aussi un argument en faveur de l'utilisation de ces graines dans les rations pour VL. Cependant, les effets de l'extrusion sur la dégradation et la digestibilité de l'amidon semblent être encore difficiles à interpréter. En effet, selon certains auteurs, l'amidon des protéagineux crus est peu dégradé dans le rumen (Focant et al., 1990) et faiblement digestible dans les intestins (Benchaar et al., 1992b) mais l'extrusion permet d'accroître sa dégradation dans le rumen, et donc d'améliorer sa digestibilité (Focant et al., 1990 ; Benchaar et al., 1992b ; Masoero et al., 2006). À l'inverse, les valeurs tables indiquent que la DT<sub>6</sub> de l'amidon diminue avec l'extrusion (par exemple 75 % pour la féverole crue et 63 % pour la féverole extrudée, INRA-CIRAD-AFZ, 2017; INRA, 2018), ce qui suggère que l'extrusion rend cet amidon moins dégradé. Les travaux d'Offner et al. (2003) apportent des précisions quant à ces aspects de dégradabilité et digestibilité de l'amidon des graines traitées thermiquement : les traitements thermiques augmentent la dégradabilité des amidons lents (par

exemple maïs ou sorgho) du fait de leur plus forte gélatinisation, mais diminuent la dégradabilité des amidons rapides (comme c'est le cas pour les protéagineux) en raison d'un potentiel effet de la protection des protéines des membranes cellulaires, ce qui réduit ainsi l'accessibilité des granules d'amidon par les enzymes des microbes du rumen.

Les traitements mis en place dans ce travail ont été élaborés dans le seul but d'optimiser la dégradation des protéines ainsi que leur absorption intestinale, et non pas dans l'objectif de valoriser au mieux l'amidon contenu dans la graine de féverole. Cependant, le paramétrage de l'extrusion pour valoriser au mieux les protéines n'est pas le même que le paramétrage nécessaire à la meilleure valorisation de l'amidon. Il pourrait être intéressant par la suite d'ajuster les traitements d'extrusion pour trouver le meilleur compromis technologique afin d'optimiser à la fois la valorisation des protéines et la valorisation de l'amidon, source d'énergie qui, avec une production adéquate de  $\text{NH}_3$  dans le rumen, peut contribuer à optimiser la synthèse de protéines microbiennes (Focant et al., 1990).

Enfin, aucun essai sur la caractérisation des traitements technologiques n'a été mis en place sur la graine de pois dans le cadre de cette thèse. Lors de l'initiation du projet PROLEVAL, les graines de féverole et de lupin ont été retenues pour leur teneur élevée en protéines (295 et 380 g MAT/kg MS pour la féverole et le lupin, respectivement), teneurs plus élevées que celle du pois (233 g MAT/kg MS). En effet, sur les campagnes 2016-2017, pour un coût de production semblable, la féverole et le lupin apportaient plus de protéines que le pois. Aujourd'hui en 2019, le contexte a changé, et le prix du pois et de la féverole se sont inversés, rendant le pois intéressant à étudier. Outre cet aspect, et malgré un plus fort tonnage de production en France de pois que de féverole et de lupin (707 000 t de pois produit en 2017 contre 212 000 t et 14 800 t pour la féverole et le lupin, respectivement, Terres Univia, 2018b), certaines barrières agronomiques à la culture du pois n'ont pas fait pencher la balance en sa faveur. En effet, la culture du pois est sensible aux insectes.

## 2. Évaluation de la valeur PDI des protéagineux

Comme évoqué dans les limites de la méthode d'évaluation des PDI, la méthode dite « *in situ* » d'incubation des aliments dans des sachets nylon insérés dans le rumen reste adaptée pour les graines protéagineuses, mais il convient (et ce quelle que soit la matière première étudiée) d'être vigilant sur la qualité du tissu de nylon utilisé pour réaliser les sachets. Les mailles doivent être les plus régulières possibles, afin d'éviter des pores plus grands que d'autres, qui favoriseraient la sortie de particules du sachet. Une perspective au travail déjà engagé serait de vérifier si le lien entre la  $\text{DE}_1$  et la  $\text{DT}_N$  peut encore être amélioré pour les graines protéagineuses, notamment les graines extrudées, grâce à la correction des valeurs par une prise en compte des pertes particulières lors de la mesure de la  $\text{DT}_N$ , qui serait alors plus précise. Cela pourrait se faire dans un premier temps en adaptant le protocole de mesure de la  $\text{DT}_N$ , puis, si les résultats sont concluants, en adaptant le modèle de prévision de la  $\text{DT}_N$  par la  $\text{DE}_1$ .

Toutefois, un autre frein important à la mesure de la  $\text{DT}_N$  et de la  $\text{dr}_N$  par incubation en sachets de nylon tend à apparaître progressivement. En effet, le recours aux animaux canulés

est de plus en plus controversé, et l'utilisation de ces animaux va être amenée à diminuer progressivement au cours des années à venir. Ainsi, l'INRA a décidé de réduire le recours à ces animaux jusqu'à disparition complète de leur utilisation en 2025 (Patrick Herpin, communication personnelle). Cela va nécessiter le développement d'alternatives à ces mesures de  $DT_N$  et de  $dr_N$ , puisqu'il ne sera plus possible d'incuber des sachets en conditions physiologiques directement dans le tractus digestif des animaux. De plus, la méthode des flux duodénaux, méthode de validation de ces incubations, ne sera plus possible non plus.

Dans cette perspective d'arrêt d'utilisation des animaux fistulés, une solution serait de développer de nouvelles méthodes alternatives à l'utilisation de ces animaux afin d'en faire de nouvelles méthodes de référence (à l'instar de ce qui existe avec la DE1 pour les aliments concentrés), ce qui impliquerait d'utiliser toutes les données disponibles de valeurs de  $DT_N$  et  $dr_N$  des aliments aujourd'hui déterminés par la méthode *in sacco* pour calibrer ces nouvelles méthodes.

Le développement de ces nouvelles méthodes alternatives devra prendre en compte l'ensemble des données aujourd'hui connues grâce à l'utilisation des animaux canulés, d'autant que la  $DT_N$  et la  $dr_N$  ne sont pas les seuls critères impliqués dans la valeur azotée des aliments, qui dépend également de la MOF, de l'efficacité de la synthèse microbienne et de la balance protéique du rumen, pour lesquels les mesures sur animaux fistulés restent encore la référence.

Une alternative à l'utilisation des animaux canulés a récemment été proposée par Dufreneix et al. (2018). L'objectif de ce travail était de proposer une nouvelle méthode d'estimation de la valeur protéique des aliments. Cette méthode est basée sur la réponse biologique de sécrétion de matières protéiques (MP) dans le lait aux variations d'apports PDI de la ration. Cette réponse positive des MP aux PDI suit une loi des rendements décroissants, mais il existe une plage de variation des apports PDI sur laquelle la réponse de l'efficacité d'utilisation des PDI peut être assimilée à une réponse linéaire (Sauvant et al., 2018a). Ainsi, avec au moins 3 régimes iso-énergétiques distribués à des vaches laitières, dont 2 aux apports protéiques connus (niveau faible et niveau élevé sur cette plage de linéarité), il est possible de déterminer les apports PDI des régimes intermédiaires de valeurs inconnues à partir de la réponse de l'efficacité des PDI. Cette méthode a été jugée pertinente pour évaluer la valeur PDI des aliments concentrés testés lorsque le fourrage de la ration de base est commun à tous les régimes.

Un autre travail très similaire à celui-là a été développé, basé non pas sur la réponse en MP du lait des animaux mais sur la teneur et le profil en AA plasmatiques (Dufreneix, 2019), bien que cette méthode soit moins facile à généraliser en raison de la diversité des profils en AA des régimes.

De telles méthodes, après développement et validation, pourraient à terme devenir les nouvelles méthodes de références d'estimation de la valeur PDI des aliments, sans avoir recours à des animaux fistulés. Ces méthodes ont l'avantage d'être moins invasives pour les animaux (voire pas du tout dans le cas de l'utilisation des MP du lait comme indicateur), permettent l'utilisation d'un plus grand nombre d'animaux du fait de l'allègement des prélèvements nécessaires (notamment par rapport à une mesure de flux duodénaux, mesure très lourde qui ne peut être réalisée que sur un nombre d'animaux restreint), et permet également de s'affranchir

des limites méthodologiques de l'utilisation des sachets de nylon (Dufreneix et al., 2018). Ces méthodes présentent toutefois quelques inconvénients. La méthode basée sur la réponse en MP du lait nécessite des formulations de régimes très précises puisque la réponse en MP est sensible aux variations d'énergie apportée dans la ration. La méthode basée sur les AA plasmatiques nécessite quant à elle de bien déterminer avec quels AA plasmatiques il est possible d'estimer l'augmentation des apports en AA duodénaux, car la relation entre les teneurs en AA duodénales et plasmatiques n'est pas linéaire pour tous les AA, et dépend potentiellement du profil en AA de la ration. Dufreneix (2019) a trouvé que la combinaison d'AA la plus sensible à la variation de PDI dans le régime était la somme de l'histidine, de la valine et de la glycine. Pour comparaison, dans nos essais *in vivo*, l'histidine a varié en fonction des différents régimes dans l'essai 1, mais pas dans l'essai 2. Au contraire, la valine n'a pas varié dans l'essai 1 mais a varié dans l'essai 2 ; et la glycine n'a varié que dans le carré latin lupin de l'essai 1 (données non présentées dans ce manuscrit). De plus, cette méthode nécessite un dosage très précis des AA plasmatiques, dosages le plus souvent coûteux. Enfin, même si la méthode basée sur la réponse en MP du lait est plus facile à mettre en œuvre (pas de mesure invasive sur les animaux et dosage de routine) et plus facile à extrapoler aux différents régimes quels que soient leurs profils en AA, elle est légèrement moins précise pour estimer les PDI de l'aliment testé que la méthode basée sur les réponses en AA plasmatiques (Dufreneix, 2019).

### 3. Aspects économiques

Les questions d'ordre économique n'ont pas du tout été abordées dans le cadre de ce travail de thèse. Cependant, l'extrusion, comme tout procédé technologique, a un coût additionnel, et il serait intéressant de savoir si les bénéfices obtenus avec l'utilisation des graines protéagineuses extrudées dans les rations des vaches laitières sont suffisants pour justifier l'augmentation de prix d'un aliment à base de protéagineux extrudés.

La question est complexe, puisque les bénéfices en question sont d'ordres multiples. Il y a d'abord les bénéfices zootechniques, à savoir par exemple une meilleure production laitière ou une sécrétion d'azote dans le lait un peu plus importante, qui peuvent être valorisées lors du prix de vente du lait. Il y a également les bénéfices sociétaux : produire du lait sans utilisation de tourteau de soja importé et OGM peut être valorisé lors de la vente du lait, grâce à une démarche de qualité ou des labels par exemple. Il y a enfin des bénéfices environnementaux à la production locale de graines protéagineuses, comme développé plus haut dans ce manuscrit (faible demande en intrants de ces cultures, effet précédent, réduction du transport des graines...).

Tous ces aspects doivent être intégrés dans le calcul des coûts et bénéfices liés à l'utilisation des graines protéagineuses extrudées dans les rations des vaches laitières.

Il faut aussi garder à l'esprit que les contextes de prix des graines protéagineuses et du tourteau de soja sont très variables, à la fois dans le temps et entre ces différentes matières premières, car ces différents produits ne répondent pas aux mêmes lois de marché. En outre, la politique de subvention de la production de graines protéagineuses est également à prendre en

compte. Tout cela peut modifier le rapport bénéfices/coûts de l'utilisation des graines protéagineuses extrudées dans les rations des vaches laitières selon les périodes.

Dans le cadre du projet PROLEVAL, à la suite du premier essai *in vivo* développé dans cette thèse, des essais dans 4 fermes commerciales ont été mis en place. L'objectif était de tester un aliment à base de féverole extrudée en conditions terrain. Ces essais ont comparé des correcteurs azotés à base de tourteau de soja ou à base de féverole extrudée dans des conditions bien spécifiques avec une source de glucose réactif, substitués l'un à l'autre de sorte que les apports en PDI et en LysDI soient les mêmes. En revanche, les apports en MetDI étaient plus faibles avec le correcteur azoté à base de féverole extrudée qu'avec le correcteur azoté à base de tourteau de soja (2,70 % des PDI contre 2,98 % des PDI, respectivement). Ces essais ont conduit à une augmentation de la production laitière (de 0,3 kg/vache/jour à 1,5 kg/vache/jour) et à une tendance à la baisse des taux (de 0 à -1,7 g/L de TB et de +0,4 à -0,75 g/L de TP). Même en se plaçant dans un contexte économique plutôt favorable au tourteau de soja d'importation, comme celui de 2017, avec un prix du lait moyen de 320 €/1000 L, ces résultats ont quand même permis d'obtenir une marge sur coût alimentaire augmentée en moyenne de 0,08 €/vache/jour, autrement dit un bénéfice de 2920 € sur l'année pour un troupeau de 100 vaches.

Pour aller plus loin avec les résultats de cet essai, dans le cadre d'une démarche de production de lait sans OGM, en faisant l'hypothèse que le surcoût d'un tourteau de soja non OGM soit estimé à 100 €/t et l'augmentation du prix du lait à 10 €/1000 L, la marge sur coût alimentaire recalculée dans ces conditions atteint en moyenne 0,2 €/vache/jour, soit un bénéfice de 7300 € pour l'année sur un troupeau de 100 vaches.

## Conclusion

---

Ce travail de thèse, inclus dans le projet PROLEVAL, avait pour objectif de tester *in vivo* des combinaisons « matière première produite en France × traitement technologique » pour remplacer le tourteau de soja importé dans les rations pour vaches laitières. Deux essais sur vaches laitières ont permis de comparer 11 régimes comprenant soit du tourteau de soja, soit de la féverole ou du lupin produits en France associés à 10 % de lin (dont 7 régimes dans lesquels ces graines étaient extrudées).

Ces essais ont montré que l'extrusion de la féverole et du lupin à une température cible de 140°C a permis une meilleure utilisation digestive de ces graines par rapport aux mêmes graines distribuées crues, mais n'a pas modifié la partition de l'azote. Par rapport au tourteau de soja, ce traitement a permis une meilleure production laitière avec la féverole, mais a entraîné une diminution du TB du lait avec le lupin. En revanche, l'extrusion de la féverole et du lupin à une température cible de 160°C a conduit à une surprotection des protéines dans l'intestin, sans toutefois modifier la partition de l'azote ni pénaliser la production laitière. La maturation de la féverole avec des sucres réducteurs avant l'extrusion à 140°C a également conduit à une surprotection des protéines dans l'intestin et à une chute de TB dans le lait. En revanche, la maturation avec un cocktail enzymatique n'a semblé modifier ni la digestion des protéines par rapport au traitement d'extrusion simple, ni la production laitière. Aucun de ces deux traitements de maturation n'a permis de modifier la partition de l'azote. Ainsi, dans des conditions d'apport en méthionine non limitant, les graines de féverole et de lupin extrudées à 140°C, mélangées à 10 % de lin, peuvent se substituer au tourteau de soja dans la ration des vaches laitières sans pénaliser l'ingestion et la production laitière, ni modifier de façon significative la partition d'azote, mais en diminuant le taux butyreux du lait. Les résultats obtenus lors des essais *in vivo* menés dans le cadre de cette thèse sont cohérents avec les résultats *in situ* obtenus sur les aliments expérimentaux, et ce malgré l'incertitude assez forte sur l'évaluation des valeurs PDI des aliments et sur les écarts d'apport de PDI qu'il est possible de générer avec l'apport de ces graines protéagineuses dans les rations pour vaches laitières.

Ces résultats originaux ont permis d'une part de confirmer les tendances qui se dégagent de la synthèse des rares résultats bibliographiques, et d'autre part de mieux comprendre les mécanismes impliqués. En effet, concernant l'utilisation des graines protéagineuses crues ou traitées, les données publiées disponibles jusqu'alors regroupant à la fois des mesures aux niveaux digestif et plasmatique, des performances laitières et de la partition de l'azote sont rares. Les traitements thermiques des graines protéagineuses sont par ailleurs très peu décrits, rendant difficile l'interprétation des effets de ces traitements sur la protection des protéines et leur valorisation par les animaux. De ce fait, dans cette thèse, nous avons mesuré simultanément l'ensemble de ces paramètres lors des essais *in vivo* dédiés aux effets des conditions d'extrusion des graines protéagineuses, avec en plus une caractérisation fine des aliments distribués aux animaux (dégradabilité ruminale et digestibilité intestinale) et des conditions d'extrusion.

Enfin, et pour la première fois chez les ruminants, l'apparition des composés de Maillard et la teneur en lysine dans les aliments extrudés, leur devenir dans le tube digestif et leur impact sur l'utilisation des protéines par l'animal ont également été étudiés pour mieux caractériser la protection des protéines induite par l'extrusion.

L'analyse des composés de Maillard et de la lysine a montré que la protection apportée par l'extrusion dans des conditions maîtrisées a été particulièrement intéressante, puisqu'elle permet de diminuer la dégradabilité des protéines dans le rumen sans pour autant pénaliser leur digestibilité dans l'intestin, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus *in vivo*. Quant aux conditions d'extrusion, elles sont dépendantes à la fois de la matière première végétale utilisée et des réglages de la machine en fonction de l'intensité du traitement souhaité. Ces réglages doivent être finement définis afin d'optimiser la valorisation de cette matière première végétale. Il est donc nécessaire d'étudier ces conditions d'extrusion, afin de mieux comprendre leurs effets sur l'utilisation des graines protéagineuses extrudées dans l'alimentation des vaches laitières.

L'ensemble des résultats obtenus dans ce travail de thèse confirme que les graines protéagineuses extrudées peuvent être utilisées dans l'alimentation des vaches laitières, même hautes productrices, à la place du tourteau de soja, à conditions de bien maîtriser les conditions d'extrusion qui doivent être adaptées à la matrice végétale à extruder.

# Références bibliographiques

---

- Agri semences. 2014. Agri Semences. <http://www.agri-semences.com/products/pois-altesse/>. Consulté le 10/07/2019.
- Aguilera, J.F., M. Bustos, and E. Molina. 1992. The degradability of legume seed meals in the rumen: effect of heat treatment. *Animal Feed Science and Technology* 36:101–112.
- Aufrère, J., D. Graviou, C. Demarquilly, R. Vérité, B. Michalet-Doreau, and P. Chapoutot. 1989. Aliments concentrés pour ruminants : prévision de la valeur azotée PDI à partir d'une méthode enzymatique standardisée. *INRA Productions animales* 2:249–254.
- Aufrère, J., D. Graviou, C. Demarquilly, R. Vérité, B. Michalet-Doreau, and P. Chapoutot. 1991. Predicting in situ degradability of feed proteins in the rumen by two laboratory methods (solubility and enzymatic degradation). *Animal Feed Science and Technology* 33:97–116. doi:10.1016/0377-8401(91)90049-X.
- Baumont, R., D. Sauvant, G. Maxin, P. Chapoutot, and P. Nozière. 2018a. Méthodes d'évaluation de la valeur des aliments et bases de données. Quae. Wageningen Academic Publishers, Pays-Bas.
- Baumont, R., D. Sauvant, G. Maxin, P. Chapoutot, G. Tran, A. Boudon, S. Lemosquet, and P. Nozière. 2018b. Calcul de la valeur des aliments pour les ruminants : tables et équations de prévision. Quae. Wageningen Academic Publishers, Pays-Bas.
- Baumont, R., G. Tran, P. Chapoutot, G. Maxin, D. Sauvant, V. Heuzé, S. Lemosquet, and A. Lamadon. 2018c. Tables Inra de la valeur des aliments utilisés en France et dans les régions tempérées. Quae. Wageningen.
- Bayourthe, C., R. Moncoulon, and F. Enjalbert. 1998. Effect of extruded lupin seeds as a protein source on lactational performance of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 72:121–131.
- Benchaar, C., P. Cros, and C. Bayourthe. 1992a. Effect of extruding horsebeans and lupin seeds on in situ rumen degradation and intestinal digestibility of seed protein in non lactating cows. Pages 501–502 1ère conférence européenne sur les protéagineux, Angers.
- Benchaar, C., R. Moncoulon, C. Bayourthe, and M. Vernay. 1994. Effects of a supply of raw or extruded white lupin seeds on protein digestion and amino acid absorption in dairy cows.. *Journal of animal science* 72:492–501.
- Benchaar, C., M. Vernay, C. Bayourthe, and R. Moncoulon. 1992b. Effet de l'extrusion de la féverole (*Vicia faba*) sur les flux intestinaux d'azote et d'amidon chez la vache laitière en production. *Reproduction Nutrition Development* 32:265–275.

- Berger, P., V. Menut, and I. Potier. 1992. L'extrusion du lupin blanc doux. Association Proméagineux Poitou-Charentes, Poitiers.
- Bouvarel, I., M. Lessire, A. Narcy, E. Duval, S. Grasteau, A. Quinsac, C. Peyronnet, G. Tran, and V. Heuze. 2014. Des sources de protéines locales pour l'alimentation des volailles : quelles voies de progrès ? OCL 21:D405. doi:10.1051/ocl/2014014.
- Burel, C., T. Boujard, F. Tulli, and S.J. Kaushik. 2000. Digestibility of extruded peas, extruded lupin, and rapeseed meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 188:285–298. doi:10.1016/S0044-8486(00)00337-9.
- Cetiom. 2003. Graines entières de soja : de l'énergie et des protéines. 4p.
- Chambres d'Agriculture Auvergne-Rhône-Alpes. 2016. Le lupin en bio. De sa culture à son utilisation par les animaux ruminants et monogastriques. [http://rhone-alpes.synagri.com/synagri/pj.nsf/TECHPJPARCLEF/16728/\\$File/lupin-271216.pdf?OpenElement](http://rhone-alpes.synagri.com/synagri/pj.nsf/TECHPJPARCLEF/16728/$File/lupin-271216.pdf?OpenElement). consulté le 27/02/2019.
- Cherif, C., F. Hassanat, S. Claveau, J. Girard, R. Gervais, and C. Benchaar. 2018. Faba bean (*Vicia faba*) inclusion in dairy cow diets: Effect on nutrient digestion, rumen fermentation, nitrogen utilization, methane production, and milk performance. *Journal of Dairy Science* 101:8916–8928. doi:10.3168/jds.2018-14890.
- Chilliard, Y., C. Martin, J. Rouel, and M. Doreau. 2009. Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. *Journal of Dairy Science* 92:5199–5211. doi:10.3168/jds.2009-2375.
- Colonna, P., J.L. Doublier, J.P. Melcion, F. de Monredon, and C. Mercier. 1984. Extrusion cooking and drum drying of wheat starch. I. Physical and macromolecular modifications. *Cereal Chemistry* 61:538–543.
- Cozzi, G., A. Boukha, B. Contiero, and F. Gottardo. 2010. Extruded pea (*Pisum sativum*) as alternative to soybean protein for dairy cows feeding in organic Alpine farms. *Italian Journal of Animal Science* 9. doi:10.4081/ijas.2010.e38.
- Crépon, K., P. Marget, C. Peyronnet, B. Carrouée, P. Arese, and G. Duc. 2010. Nutritional value of faba bean (*Vicia faba* L.) seeds for feed and food. *Field Crops Research* 115:329–339. doi:10.1016/j.fcr.2009.09.016.
- Cuvelier, C., J.-L. Hornick, Y. Beckers, E. Froidmont, E. Knapp, L. Istasse, and I. Dufrasne. 2015. L'alimentation de la vache laitière. *Physiologie et besoins*.
- Deacon, M.A., G. De Boer, and J.J. Kenelly. 1988. Influence of jet-sploding and extrusion on ruminal and intestinal disappearance of canola and soybeans. *Journal of Dairy Science* 71:745–753.
- Drogoul, C., R. Gadoud, M.-M. Joseph, R. Jussiau, M.-J. Lisberney, B. Mangeol, L. Montméas, and A. Tarrit. 2004. *Nutrition et alimentation des animaux d'élevage*. Educagri éd., Dijon.

- Duc, G., C. Mignolet, B. Carrouée, and C. Huyghe. 2010. Importance économique passée et présente des légumineuses : Rôle historique dans les assolements et facteurs d'évolution. *Innovations Agronomiques* 11:1–24.
- Dufreneix, F. 2019. Variations et estimation de la valeur protéique des sources azotées dans l'alimentation de la vache. Rennes, France.
- Dufreneix, F., J.-L. Peyraud, and P. Faverdin. 2018. Estimation d'une nouvelle méthodologie pour estimer la valeur protéique des aliments à partir de la réponse en matière protéique du lait chez la vache laitière. Pages 153–156 *Rencontres autour de la Recherche sur les Ruminants*, Paris, France.
- Emile, J.C., C. Huyghe, and L. Huguet. 1991. Utilisation du lupin blanc doux pour l'alimentation des ruminants : résultats et perspectives. *Annales de Zootechnie* 40:31–44.
- Erbersdobler, H.F., and V. Somoza. 2007. Forty years of furosine – Forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods. *Molecular Nutrition & Food Research* 51:423–430. doi:10.1002/mnfr.200600154.
- Focant, M., A. Van Hoecke, and M. Vanbelle. 1990. The Effect of Two Heat Treatments (Steam Flaking and Extrusion) on the Digestion of *Pisum sativum* in the Stomachs of Heifers. *Animal Feed Science and Technology* 28:303–313.
- Froidmont, E., and N. Bartiaux-Thill. 2004. Suitability of lupin and pea seeds as a substitute for soybean meal in high-producing dairy cow feed. *Animal Research* 53:475–487. doi:10.1051/animres:2004034.
- Froidmont, E., M. Bonnet, R. Oger, V. Decruyenaere, J.M. Romnée, Y. Beckers, and N. Bartiaux-Thill. 2008. Influence of the grinding level and extrusion on the nutritional value of lupin seed (*Lupinus albus*) for cattle in the context of the Dutch protein evaluation system. *Animal Feed Science and Technology* 142:59–73. doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.07.002.
- Froidmont, E., and P. Leterme. 2005. La valorisation des protéagineux dans l'alimentation du bétail. *Productions et nutrition animales. CRA-W et ENVL*.
- Gérard, C., and M. Jarrin. 2015. Effet de la substitution d'un tourteau de soja tanné au formaldéhyde par un soja traité chaleur-sucre (process 3P) sur les performances des vaches laitières. Page 262 *Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants*, Paris.
- Giger, S., and D. Sauvant. 1983. Comparaison de différentes méthodes d'évaluation du coefficient d'utilisation digestive des aliments concentrés par le ruminant. *Annales de Zootechnie* 32:215–246.
- Grosjean, F., A. Bourdillon, F. Rudeaux, D. Bastianelli, C. Peyronnet, G. Duc, and L. Lacassagne. 2000. Valeur alimentaire pour la volaille de féveroles isogéniques (*Vicia faba* L.) avec ou sans tannins et avec ou sans vicine. *Sciences Techniques Avicoles* 32:17–24.

- Guillaume, B., D.E. Otterby, J.G. Linn, M.D. Stern, and D.G. Johnson. 1987. Comparison of Sweet Lupin Seeds with Soybean Meal as a Protein Supplement for lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 2339–2348.
- Helou, C., D. Marier, P. Jacolot, L. Abdennebi-Najar, C. Niquet-Léridon, F.J. Tessier, and P. Gadonna-Widehem. 2014. Microorganisms and Maillard reaction products: a review of the literature and recent findings. *Amino Acids* 46:267–277. doi:10.1007/s00726-013-1496-y.
- Heuzé, V., H. Thiollet, G. Tran, M. Lessire, and F. Lebas. 2018a. Yellow lupin (*Lupinus luteus*) seeds.. Feedipedia, a programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO.
- Heuzé, V., G. Tran, R. Delagarde, M. Lessire, and F. Lebas. 2018b. Faba bean (*Vicia faba*). Feedipedia, a programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO.
- Heuzé, V., G. Tran, S. Giger-Reverdin, J. Noblet, D. Renaudeau, M. Lessire, and F. Lebas. 2017. Pea seeds.. Feedipedia, a programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO.
- Hristov, A.N., A. Bannink, L.A. Crompton, P. Huhtanen, M. Kreuzer, M. McGee, P. Nozière, C.K. Reynolds, A.R. Bayat, D.R. Yáñez-Ruiz, J. Dijkstra, E. Kebreab, A. Schwarm, K.J. Shingfield, and Z. Yu. 2019. Invited review: Nitrogen in ruminant nutrition: A review of measurement techniques. *Journal of Dairy Science*. doi:10.3168/jds.2018-15829.
- Ingalls, J.R., J.A. McKirdy, and H.R. Sharma. 1980. Nutritive value of faba beans in the diets of young Holstein calves and lactating dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science* 60:689–698.
- INRA. 2007. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux - Valeurs des aliments - Tables INRA 2007. Quae. Versailles, France.
- INRA. 2010. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux - Valeurs des aliments - Tables INRA 2007, mise à jour 2010. Quae. Paris, France.
- INRA. 2018. L'alimentation des ruminants: [apports nutritionnels, besoins et réponses des animaux, rationnement, tables des valeurs des aliments]. Quae. Paris, France.
- INRA-CIRAD-AFZ. 2017. INRA-CIRAD-AFZ Feed Tables.
- Karstensen, J., G.P. Peters, and R.M. Andrew. 2013. Attribution of CO<sub>2</sub> emissions from Brazilian deforestation to consumers between 1990 and 2010. *Environmental Research Letters* 8:024005. doi:10.1088/1748-9326/8/2/024005.
- Kaysi, Y., and J.P. Melcion. 1992. Traitements technologiques des protéagineux pour le monogastrique: exemples d'application à la graine de féverole. *INRA Productions animales* 5:3–17.
- Khorasani, G.R., E.K. Okine, R.R. Corbett, and J.J. Kenelly. 2001. Nutritive value of peas for lactating dairy cattle. *Canadian Journal of Animal Science* 81:541–551.

- Kristensen, E.S., P.D. Møller, and T. Hvelplund. 1982. Estimation of the Effective Protein Degradability in the Rumen of Cows Using the Nylon Bag Technique Combined with the Outflow Rate. *Acta Agriculturae Scandinavica* 32:123–127. doi:10.1080/00015128209435738.
- Kung, L., K. Maciorowski, K.M. Powell, S. Weidner, and D.L. Eley. 1991. Lupin as a protein supplement for growing lambs. *J. Anim. Sci* 3398–3405.
- Lai, L.S., and J.L. Kokini. 1991. Physicochemical changes and rheological properties of starch during extrusion. (A review). *Biotechnology Progress* 7:251–266.
- Lardy, G.P., B.A. Loken, V.L. Anderson, D.M. Larson, K.R. Maddock-Carlin, B.R. Ilse, R. Maddock, J.L. Leupp, R. Clark, J.A. Paterson, and M.L. Bauer. 2009. Effects of increasing field pea (*Pisum sativum*) level in high-concentrate diets on growth performance and carcass traits in finishing steers and heifers. *Journal of Animal Science* 87:3335–3341. doi:10.2527/jas.2009-1785.
- Larousse. Digestion. Larousse. <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/digestion/25498?q=digestion#25379>. Consulté le 17/07/2019.
- Larousse. Protéines. Larousse. <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/prot%a9ine/64527?q=prot%a9ines#63801>. Consulté le 17/07/2019.
- Lund, P., M.R. Weisbjerg, and T. Hvelplund. 2008. Profile of digested feed amino acids from untreated and expander treated feeds estimated using in situ methods in dairy cows. *Livestock Science* 114:62–74. doi:10.1016/j.livsci.2007.04.012.
- Maaroufi, C., J.-P. Melcion, F. de Monredon, B. Giboulot, D. Guibert, and M.-P. Le Guen. 2000. Fractionation of pea flour with pilot scale sieving. I. Physical and chemical characteristics of pea seed fractions. *Animal Feed Science and Technology* 85:61–78. doi:10.1016/S0377-8401(00)00127-9.
- Magrini, M.-B., M. Anton, C. Cholez, G. Corre-Hellou, G. Duc, M.-H. Jeuffroy, J.-M. Meynard, E. Pelzer, A.-S. Voisin, and S. Walrand. 2016. Why are grain-legumes rarely present in cropping systems despite their environmental and nutritional benefits? Analyzing lock-in in the French agrifood system. *Ecological Economics* 126:152–162. doi:10.1016/j.ecolecon.2016.03.024.
- Masoero, F., M. Moschini, G. Fusconi, and G. Piva. 2006. Raw, extruded and expanded pea (*Pisum sativum*) in dairy cows diets. *Italian Journal of Animal Science* 5:237–247. doi:10.4081/ijas.2006.237.
- Mendowski, S., P. Chapoutot, G. Chesneau, A. Ferlay, F. Enjalbert, G. Cantalapiedra-Hijar, A. Germain, and P. Nozière. 2019. Effects of replacing soybean meal with raw or extruded

- blends containing faba bean or lupin seeds on nitrogen metabolism and performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 102:5130–5147. doi:10.3168/jds.2018-15416.
- Meyer, C. 2019. Féverole. ed. sc. Dictionnaire des sciences animales [on line]. Montpellier, France, Cirad. <http://dico-sciences-animales.cirad.fr/liste-mots.php?fiche=31541&def=f%C3%A9verole>. Consulté le 12/02/2019.
- Michalet-Doreau, B., R. Vérité, and P. Chapoutot. 1987. Méthodologie de mesure de la digestibilité in sacco de l'azote des aliments dans le rumen. *Bulletin Technique CRZV Theix* 69:5–7.
- Mogensen, L., P. Lund, T. Kristensen, and M.R. Weisbjerg. 2008. Effects of toasting blue lupins, soybeans or barley as supplement for high-yielding, organic dairy cows fed grass-clover silage ad libitum. *Livestock Science* 115:249–257. doi:10.1016/j.livsci.2007.08.011.
- Mogensen, L., J.S. Vestergaard, X. Fretté, P. Lund, M.R. Weisbjerg, and T. Kristensen. 2010. Effect of toasting field beans and of grass-clover: Maize silage ratio on milk production, milk composition and sensory quality of milk. *Livestock Science* 128:123–132. doi:10.1016/j.livsci.2009.11.011.
- Montagne, L. 2013. Anatomie des tubes digestifs et fonction des différents organes. 24p.
- Moss, A., R. Allison, A. Stroud, and C. Collins. 2000. Evaluation of heat-treated lupins, beans, and rapeseed meal as protein sources for dairy cows. 49p.
- Motte, J.-C. 2019. Amélioration de la méthode de digestibilité in sacco. Improve, Dury. 20p.
- Newbold, C.J., and E. Ramos-Morales. 2019. Microbiome of the rumen. *Rundgespräche Forum Ökologie*. No. Band 47. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München.
- Niquet-Léridon, C., and F.J. Tessier. 2011. Quantification of N $\epsilon$ -carboxymethyl-lysine in selected chocolate-flavoured drink mixes using high-performance liquid chromatography–linear ion trap tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 126:655–663. doi:10.1016/j.foodchem.2010.10.111.
- Normand, J., E. Pottier, L. Sagot, D. Le Pichon, and M. Dobbels. 2003. Incidence du mode de distribution des protéagineux sur les performances zootechniques des agneaux de bergerie. Pages 373–376 *Rencontres Recherches Ruminants*, Paris.
- Nozière, P. 2017. Bases de nutrition et d'alimentation : la digestion chez le ruminant. 17p.
- Nozière, P., I. Ortigues-Marty, C. Loncke, and D. Sauvant. 2010. Carbohydrate quantitative digestion and absorption in ruminants: from feed starch and fibre to nutrients available for tissues. *animal* 4:1057–1074. doi:10.1017/S1751731110000844.
- Offner, A., A. Bach, and D. Sauvant. 2003. Quantitative review of in situ starch degradation in the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 106:81–93. doi:10.1016/S0377-8401(03)00038-5.

- Ørskov, E.R., and I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science* 92:499. doi:10.1017/S0021859600063048.
- Petit, H.V., R. Rioux, and D.R. Ouellet. 1997. Milk Production and Intake of Lactating Cows Fed Raw or Extruded Peas. *Journal of Dairy Science* 80:3377–3385.
- Peyronnet, C., J.-P. Lacampagne, P. Le Cadre, and F. Pressenda. 2014. Les sources de protéines dans l'alimentation du bétail en France : la place des oléoprotéagineux. *OCL* 21:D402. doi:10.1051/ocl/2014012.
- Peyronnet, C., F. Pressenda, L. Alibert, and I. Bouvarel. 2010. Pois et tourteau de colza : deux matières premières complémentaires pour l'alimentation animale. *Oléagineux, Corps gras, Lipides* 17:319–324. doi:10.1051/ocl.2010.0335.
- Puhakka, L., S. Jaakkola, I. Simpura, T. Kokkonen, and A. Vanhatalo. 2016. Effects of replacing rapeseed meal with fava bean at 2 concentrate crude protein levels on feed intake, nutrient digestion, and milk production in cows fed grass silage-based diets. *Journal of Dairy Science* 99:7993–8006. doi:10.3168/jds.2016-10925.
- Ramin, M., A. Höjer, and M. Hetta. 2017. The effects of legume seeds on the lactation performance of dairy cows fed grass silage-based diets. *Agricultural and food science* 26:129–137.
- Recoules, E., N. Brevault, P. Le Cadre, C. Peyronnet, I. Bouvarel, and M. Lessire. 2016. L'autonomie protéique : état des lieux et voies d'amélioration pour l'alimentation des volailles. *INRA Productions animales* 29:129–140.
- Rémond, D., M.P. Le Guen, and C. Poncet. 2003. Degradation in the rumen and nutritional value of lupin (*Lupinus albus* L.) seed proteins effect of extrusion. *Animal Feed Science and Technology* 105:55–70. doi:10.1016/S0377-8401(03)00040-3.
- Renn, P., and S. Sathe. 1997. Effects of pH, temperature, and reactant molar ratio on L-leucine and D-glucose maillard browning reaction in an aqueous system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:3782–3787.
- Royer, E., K. Crépon, R. Granier, C. Peyronnet, and M. Vilariño. 2010. Incidence du type de féverole et du taux d'incorporation sur les performances du porc en post-sevrage et engraissement. Pages 77–84 *Journées Recherche Porcine*.
- Rulquin, H., R. Vérité, and J. Guinard-Flament. 2001. Acides aminés digestibles dans l'intestin. Le système AADI et les recommandations d'apport pour la vache laitière. *INRA Productions animales* 265–274.
- Sauvant, D., G. Cantalapiedra-Hijar, L. Delaby, J.-B. Daniel, P. Faverdin, and P. Nozière. 2015. Actualisation des besoins protéiques des ruminants et détermination des réponses des femelles laitières aux apports de protéines digestibles dans l'intestin. *INRA Productions animales* 28:347–368.

- Sauvant, D., G. Cantalapiedra-Hijar, S. Lemosquet, P. Nozière, V. Berthelot, and P. Faverdin. 2018a. Dépenses, efficacité métabolique et besoins en protéines et en acides aminés. Quae. Wageningen.
- Sauvant, D., P. Faverdin, J.-L. Peyraud, and P. Nozière. 2018b. Excrétion azotée fécale et urinaire. Quae. Wageningen.
- Sauvant, D., S. Lemosquet, P. Chapoutot, and P. Nozière. 2018c. Digestion et apports en nutriments protéiques. Quae. Wageningen.
- Sauvant, D., and P. Nozière. 2013. Rénovation des unités alimentaires des ruminants : les principales relations utilisées pour le calcul des apports alimentaires. Pages 33–40 *Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants*, Paris.
- Singh, C.K., P.H. Robinson, and M.A. McNiven. 1995. Evaluation of raw and roasted lupin seeds as protein supplements for lactating cows. *Animal Feed Science and Technology* 63–76.
- Spanghero, M., and Z.M. Kowalski. 1997. Critical analysis of N balance experiments with lactating cows. *Livestock Production Science* 113–122.
- Terre-net. 2019. Cotation du pois fourrager. <https://www.terre-net.fr/marche-agricole/pois-fourrager/physique>. Consulté le 16/05/2019.
- Terres Inovia. 2019a. Les différents types de lupin : blanc, bleu et jaune. [https://www.terresinovia.fr/-/les-differents-types-de-lupin-blanc-bleu-et-jaune?p\\_r\\_p\\_categoryId=130466&p\\_r\\_p\\_tag=131382&p\\_r\\_p\\_tags=163804](https://www.terresinovia.fr/-/les-differents-types-de-lupin-blanc-bleu-et-jaune?p_r_p_categoryId=130466&p_r_p_tag=131382&p_r_p_tags=163804). Consulté le 17/02/2019.
- Terres Inovia. 2019b. Cultiver de la féverole. <http://www.terresinovia.fr/feverole/cultiver-de-la-feverole/atouts-points-cles/atouts-economiques/>. Consulté le 12/02/2019.
- Terres Univia. 2017a. Chiffres clés oléagineux et plantes riches en protéines 2016. Terres Univia, Paris. 28p.
- Terres Univia. 2017b. Statistiques des oléagineux et plantes riches en protéines 2015-2016. Terres Univia, Paris. 44p.
- Terres Univia. 2018a. Chiffres clés plantes riches en protéines 2017. Terres Univia, Paris. 20p.
- Terres Univia. 2018b. Rapport d'activité 2017. Terres Univia, Paris. 32p.
- Terres Univia. 2019a. Féverole. <http://www.terresunivia.fr/cultures-utilisation/les-especes-cultivees/la-feverole>. Consulté le 11/02/2019.
- Terres Univia. 2019b. Lupin blanc. <http://www.terresunivia.fr/cultures-utilisation/les-especes-cultivees/lupin-blanc>. Consulté le 11/02/2019.

- Terres Univia. 2019c. Pois. <http://www.terresunivia.fr/cultures-utilisation/les-especes-cultivees/pois>. Consulté le 11/02/2019.
- Tessier, F., P. Jacolot, and C. Niquet-Léridon. 2012. La réaction de Maillard : cent ans de découvertes scientifiques sur la chimie des aliments et la santé. Page 8 Lettre scientifique n°10. 8p.
- Vander Pol, M., A.N. Hristov, S. Zaman, and N. Delano. 2008. Peas Can Replace Soybean Meal and Corn Grain in Dairy Cow Diets. *Journal of Dairy Science* 91:698–703. doi:10.3168/jds.2007-0543.
- Vander Pol, M., A.N. Hristov, S. Zaman, N. Delano, and C. Schneider. 2009. Effect of inclusion of peas in dairy cow diets on ruminal fermentation, digestibility, and nitrogen losses. *Animal Feed Science and Technology* 150:95–105. doi:10.1016/j.anifeedsci.2008.08.009.
- Vilariño, M., J.P. Métayer, K. Crépon, and G. Duc. 2009. Effects of varying vicine, convicine and tannin contents of faba bean seeds (*Vicia faba* L.) on nutritional values for broiler chicken. *Animal Feed Science and Technology* 150:114–121. doi:10.1016/j.anifeedsci.2008.08.001.
- Web-agri. 2019. Les marchés agricoles. [http://www.web-agri.fr/observatoire\\_marches/accueil.html](http://www.web-agri.fr/observatoire_marches/accueil.html). Consulté le 16/05/2019.
- Weber, J. 2017. Lupin d'hiver gousses (*Lupinus albus* L.). [https://www.flickr.com/photos/inra\\_dist/27441871889](https://www.flickr.com/photos/inra_dist/27441871889). Consulté le 12/02/2019.
- White, C.L., V.E. Staines, and M. vH. Staines. 2007. A review of the nutritional value of lupins for dairy cows. *Australian Journal of Agricultural Research* 185–202.
- Zelter, S.-Z., F. Leroy, J.-P. Tissier, and M. Naville. 1970. Protection des protéines alimentaires contre la désamination bactérienne dans le rumen (1). i. – études in vitro : comportement en milieu de rumen de quelques protéines tannées avec du tanin de châtaignier ou certains aldéhydes (formaldéhyde, glutaraldéhyde, glyoxal). *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique* 10:111–122.
- Žilić, S., B.A. Mogol, G. Akilloğlu, A. Serpen, N. Delić, and V. Gökmen. 2014. Effects of extrusion, infrared and microwave processing on Maillard reaction products and phenolic compounds in soybean: Effects of processing on Maillard reaction products in soybean. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94:45–51. doi:10.1002/jsfa.6210.

---

# Annexe(s)

---

## I. Annexe 1 : Matériels et méthodes détaillés des incubations *in sacco*

Les incubations rumen et duodénum ayant été réalisées lors de deux séries totalement indépendantes, il y a eu deux types de sachets et deux lots d'animaux distincts utilisés.

Les sachets utilisés pour réaliser les incubations rumen étaient de la marque SEFAR (Billy-Berclau, France) en nylon, de forme cylindrique de 12 cm de longueur et 3,4 cm de diamètre, avec un vide de maille d'environ 48  $\mu\text{m}$ . Ils étaient fournis avec le fond déjà soudé par ultrasons, ainsi qu'avec une soudure latérale déjà réalisée. Du côté du fond, une deuxième thermo-soudure a été réalisée à 1,8 cm du bord, puis un œillet a été inséré dans l'espace ainsi créé entre les soudures. Les sachets ont ensuite été identifiés puis remplis avec 3 g d'aliment. Enfin, une double thermo-soudure a été réalisée sur le côté ouvert du tube pour fermer le sachet. Il y a eu 6 répétitions par aliment, ce qui a nécessité la préparation de 396 sachets, du fait des 6 temps d'incubation nécessaires à une bonne représentation de la dégradation dans le rumen (2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h ou 48 h).

Les sachets utilisés pour les incubations duodénum étaient de la marque SEFAR, en toile de nylon de dimension totale 6,5  $\times$  6 cm, avec une dimension contenant les échantillons de 5,5  $\times$  5,5 cm, et présentaient un vide de maille de diamètre équivalent de 49  $\mu\text{m}$ . Ils ont été cousus sur 3 côtés une fois remplis avec 1,5 g d'échantillon. Ce format de sachet a permis d'utiliser un unique sachet pour les incubations ruminales et duodénales de chaque échantillon. Il y a eu 21 répétitions par aliment, ce qui a nécessité la préparation de 231 sachets. Tous les sachets ont été incubés 15 h en rumen, puis une partie d'entre eux a été utilisée pour les incubations duodénales puis les calculs de dr, tandis que l'autre partie a été analysée pour les calculs de disparition de la MS et de l'azote après 15 h d'incubation dans le rumen.

Les incubations rumen en cinétique ont eu lieu grâce à 3 vaches de race Holstein taries et porteuses de canules ruminales. Deux de ces vaches pesaient autour de 700 kg, et la troisième autour de 600 kg. La ration était distribuée en deux repas par jour et était constituée de 5 kg de foin et de 2,1 kg de concentré (0,9 kg de Céréblé et 1,2 kg de tourteau de colza). Un mélange de minéraux était ajouté à hauteur de 50 g dans la ration du matin. Tous les sachets d'une série étaient introduits en même temps juste avant le repas du matin, exceptés les sachets 16 h qui ont été introduits l'après-midi à 16h pour ne pas avoir à réaliser des prélèvements durant la nuit (ces sachets étaient retirés à 8h le lendemain). Pour faciliter leur récupération et garantir une bonne immersion dans le contenu ruminal, les sachets étaient regroupés par temps de

prélèvement et attachés à un anneau lesté grâce à des liens autobloquants en plastique. Cet anneau était relié au bouchon de la canule ruminale par un fil de nylon.

Les incubations duodénum ont eu lieu grâce à 3 vaches de race Holstein taries munies de canules ruminales et duodénales, pesant respectivement 688, 712 et 746 kg. La ration distribuée aux vaches lors des incubations était constituée de 7 kg MS de foin et 3 kg MS de concentré (constitué de 31 % de son, 31 % de pulpe de betterave, 31 % de tourteau de soja, 5 % de mélasse de canne, 1,5 % de vitamines et 0,5 % d'urée). Cette ration a été distribuée en deux repas égaux par jour (8h et 17h). Les échantillons dans les sachets ont été incubés selon un plan expérimental aléatoire, c'est-à-dire que 7 sachets par aliment ont été incubés dans une vache en rumen, puis ont été repartis aléatoirement entre les deux autres vaches pour les incubations duodénales. Les sachets ont été introduits dans le rumen par la canule à 17h, avant d'être récupérés le lendemain matin à 8h. Pour faciliter leur récupération et garantir une bonne immersion dans le contenu ruminal, les sachets étaient reliés entre eux par un fil lesté de plomb et relié au bouchon de la canule. Une fois sortis du rumen, une partie des sachets a été utilisée pour les calculs de disparition de la MS et de l'azote après 15 h d'incubation dans le rumen et l'autre partie des sachets sortis du rumen a été utilisée pour les incubations duodénales : les sachets ont été lavés, stockés à +4°C en attendant le traitement pepsique, puis incubés 2h30 dans la solution de pepsine (constituée de 3 g de pepsine dans 1 L d'une solution de HCl à 0,01 N). Ces sachets ont ensuite été introduits progressivement dans le duodénum par la canule duodénale entre 17h et 18h, avant d'être récupérés dans les fèces des vaches le lendemain entre 8h30 et 11h (les sachets récupérés après 11h ont été écartés du dispositif expérimental).

Quelle que soit la série d'incubation, les sachets une fois récupérés ont été séparés les uns des autres et lavés grossièrement dans un premier temps. Pour les séries réalisées chez Arvalis, les sachets ont été congelés à -20°C pour stopper les activités microbiennes. Ils ont ensuite été décongelés dans de l'eau tiède, relavés en machine jusqu'à obtention d'une eau très claire, recongelés et enfin séchés 72 h à 60°C après décongélation. La MS résiduelle a été déterminée grâce à la pesée des sachets secs. Le dosage d'azote a été réalisé grâce à la méthode Dumas. Pour les séries réalisées à Méjusseume, les sachets incubés uniquement en rumen ont été lavés jusqu'à obtention d'une eau très claire, puis séchés 48 h à 80°C. La MS résiduelle a été déterminée grâce à la pesée des sachets secs, et la disparition de l'azote a été mesurée par la méthode Kjeldahl sur des pools par aliment. Pour les sachets incubés en rumen-pepsine-duodénum, les sachets récupérés dans les fèces ont été grossièrement lavés puis stockés à +4°C au fur et à mesure, en attendant la récupération de tous les sachets. À ce moment, la procédure de lavage, stockage et dosage a été la même que pour les sachets sortis du rumen. Suite à ces deux séries d'incubation, la  $DT_N$  et la  $dr_N$  ont été calculées comme décrit dans la partie I.2.b de l'étude bibliographique.

## II. Annexe 2 : structure des bases de données *in vivo* et *in situ*

Tableau 1 : descriptif des colonnes de la base *in vivo*

SAISIE PRINCIPALE	VARIABLE	UNITE	DESCRIPTION
<b>Caractéristiques publication</b>	Code publi	Ø	Code de la publication
	Auteurs	Ø	Auteurs de la publication
	Année	Ø	Année de publication
	Approche	Ø	Approche utilisée pour la publication des résultats
<b>Matériels &amp; Méthodes</b>	Schéma Exp	Ø	Schéma expérimental mis en place dans l'essai
	Fact Exp	Ø	Facteur expérimental étudié dans la publication (ce qui varie, toute chose étant égale par ailleurs)
	Espèce	Ø	Espèce étudiée
	Race	Ø	Race de l'espèce étudiée
	Stade physio	Ø	Stade physiologique des animaux
	PL	kg/j	Production Laitière des animaux (donnée initiale)
	Stade Lact	j	Stade de Lactation des VL
	PV	kg	Poids Vif des animaux
	Code MP	Ø	Code de la Matière Première utilisée
	Code ttmt	Ø	Code du traitement MP × traitement technologique utilisé dans la publication
	MatPrem	Ø	Matière Première utilisée dans l'essai
	Variete MP	Ø	Variété de la matière première utilisée (et cultivar)
	Broyage	Ø	Matière première broyée ou non
	Grille broyage	mm	Taille de la grille utilisée pour le broyage
	Process	Ø	Type de procédé industriel utilisé pour traiter les graines
	Timing ttmt meca	Ø	Positionnement dans le temps du traitement mécanique par rapport aux éventuels autres traitements
Ttmt mecanique	Ø	Traitement mécanique subi	

	Ttmt thermique	∅	Traitement thermique subi
	Ttmt thermique-P°	∅	Traitement thermique et pression subis
	Autre ttmt	∅	Traitement ni thermique ni mécanique subi
	Caract ttmt meca	∅	Caractérisation qualitative de la granulométrie résultant du traitement mécanique
	Additif	∅	Additif ajouté lors d'un process
	T° sortie	°C	Température du produit à la sortie du procédé
	Tps	s	Temps de séjour des graines dans le procédé
	P° qti	bar	Pression quantitative du procédé
	P° qli	∅	Pression qualitative du procédé
	Débit	kg/h	Débit de la machine utilisée pour le procédé
	Puissance	kW/h	Puissance de la machine utilisée pour le procédé
	Vitesse	tr/min	Vitesse de la vis de l'extrudeur
	Ajout eau	%	Ajout d'eau lors du procédé technologique
	Alim/Ration	∅	Aliment distribué seul/Ration complète
	% C	%	Proportion de concentré dans la ration
	Fmaj	∅	Fourrage majoritaire
	% Fmaj	%	Part de fourrage majoritaire dans la ration
	FX	∅	Fourrage n°X
	% FX	%	Part de fourrage n°X dans la ration
	Cmaj	∅	Concentré majoritaire
	% Cmaj	%	Part de concentré majoritaire dans la ration
	CX	∅	Concentré n°X
	% CX	%	Part de concentré n°X dans la ration
	MSr	%	Matière sèche de l'ensemble de la ration
	MOr	g/kg	Matière Organique de la ration
	MATr	g/kg	Matière Azotée de la ration
	NDFr	g/kg	NDF de la ration
	ADFr	g/kg	ADF de la ration
	MGr	g/kg	Matière Grasse de la ration
	Amidonr	g/kg	Amidon de la ration
	MAT ttmt	% MATr	Part des Matières Azotées dues à l'aliment expérimental
	DE 1	%	Dégradabilité Enzymatique 1 h
<b>Marqueurs</b>	Marq phL	∅	Marqueur de la phase liquide
	Marq PhS	∅	Marqueur de la phase solide
	Marq PhBact	∅	Marqueur de la phase bactérienne

<b>Ingestion</b>	MSI	kg/j	Matière Sèche Ingérée
<b>Résultats N Rumen</b>	pH	Ø	pH du jus de rumen
	N-NH3	mg/L	N-NH <sub>3</sub> Azote ammoniacal dans le rumen
	AGVt	mmol/L	Acides Gras Volatils Totaux dans le rumen
	AGV acétate	mmol/L	Acétate dans le rumen
	AGV propionate	mmol/L	Propionate dans le rumen
	AGV butyrate	mmol/L	Butyrate dans le rumen
	AGV autres	mmol/L	Autres AGV dans le rumen
	Nt sol	mg/L	N soluble total dans le rumen
	Np sol	mg/L	N protéique soluble dans le rumen
	Nnp sol	mg/L	N non-protéique soluble dans le rumen
	NnNH3np	mg/L	N non ammoniacal non protéique dans le rumen
	DigRuAp Nalim	% ingéré	Digestion ruminale apparente de l'N alimentaire
	\$bact MOADR	g N/kg	Synthèse bactérienne MOADR (Matière Organique Apparemment Dégradée dans le Rumen)
	\$bact MORDR	g N/kg	Synthèse bactérienne MORDR (Matière Organique Réellement Dégradée dans le Rumen)
	DispRum %i	% initial	Disparition <i>in situ</i> dans le rumen
BalProRu	g CP/kg MS	Balance protéique du rumen	
<b>Résultats N Intestins</b>	Fduo Nt	g/j	Flux duodéal d'N total
	Fduo NnNH3	g/j	Flux duodéal d'N non ammoniacal
	Fduo Nbact	g/j	Flux duodéal d'N bactérien
	Fduo Nalim-endo	g/j	Flux duodéal d'N d'origines alimentaire et endogène
	Filéal Nt	g/j	Flux iléal d'N total
	Filéal NnNH3	g/j	Flux iléal d'N non ammoniacal
	Filéal Nbact	g/j	Flux iléal d'N bactérien
	Filéal Nalim-endo	g/j	Flux iléal d'N d'origines alimentaire et endogène
	Ffécal Nt	g/j	Flux fécal d'N total
	AbsInt NnNH3	g/j	Absorption intestinale d'N non ammoniacal

	AbsInt NnNH3 %i	% ingéré	Absorption intestinale d'N non ammoniacal
	AbsInt NnNH3 %e	% entrée dans le duodénum	Absorption intestinale d'N non ammoniacal
	AbsInt Nalim	g/j	Absorption intestinale d'N alimentaire
	AbsInt Nalim %i	% ingéré	Absorption intestinale d'N alimentaire
	AbsInt Nalim %e	% entrée dans le duodénum	Absorption intestinale d'N alimentaire
	AbsInt Nbact	g/j	Absorption intestinale d'N bactérien
	AbsInt Nbact %e	% entrée dans le duodénum	Absorption intestinale d'N bactérien
	DispInt %i	% initial	Disparition <i>in situ</i> dans l'intestin
	DR int	Ø	Digestibilité Réelle intestinale
<b>Résultats N Tube digestif (rumen + intestins)</b>	DigTDap Nalim	% ingéré	Digestion apparente d'N alimentaire dans tout le TD
	Digtot MAT %i	% ingéré	Digestibilité totale de la Matière Azotée Totale
	DispTD N %i	% initial	Disparition <i>in situ</i> de l'azote dans tout le TD
<b>Performances laitières</b>	PL	kg/j	Production Laitière (résultat expérimental)
	Lait4%	kg/j	Lait à 4 % de Matière Grasse
	MG	g/j	Matière Grasse du lait
	MP	g/j	Matière Protéique du lait
	TB	g/kg	Taux Butyreux
	TP	g/kg	Taux Protéique
	UréeL	mg/L	Urée du lait
	Lactose	g/j	Lactose du lait
	ΔLipolyse	meq/100 g MG	Différence entre la lipolyse du lait H24 et la lipolyse H0
<b>État corporel</b>	PVf	kg	Poids Vif des animaux
	ΔPV	g/j	Variation de Poids Vif
	ΔNEC	point	Variation de la Note d'État Corporel
<b>Bilans azotés</b>	Ning	g/j	N ingéré
	Nlait	g/j	N dans le lait
	Nfèces	g/j	N dans les fèces
	Nurine	g/j	N dans l'urine
	Bilan	g/j	Bilan d'azote (Ingéré-Excrété)
	Bilan %	% ingéré	Bilan d'azote (Bilan/Ingéré)
	<i>Nlait calc</i>	g/j	N dans le lait calculé (Nlait = MP lait/6,38/0,95)

Annexes

	<i>Bilan calc</i>	g/j	Bilan d'azote calculé (en prenant le N lait calc)
<b>Valeurs PDI des régimes testés</b>	PDIA	g/kg MS	PDIA de la ration/du traitement expérimental
	PDIN	g/kg MS	PDIN de la ration/du traitement expérimental
	PDIE	g/kg MS	PDIE de la ration/du traitement expérimental
<b>Données sang/plasma</b>	UréeS	mmol/L	Urée dans le sang
	AGNE	mmol/L	Acides Gras Non-Estérifiés dans le sang
	β-OH	mmol/L	β-OH dans le sang

Tableau 2 : descriptif des colonnes de la base *in situ*

SAISIE PRINCIPALE	VARIABLE	UNITE	DESCRIPTION
<b>Caractéristiques publication</b>	Code publi	Ø	Code de la publication
	Auteurs	Ø	Auteurs de la publication
	Année	Ø	Année de publication
	Approche	Ø	Approche utilisée pour la publication des résultats
<b>Matériels &amp; Méthodes</b>	Schéma Exp	Ø	Schéma expérimental mis en place dans l'essai
	Fact Exp	Ø	Facteur expérimental étudié dans la publication (ce qui varie, toute chose étant égale par ailleurs)
	Espèce	Ø	Espèce étudiée
	Race	Ø	Race de l'espèce étudiée
	Stade physio	Ø	Stade physiologique des animaux
	PV	kg/j	Poids Vif des animaux
	Code MP	Ø	Code de la Matière Première utilisée
	Code ttmt	Ø	Code du traitement MP × traitement technologique utilisé dans la publication
	MatPrem	Ø	Matière Première utilisée dans l'essai
	Variete MP	Ø	Variété de la matière première utilisée (et cultivar)
	Broyage	Ø	Matière première broyée ou non
	Grille broyage	mm	Taille de la grille utilisée pour le broyage
	Process	Ø	Type de procédé industriel utilisé pour traiter les graines
	Timing ttmt meca	Ø	Positionnement dans le temps du traitement mécanique par rapport aux éventuels autres traitements
	Ttmt mecanique	Ø	Traitement mécanique subi
	Ttmt thermique	Ø	Traitement thermique subi
	Ttmt thermique-P°	Ø	Traitement thermique et pression subis
	Autre ttmt	Ø	Traitement ni thermique ni mécanique subi
	Caract ttmt meca	Ø	Caractérisation qualitative de la granulométrie résultant du traitement mécanique
	Additif	Ø	Additif ajouté lors d'un process
T° sortie	°C	Température du produit à la sortie du procédé	
P° qti	bar	Pression quantitative du procédé	
P° qli	Ø	Pression qualitative du procédé	

	Tps	s	Temps de séjour des graines dans le procédé
	Débit	kg/h	Débit de la machine utilisée pour le procédé
	Puissance	kW/h	Puissance de la machine utilisée pour le procédé
	Vitesse	tr/min	Vitesse de la vis de l'extrudeur
	Ajout eau	%	Ajout d'eau lors du procédé technologique
	Alim/Ration	Ø	Aliment distribué seul/Ration complète
	% C	%	Proportion de concentré dans la ration
	Fmaj	Ø	Fourrage majoritaire
	% Fmaj	%	Part de fourrage majoritaire dans la ration
	FX	Ø	Fourrage n°X
	% FX	%	Part de fourrage n°X dans la ration
	Cmaj	Ø	Concentré majoritaire
	% Cmaj	%	Part de concentré majoritaire dans la ration
	CX	Ø	Concentré n°X
	% CX	%	Part de concentré n°X dans la ration
	MATr	g/kg	Matière Azotée de la ration
	MS_graine	%	Matière Sèche de la graine
	MO_graine	g/kg	Matière Organique de la graine
	MAT_graine	g/kg	Matière Azotée de la graine
	NDF_graine	g/kg	NDF de la graine
	ADF_graine	g/kg	ADF de la graine
	MG_graine	g/kg	Matière Grasse de la graine
	Amidon_graine	g/kg	Amidon de la graine
	Nsol_graine	%	Solubilité de l'azote
	MSd in vitro	%	Matière Sèche digestible <i>in vitro</i>
<b>Méthodologie des sachets</b>	Grille Broy R	mm	Broyage de l'échantillon incubé dans le Rumen
	Ratio m/S R	g/cm <sup>2</sup>	Ratio masse de l'échantillon/Surface d'échange du sachet Rumen
	Résidu	h	Temps d'incubation dans le rumen avant introduction dans l'intestin du sachet
	Pepsine	h	Temps d'incubation du sachet rumen dans la pepsine avant introduction dans l'intestin
	Grille Broy Int	mm	Broyage de l'échantillon incubé dans l'Intestin
	Ratio m/S Int	g/cm <sup>2</sup>	Ratio masse de l'échantillon/Surface d'échange du sachet Intestin
<b>Marqueurs</b>	Marq PhL	Ø	Marqueur de la phase liquide
	Marq PhS	Ø	Marqueur de la phase solide
	Marq PhBact	Ø	Marqueur de la phase bactérienne
<b>Résultats</b>	MSI	kg/j	Matière Sèche Ingérée
	\$bact MOADR	g N/kg	Synthèse bactérienne MOADR (Matière Organique Apparemment Dégradée dans le Rumen)

	\$bact MORDR	g N/kg	Synthèse bactérienne MORDR (Matière Organique Réellement Dégradée dans le Rumen)
	DispRum %i	% initial	Disparition <i>in situ</i> dans le rumen
	DegRum MAT	%	Dégradabilité ruminale de la MAT
	DispInt %i	% initial	Disparition <i>in situ</i> dans l'intestin
	DR int	Ø	Digestibilité Réelle intestinale
	DigInt %RUP	% protéines indégradables dans le rumen	Digestibilité intestinale de l'azote
	DigInt %CP	% CP	Digestibilité intestinale de l'azote
	DigTDap Nalim	% ingéré	Digestion apparente d'N alimentaire dans tout le TD
	Digtot MAT %i	% ingéré	Digestibilité totale de la Matière Azotée
	DispTD %i	% initial	Disparition <i>in situ</i> dans tout le TD
	Prot Ind Ru	g/kg	Protéines indégradables dans le rumen
	kp	/h	Taux de passage des particules (pour calculs)
	a N	%	Fraction immédiatement soluble (cinétique de dégradation de l'N)
	b N	%	Fraction potentiellement dégradable (cinétique de dégradation de l'N)
	c N	/h	Taux de dégradation de la fraction b (cinétique de dégradation de l'N)
	DT N	%	Dégradabilité Théorique de l'Azote
	DE1	%	Dégradabilité Enzymatique 1 h
	DE N	%	Dégradabilité Effective de l'Azote
<b>Valeurs PDI</b>	PDIA	g/kg MS	PDIA de la ration/du traitement expérimental
	PDIN	g/kg MS	PDIN de la ration/du traitement expérimental
	PDIE	g/kg MS	PDIE de la ration/du traitement expérimental



## Utilisation digestive des graines protéagineuses traitées, et leur valorisation par les vaches laitières

### Résumé

Dans un contexte où le tourteau de soja importé d'Amérique (le plus souvent OGM et cause d'une importante déforestation) pour l'alimentation des animaux d'élevage est pointé du doigt, des alternatives à son utilisation dans l'alimentation des vaches laitières sont étudiées. Par exemple, l'utilisation des graines protéagineuses (féverole, lupin, pois) produites en France, du fait de leur teneur en protéines intéressante, pourrait être un moyen. Mais, distribuées crues aux animaux, leurs protéines sont très dégradables dans le rumen, ce qui pénalise leur valeur azotée pour le ruminant. Une possibilité est d'appliquer à ces graines des traitements thermiques pour protéger leurs protéines d'une trop forte dégradabilité dans le rumen.

L'objectif de cette thèse, conduite dans le cadre du projet PROLEVAL, était de tester des combinaisons « matière première × traitement technologique » pour optimiser la dégradation des protéines de graines protéagineuses dans le rumen, sans altérer leur digestibilité dans l'intestin. Suite à des essais préliminaires *in vitro* et *in situ*, des régimes à base de féverole et de lupin, distribués crus ou extrudés selon différentes conditions, ont été testés lors de deux essais *in vivo* sur vaches laitières, dans lesquels les rations étaient iso-protéiques et la méthionine non limitante. Le 1<sup>er</sup> essai comparait l'utilisation du tourteau de soja à la féverole ou au lupin, distribués crus, extrudés à 140°C et extrudés à 160°C. Les différents résultats ont montré que le tourteau de soja peut être remplacé par de la féverole ou du lupin sans altérer significativement les performances laitières des vaches. À 140°C, des réactions de Maillard ont permis la protection des protéines d'une trop grande dégradabilité ruminale par rapport aux graines crues, sans altérer l'absorption des acides aminés dans l'intestin grêle, entraînant une meilleure production laitière avec la féverole. En revanche, à 160°C, ces réactions ont semblé trop protéger les protéines, qui ont été moins bien absorbées dans l'intestin. Dans le 2<sup>ème</sup> essai, de la féverole a été distribuée crue, extrudée à 140°C comme dans le 1<sup>er</sup> essai, et extrudée à 140°C après une maturation spécifique visant à améliorer la complexation des protéines avec des sucres exogènes (maturation avec des sucres réducteurs) ou endogènes (libérés par maturation avec un cocktail enzymatique). Les différents résultats ont confirmé que l'extrusion à 140°C de la féverole protège les protéines de la dégradation ruminale. L'ajout de sucres réducteurs a conduit à une surprotection des protéines, dont les acides aminés ont été moins bien absorbés dans l'intestin grêle. L'addition du cocktail enzymatique a en revanche conduit à un niveau d'absorption des acides aminés dans l'intestin grêle similaire à celui obtenu avec la féverole extrudée à 140°C sans condition de maturation spécifique.

En parallèle de ces essais, une synthèse bibliographique quantitative a été réalisée sur l'utilisation des graines protéagineuses, crues et traitées technologiquement, dans l'alimentation des vaches laitières. Les résultats confirment ceux obtenus *in situ* et *in vivo* dans le cadre de cette thèse : les traitements technologiques protègent les protéines de la dégradation dans le rumen mais les bénéfices de cette protection sur les performances zootechniques des animaux nécessitent une bonne maîtrise du traitement appliqué.

En conclusion, les graines protéagineuses peuvent remplacer le tourteau de soja dans l'alimentation des vaches laitières, sous réserve d'un traitement technologique adapté.

**Mots-clés :** graines protéagineuses, féverole, lupin, extrusion, protéines, vaches laitières

## Digestive use of treated proteaginous seeds, and their valuation by dairy cows

### Abstract

Importation of soybean meal from America, which are most often GMO and cause of significant deforestation, is nowadays increasingly questioned in animal feeding. For dairy cows, alternatives such as French produced proteaginous seeds (faba bean, lupin, pea) are investigated, because of their interesting protein content. However, when distributed raw to animals, their proteins are very degradable in the rumen, which penalizes their nitrogen value for ruminants. One possibility is to apply heat treatments to these seeds to protect their proteins from too high degradability in the rumen.

The objective of this thesis, conducted as part of the PROLEVAL project, was to test combinations of "raw material × technological treatment" to optimize the degradation of proteaginous seeds' proteins in the rumen, without altering their digestibility in the intestine. Following *in vitro* and *in situ* experiments, diets containing faba bean and lupin distributed raw or extruded under different conditions were tested in two *in vivo* experiments on dairy cows. Diets were iso-crude protein and non-limiting methionine. The first experiment compared soybean meal with faba bean or lupin, distributed raw, extruded at 140°C and extruded at 160°C. The different results showed that soybean meal could be replaced by faba bean or lupin without significantly altering the dairy performance of cows. On one hand, at 140°C, Maillard reactions led to protection of proteins from ruminal degradability compared with raw seeds, without altering the absorption of amino acids in the small intestine, leading to better milk production with faba bean. On the other hand, at 160°C, these reactions seemed to overprotect the proteins, which were less absorbed in the intestine. In the 2<sup>nd</sup> experiment, faba bean was distributed raw, extruded at 140°C in the same way as in the 1<sup>st</sup> experiment, and extruded at 140°C after a specific maturation, which aimed at improving the complexation of proteins with exogenous sugars (maturation with reducing sugars) or endogenous (released during maturation with an enzymatic cocktail). The different results confirmed that extrusion at 140°C of faba bean protects proteins from ruminal degradation. On one hand, addition of reducing sugars led to overprotection of the proteins, whose amino acids were less absorbed in the small intestine. On the other hand, addition of the enzymatic cocktail led to a level of absorption of amino acids in the small intestine similar to the one obtained with faba bean extruded at 140°C without specific maturation conditions.

In addition to these experiments, a quantitative bibliographic synthesis was carried out on the use of proteaginous seeds, raw and technologically treated, in dairy cow diets. The results confirm those obtained *in situ* and *in vivo* in the context of this thesis: technological treatments protect proteins from degradation in the rumen, but the benefits of this protection on the zootechnical performance of animals require good control of the applied treatment.

In conclusion, proteaginous seeds can replace soybean meal in dairy cow diets, when subjected to the appropriate technological treatment.

**Key words:** proteaginous seeds, faba bean, lupin, extrusion, proteins, dairy cows