



Digestion de l'amidon et des parois végétales du maïs fourrage chez les ruminants : conséquences sur l'évaluation de sa valeur nutritive

Julie Peyrat

► To cite this version:

Julie Peyrat. Digestion de l'amidon et des parois végétales du maïs fourrage chez les ruminants : conséquences sur l'évaluation de sa valeur nutritive. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2014. Français. NNT : 2014CLF22511 . tel-01163429

HAL Id: tel-01163429

<https://theses.hal.science/tel-01163429>

Submitted on 12 Jun 2015

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, de la Santé,

Agronomie, Environnement

N° d'ordre 649

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITÉ
(SPÉCIALITÉ NUTRITION ANIMALE)**

Présentée et soutenue publiquement par

Julie PEYRAT

le 21 novembre 2014

**DIGESTION DE L'AMIDON ET DES PAROIS VÉGÉTALES DU
MAÏS FOURRAGE CHEZ LES RUMINANTS : CONSÉQUENCES
SUR L'ÉVALUATION DE SA VALEUR NUTRITIVE**

Directeur de thèse : René BAUMONT
Co-encadrant : Pierre NOZIÈRE

Rapporteurs	K. Beauchemin	AAC - Lethbridge Research Centre (Canada)
	C. Bayourthe	ENSA de Toulouse - INP de Toulouse
Membres	A. Lebert	Université Blaise Pascal Clermont-Ferrand
	Y. Barrière	INRA Lusignan
	P. Chapoutot	AgroParisTech
	R. Baumont	INRA Clermont-Ferrand/Theix
	P. Nozière	INRA Clermont-Ferrand/Theix
Invités	A. Féraud	ARVALIS Institut du Végétal- La Jaillière
	J. Foucault	Union Française des Semenciers

Laboratoire d'accueil



Equipe Relations Animal-Plantes et Aliments
Unité Mixte de Recherche sur les Herbivores
INRA Centre de Clermont-Fd / Theix
F-63122 Saint Genès-Champanelle



Elle qui croyait par son éducation, par ses études, tout savoir de la vie animale découvrir sur ces arpents de terre que la vie naturelle est un bien meilleur professeur parce qu'elle ne donne pas la même réponse à toutes les questions et qu'elle laisse le savoir germer et mûrir comme tout ce qui est vrai et vivant.

J.M.G. Le Clézio, Prix Nobel de littérature 2008

REMERCIEMENTS

« Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries. M. Proust »

Je tiens tout d'abord à remercier *M. André Lebert* pour m'avoir fait l'honneur de présider la commission d'examen ainsi que tous les autres membres du jury qui ont accepté de juger mon travail : *Mme Karen Beauchemin, Mme Corine Bayourthe, M. Yves Barrière et M. Patrick Chapoutot.*

Mes plus sincères remerciements à *M. René Baumont*, mon directeur de thèse, attentif et disponible malgré ses nombreuses charges de travail. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Merci René pour ton soutien à toutes épreuves, pour la confiance que tu m'as témoignée et pour nos discussions « Rugby » toujours très animées. Je garderai un très bon souvenir de ces 3 années d'expérience à tes côtés !

Merci à mon co-directeur de thèse, *M. Pierre Nozière*. Un grand merci pour tout le temps que tu as consacré à la lecture et à l'appréciation de ce travail et aussi pour ton aide précieuse lors de la rédaction de la dernière publication. Quel partage durant ces trois années ! De l'analyse des flux digestifs à nos « débriefs rugby », en passant par la Californie, les souvenirs sont nombreux. Ces trois années de thèse à tes côtés m'ont apporté une expérience scientifique hors du commun mais surtout une expérience humaine que je ne suis pas prête d'oublier !

Un grand merci à mes deux encadrants d'ARVALIS Institut du Végétal : *Alexis Férard et Pierre-Vincent Protin*. Merci Alexis pour ce suivi hors du commun, tes conseils au quotidien, le temps considérable que tu as consacré à mes relectures, tes encouragements et ta préoccupation à mon égard. Merci Pierre-Vincent pour avoir consacré le temps nécessaire à mes relectures malgré ton emploi du temps chargé et pour ton soutien pendant ces trois ans.

Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères envers les membres de l'UFS, de la FNPSMS et d'ARVALIS Institut du Végétal (*Michèle Champion, Jacques Foucault, Cédric Riboulet, François Eloi, Bertrand Carpentier*) pour leur aide dans la construction du projet et leurs remarques constructives lors des nombreux comités de pilotages. Merci aussi pour votre soutien tout au long de ces trois années de thèse.

Je remercie aussi *Jean-Louis Peyraud et Fabienne Blanc* pour leur participation et leurs conseils lors de mes comités de thèse. Merci Fabienne pour ton suivi et ton accompagnement depuis mon entrée à l'ENITA mais aussi pour tes conseils lors de ces trois années de thèse.

Je tiens à remercier *Aline Le Morvan* de l'équipe RAPA de l'UMRH. À mon arrivée en plâtre à l'INRA tu m'as chaleureusement accueillie dans ton labo, tu m'as présentée et intégrée à l'équipe. Tu m'as aidée, suivie et soutenue à chacune des étapes de la thèse et tu as assuré la réalisation d'un nombre considérable de dosage chimique, parfois même dans la hâte. Que de bons souvenirs en tant que colocataire de bureau : des discussions riches, des fou-rires, des encouragements...Merci Aline pour tous ces bons moments !

Un merci tout particulier à *Gildas Cabon et Fabien Skiba* pour m'avoir accompagnée et conseillée avec l'équipe d'ARVALIS Institut du Végétal au début de cette expérience de thèse.

Je remercie également *Isabelle Veissier*, directrice de l'Unité Mixte de Recherche sur les Herbivores (UMRH) et *Isabelle Cassar-Malek*, directrice adjointe, pour m'avoir accueillie pendant ces trois années de thèse.

Je suis reconnaissante envers *M. François Laurent*, chef du service Agronomie-Économie-Environnement d'ARVALIS Institut du Végétal pour m'avoir admise et accueillie au sein de son service.

Un grand merci à toute l'équipe RAPA :

- *Angélique Quereuil*, ma colocataire de la dernière année de thèse, merci pour les dosages, merci pour le soutien au quotidien, merci pour les fou-rires et surtout merci pour LE livre !,
- *Fabienne Picard*, mon idole, merci pour ton travail sur la SPIR, merci pour ton soutien au quotidien, pour nos riches discussions, pour nos fou-rires et un grand merci pour la fourniture d'énergie lors de la soirée « Délices de la réunion »,
- *Gaëlle Maxin*, pour ta relecture de la biblio, pour les souvenirs en Californie et pour ta sympathie au quotidien
- *Frédéric Anglard*, pour ton implication indispensable dans la manip' digestibilité, pour ton aide technique sur l'épisode « les rats mangent le maïs », merci pour ton soutien au quotidien et les troisièmes mi-temps au stade clermontois où à l'afterwork !
- *Donato* pour la SPIR et pour l'aide sur les observations du maïs et pour les discussions rugby ou « rugby » en espagnol,
- *Juliane Pourrat*, un énorme merci pour la manip' sachet, pour les riches discussions que l'on a eues et pour ta gentillesse à mon égard,
- *Pierre Capitan*, une grande reconnaissance pour ton aide efficace sur les prélèvements d'échantillons de maïs sous 40°C, pour ton aide technique sur les prélèvements de jus et les analyses de qualité de conservation,
- *Laurent Lanore*, pour ton aide lors du remplissage des sachets de nylon.

Merci à *Bertrand Dumont*, chef de l'équipe RAPA, de m'avoir accueillie et d'avoir également partagé certaines discussions rugby avec moi (L'ASM n'aura malheureusement jamais le même palmarès que Toulouse !). Je remercie également les autres personnes de l'équipe RAPA (*Cécile Ginane*, *Géraldine Fleurance*, *Vincent Niderkorn*, *Anne Farrugia*) pour leur aide et leur écoute en réunion d'équipe.

Merci aussi aux trois jeunes retraités de l'équipe RAPA :

- *Jocelyne Aufrère* pour les conseils d'expertes, pour les riches discussions autour d'un café et pour les encouragements à mon égard
- *Jean-Marie Ballet*, mille fois merci pour ton aide précieuse sur les maïs, du plantage de piquets aux récoltes et aux broyages, merci aussi pour les discussions rugby,
- *Marie-Claude Pizaine* : merci énormément pour ton travail sur l'identification et le lavage des sachets et merci pour ta gentillesse.

Je remercie également toute l'équipe DIMA :

- *Hélène Albarello* pour ton aide précieuse sur la manip' vache, que de fou-rires et de discussions sur les south park, la musique, les oiseaux, les chevaux, merci pour ce partage !,
- *Maguy Eugène* pour ta relecture de l'anglais, merci pour tes conseils, pour les moments de partage, de discussions et d'encouragement à mon égard,
- *Pierre Amblard* pour les dosages et pour tes blagues « Carambar »,
- *Lucette Genestoux* pour les dosages et ta gentillesse,
- *Sophie Laverroux* pour ton aide sur la manip flux et pour les anecdotes contées lors du prélèvement bactérien.

Un grand merci à *Michel Doreau*, aussi bien pour tous les conseils qui m'ont permise d'avancer que pour les riches discussions rugby et surtout pour celles qui ont animé les soirées du congrès en Californie. Merci aussi pour la présentation du poster en Australie et les souvenirs vidéo qui vont avec !

Merci aussi à *Diego Morgavi*, chef de l'équipe DIMA, pour m'avoir accueillie et m'avoir reçue lors des rendez-vous barbecue. Merci aussi aux autres personnes rencontrées dans cette équipe, qui m'ont soutenue et m'ont aidée à avancer par leurs conseils comme *Hamid Boudra* (merci aussi pour les rencontres foot) et *Agnès Cornu* (merci pour tes remarques lors de mes présentations orales).

Je tiens à adresser un énorme merci à *Émilie Meslier* d'ARVALIS Institut du Végétal pour son travail et son investissement dans les expérimentations menées sur le site de La Jaillière. Tu as affectonné un soin tout particulier à plus de 3000 sachets de nylon et ces nombreuses heures de travail ont contribué au bon déroulement du programme de la thèse. Merci aussi pour ta sympathie.

Merci également aux autres acteurs d'expérimentations sur le site de la Jaillière : *Jean-Charles Besnard*, *Philippe Moreau*, *Eric Bricard* et *Claude Messenger*. Merci pour votre aide lors des récoltes de maïs.

Parmi les autres acteurs indispensables de mes expérimentations, je tiens à remercier énormément *Hervé Tournadre* pour son accueil au sein de l'UERT à l'INRA mais également tout le personnel de l'UERT:

- *André Guittard*, comment oublier ton implication dans ma thèse ? Toujours prêt à répondre à mes demandes de dernière minute, toujours là pour se préoccuper de ma santé, pour me divertir, me faire rire. Merci pour les bons moments passés à l'Annexe lors des cafés ou des repas et surtout merci pour l'énorme travail dans la manip' digestibilité moutons et pour ton action « salvatrice lors de l'épisode rats »,
- *Sébastien Alcouffe*, pour ton travail, ton accueil et nos discussions,
- *Bernard Mallet*, pour l'alimentation des moutons, merci pour ta gentillesse et pour les discussions rugby,
- *Marc Augergouz*, merci pour les courses et merci pour les croissants lors des pauses café à l'Annexe,
- *Daniel Thomas*, pour l'accueil au début de ma thèse,
- *Denis Roux*, pour ton accueil à l'Annexe et pour nos riches discussions,
- *Cédric Coustet*, pour ton travail les week-ends à l'Annexe, merci pour ta sympathie et pour nos discussions animées lors de nos « casse-croûtes »,
- *Simon Collange*, pour ton travail les week-ends à l'Annexe et merci pour ta sympathie à mon égard,
- *Julien Mongiat*, pour le travail du week-end, pour ta sympathie lors de nos rendez-vous « repas à l'Annexe » et lors des rencontres foot,
- *Yoan Thomas*, pour ta gentillesse, pour ton soutien et les bons moments passés à l'Annexe ou à Redon,
- *Bruno Fredot*, pour ta gentillesse, pour les pauses café à l'Annexe et ton accueil à Redon,
- *Pascal Faure*, pour ta sympathie et pour les riches discussions en ta compagnie,
- *Sylvie Rudel*, pour ton implication et ton travail dans la manip' flux digestif mais aussi pour ta gentillesse,
- *Dominique Roux*, pour ton travail et ta sympathie lors de nos discussions,
- *Viviane Burban*, un énorme merci pour tout le travail fourni sur la manip' sachet et flux digestif et un grand merci pour ta sympathie et nos riches discussions aux Cèdres,

- *François Rosa*, pour ton travail sur la pose et le retrait des sachets, et merci pour ta gentillesse,
- *Benoit Robert*, pour tout le travail et le temps passé à régler la vitesse d'infusion des marqueurs, merci pour ta gentillesse et pour les discussions animées « on refait le monde » aux Cèdres,
- *Mathevon Christophe*, pour ta sympathie lors des pauses café matinales aux Cèdres,
- *Joel Ferreira*, pour les réparations « de fortune » sur les machines à laver Calor et pour nos discussions sur l'Aveyron,
- *Eric Villeneuve*, pour ta sympathie, pour nos échanges, pour les semis et les mises en silo et pour ton implication dans ma thèse,
- *Didier Chalaphy*, pour ton aide sur les récoltes et merci pour ta sympathie lors de notre « casse-croûte » au domaine,
- *Philippe Jouve*, pour nos « voyages sans fin » en camion, merci pour les récoltes et pour ton soutien indispensable en tant que collègue du Stade Toulousain,
- *Maxime Navech*, pour ta sympathie cantalienne, merci pour ton travail à l'Annexe et au domaine, merci pour m'avoir aidée quand j'avais besoin de muscles dans l'épisode « rats » et merci pour tous les autres bons moments en ta compagnie,
- *Patrice Mandon*, pour ton aide précieuse lors de l'épisode « rats », pour ta sympathie et pour m'avoir divertie à chacune de mes venues aux Intrabois,
- *Christian Leoty*, pour ton travail sur les silos et pour ta sympathie,
- *Fernand Gillet*, pour ton aide sur les silos et pour ta gentillesse,
- *Olivier Gourdon*, pour la conduite de l'ensileuse et pour m'avoir accueillie dans l'habitable afin que je puisse prendre de la hauteur sur les maïs !,
- *Didier Faye*, pour les semis à Crouël et la gestion de la culture

À vous tous Merci.

Merci aux secrétaires INRA :

- *Pascale Francisco*, pour ton extrême gentillesse, pour les discussions « Dieux du stade » et pour ton aide précieuse pour la finalisation technique de ce manuscrit de thèse,
- *Anne-Marie Chanel*, pour tes services en l'absence de Pascale et aussi pour ta gentillesse et ta préoccupation à mon égard,
- *Nathalie Gocel*, pour ta gentillesse, pour tes petites attentions à mon égard, et pour nos riches discussions
- *Odile Poux*, pour ta gentillesse et ta préoccupation constante à mon égard aussi bien à l'INRA que dans nos entrevues à Aurières.

Merci aussi à *Maryse Teyssedre* et *Nicolas Barrière* pour les aspects administratifs et à *Annie Royet*, merci pour ta sympathie et pour notre souvenir commun un soir d'automne à Chadrat.

Merci au personnel administratif d'ARVALIS Institut-du Végétal :

- *Sylvie Bienvenu* pour ton accueil chaleureux lors de nos conversations téléphoniques, merci pour tous les services rendus, merci pour ta bonne humeur et pour ta gentillesse à mon égard,
- *Michelle Rousseau* et *Christine Magré*, pour votre aide sur les aspects administratifs.

Merci à mes trois stagiaires remarquables :

- *Elodie Watremez*, pour ton super travail sur les analyses sachets, merci pour ta sympathie et merci pour ton soutien,
- *Bertrand Deroche*, pour ton très bon travail sur les digestibilités *in vivo* et labo, merci pour ta sympathie et ta préoccupation à mon égard en fin de thèse,
- *Sonia Roger* pour ton travail efficace sur les analyses sachets et merci aussi pour ta gentillesse et nos discussions.

Merci à ma CDD exceptionnelle, *Julie Payet*. En venant de Castres, à proximité de Toulouse, tu ne pouvais que me plaire. Merci pour ton énorme travail sur les dosages chimiques, souvent réalisés dans la hâte. Merci aussi pour ta sympathie, ta bonne-humeur quotidienne, tes chamailleries mémorables avec « Bé-Ber » et ton soutien à toutes épreuves. Ton passage a été un vrai soleil dans ma thèse.

Je tiens également à remercier tous les collègues que j'ai côtoyés pendant ces trois années à l'INRA et qui sont même devenus des amis :

- *Stéphane Andanson*, que de souvenirs ! De la pêche à ligne des agneaux en stage de M2 aux riches discussions que l'on a eu sur la musique, le rugby, sur la vie en général. Merci pour ton soutien pendant ces 4 années, je n'oublierai pas,

- *Christine Ravel*, avec toutes les crises de fou-rires que l'on a eues, on a réussi à se tailler des abdos de déesses ! merci pour tous ces bons moments, pour les chamailleries rugby, pour les petites attentions à mon égard au quotidien, ton amitié m'a permis de tenir bon !,

- *Éric Delval*, j'vas té faire un tiot poème : « la culture des mots, de Maupassant à Diderot, ont fait de toi mon idole et c'est un bien petit mot, pour exprimer à quel point, de mes 50 cm de haut, j'ai été touchée par tes attentions et tes mots aussi doux que les petits agneaux de tes bandes vidéos »,

- *Marie-Madeleine Mialon*, comment pourrais-je oublier cet excès de gentillesse, ces conseils avisés, ta préoccupation à mon égard, Marie vraiment un grand merci !,

- *Alain Boissy*, pour ta gentillesse et les encouragements à mon égard,

- *Xavier Boivin*, pour ta formation en M2 et nos riches discussions

- *Anne de la Torre*, merci pour ta sympathie et les bons souvenirs ensemble en Californie

- *José Pires*, un grand merci pour tes relectures de dernière minute en anglais et merci pour ta sympathie lors de nos discussions de couloir !

- *Alice De Boyer des Roches*, merci pour la machine à pop-corn et ta gentillesse !

Merci aussi à *Brigitte Veyssiere*, pour m'avoir tenue compagnie le mardi, lors mes longues soirées rédaction

Merci à tous mes amis avec qui j'ai passé de très bons moments à l'INRA :

- *Marion Gaborit*, petits souvenirs à l'INRA mais grand moments à l'extérieur, des instants d'automne à Chadrat, aux discussions techniques en passant par des soirées concert et théâtre. Merci pour ta gentillesse et ton soutien,

- *Véronique Deiss*, pour ton hébergement dans mes instants « plâtre », merci pour ces discussions à « refaire le monde », merci pour les idées de génies partagées, pour les bons moments lors des fabrications de bières artisanales et pour tout le soutien au quotidien,

- *Raphaëlle Botreau*, pour ton soutien, ta gentillesse, tes soirées barbeuc, merci d'avoir été là !

- *Alexandra Scohier*, pour ta gentillesse et ton soutien,

- *Lisandre De Oliveira*, ma brésilienne, un vrai soleil, et même à plus de 10 000 km de moi tu as toujours été là pour me soutenir, merci mon cœur d'or,

- *Thais Devincenzi*, pour ta bonne humeur et ton amitié,

- *Lia Della Rossa*, pour ton amitié et les soirées en ta compagnie,

- *Sophie Hild*, pour ta gentillesse, pour les bons moments ensemble et pour ton humour,

- *Hervé Dakpo*, merci « mi amor » comme tu le dit si bien, pour ces moments de rigolade, de partage et d'amitié,

- *Jessie Guyader*, pour nos expériences communes dans ces années de thèse et merci pour ta gentillesse et ton soutien,

- *Inès Sneessens*, pour ta gentillesse et pour les moments d'amitié en ta compagnie,

- *Benoit-Pierre Mourot*, pour les moments de rigolade au foot,

- *Valérie Paulmier*, pour les bons moments au foot,

- *Marion Faure*, pour ces riches échanges notamment à l'Annexe,

- *Jean-Baptiste Menassol*, pour ta gentillesse et nos folles discussions.

Je tiens à remercier plus particulièrement

- *Cécile Bourguet-Beaugier* pour tes conseils professionnels, merci d'avoir été à mon écoute comme une grande sœur pour me guider et me conseiller, et pour les bons moments en ta compagnie et celle de ta famille,

- *Alexandra Destrez et son mari Lionel Thierry*, petits souvenirs à l'ENITA mais que de grands moments à l'INRA. Merci Alex pour ton écoute, ta gentillesse, tes mots doux, et merci Lionel pour tes « débriefs rugby » et pour les moments de rigolade notamment « en repensant à l'épisode « puce »,

- *Nadège Ferro-Famil et Adrien Raballand*, Nadège de tous ces bons moments, des 5h de discussions sur un parking à Rennes à nos fou-rires à l'INRA en passant par nos retrouvailles à Brioude avec la merveilleuse Léa, merci à Adrien pour avoir supporté cette amitié « folle » entre moi et Nadège et pour avoir partagé des bons moments avec nous,

- *Giuseppe Copani*, mon sicilien préféré, merci pour nos échanges, pour ton soutien, pour ces soirées endiablées et pour tous les fou-rires,

- *Lahlou Bahloul*, mon larrrrrlhou, merci d'avoir été là, à chaque étape, pour ces beaux souvenirs en Mustang en Californie, pour le soutien lors de nos folles soirées travail le week-end à l'INRA. Tu as été une perle avec moi !,

- *Claire Collas*, ma co-équipière de choc, dans la même galère que moi, au même moment et malgré tout tu as toujours été là pour me soutenir par ta gentillesse, tes folles aventures et ton humour ! Que de bons moments en ta compagnie ! Merci !

Merci à mes amis de l'ENITA qui ont toujours été là pour moi, pour me soutenir pendant ces trois années de thèse :

- *Jean-Bernard Loubeyre*, malgré l'éloignement, tu as toujours été attentionné envers moi, merci !,

- *Charles Duvignaud*, merci pour ta sympathie et pour ton soutien,

- *Julie Bertrand et Vincent Borthot*, merci à votre petite famille d'avoir toujours été là pour moi et pour votre préoccupation à mon égard,

- Aux filles du club des 5N : *Sarah Poget, Marion Enard, Agathe Pegon, Juliette Pinguet* ; merci à toutes d'être encore aussi présente dans ma vie,

- *Marie Stanko*, pour avoir été là, pour tous ces moments de folie en ta compagnie et pour nos rigolades,

- *Clémentine Robin*, même à l'autre bout du monde, tu es encore là présente pour moi, merci ma Monique !,

- *Anne Laure Porcher*, ma réunionnaise qui a toujours une pensée pour moi et *Caroline Moulin*, malgré les années, tu es toujours là !

Je remercie également tous les autres amis qui ont su « à m'en donné », me soutenir et me faire vivre de belles expériences : *Marine Lestrade, Lucie Almagro et Angèle Soulenq* (mes deux lotoises préférées et ma « carladèze » de cœur), *tous les jeunes d'Huparlac, Sophia et Boris, les jeunes du petit Bognat à Aurières*.

Un grand merci à mon kiné, *Jérémy*, pour avoir soigné toutes mes blessures, de la cheville à l'épaule. Merci Jérémy pour tes blagues, tes chansons, tes histoires de fou, elles m'ont aidé à penser à autre chose qu'à ma thèse !

Je souhaite adresser un remerciement spécifique pour :

- *Justine Lanquetin*, mon amie éternelle, qui m'a suivie du début à la fin dans cette aventure, des folles soirées ENITA à notre séjour en Californie à ton hébergement lors de mes formations à Lyon. Tu es et restera l'un de mes meilleurs soutien dans cette trois années de

thèse et mes remerciements ne seront jamais assez grand pour exprimer toute ma gratitude envers toi. MERCI vraiment !)

- *Élise Dombre*, mon amie aveyronnaise de cœur, toujours là, à chaque étape depuis le début, tu m'as aidée à travers les bons et les mauvais moments, et sans toi et ton soutien, je n'en serai jamais arrivée là, MERCI mille fois !

Je tiens à adresser un MERCI tout particulier à *Melle Bérengère Depiets*, devenue Mme Petit (dit « Petit Pieds ! »). Dès ton arrivée à l'INRA, tu es vite devenue l'amie sur qui j'ai pu compter dans les bons et les mauvais moments. Attentionnée et dotée d'une gentillesse qu'il n'est aujourd'hui pas possible d'égaler, tu as su me redonner le sourire dans les moments vides mais aussi dans les moments de pur « crackage » émotionnel ! Du concert de Shaka Ponk à la mise en forme de mon manuscrit avec des références « culinaires », tu as été sur tous les fronts....MERCI, ma-co-blonde !

Je souhaite adresser un merci tout particulier à *M. et Mme Bonjean* pour leur gentillesse, leur accueil à Aurières, leur soutien et les nombreuses petites attentions à mon égard au cours de ma thèse.

Je tiens à adresser un merci tout particulier à ma famille :

- *Mes parents*, merci d'avoir été tous les deux là pour moi, merci maman pour être venue à ma rescousse dans les moments d'écriture, merci papa pour ton soutien au quotidien,
- *mon grand-père Casimir*, toujours là pour prendre soin de sa petite-fille,
- *mon grand frère Olivier et ma belle-sœur Sophie*, votre préoccupation à mon égard, votre protection en tant que grand frère et grande sœur, votre soutien et votre aide à chaque étape de la thèse, m'ont donné du courage, de la force et de l'envie. Merci à vous deux d'être toujours là pour moi,
- *ma nièce Élis*a, le petit soleil de mes week-ends en Aveyron. Par ses sourires et ses douceurs à mon égard, elle m'a apporté le meilleur soutien qu'on puisse avoir,
- mes cousines et cousins, *Sabine* merci pour ton soutien, ta gentillesse et les bons moments en ta compagnie, *Héloïse, Clémence, Anthony, Christophe et Élise, Fabien et Nadège*, toujours là et attentionnés envers moi,
- mes oncles et tantes, à *Christian et Sophie, Gisèle et Philippe, Guy et Joëlle, Christian mon parrain*, pour votre gentillesse et votre soutien,
- ma marraine *Pierrette*, un pur bonheur d'avoir une marraine aussi attentionnée, un véritable cadeau que ce soit dans les bons moments ou les moments plus difficiles, merci pour ton soutien dans ma thèse, cela m'a aidé à avoir du courage. Merci aussi à Laurent et pour les bons souvenirs « Rugby » au stade Marcel Michelin.
- à *Jean*, pour ton soutien depuis des années
- Merci à *Gérard et Marie* pour leur gentillesse, leur soutien et leur accueil toujours aussi chaleureux

Je tiens enfin, à dédier cette thèse aux deux personnes qui m'ont le plus soutenue au quotidien, et qui, par leur force naturelle, m'ont apportée une détermination à toutes épreuves, quelle que soit les difficultés.

À toi, *ma grand-mère Élis*e, je souhaite dédier cette thèse qui est à l'image de la combativité que tu as su me transmettre au fil des années. Tu as batis notre patrimoine familial à partir de rien et je tiens à te dire aujourd'hui à quel point je suis fière de faire partie de la famille que tu as construite. Tout au long de mes études, tu as été là, à chaque étape, et si j'en suis arrivée là aujourd'hui c'est grâce à toi ! Merci Mamie....Cette thèse c'est à toi que je la dois !

À toi, *Marjorie*, je dédie également cette thèse. À mon arrivée à l'INRA, tu m'as prise sous ton aile pour m'encadrer dans mon stage de Master 2. Puis, vint la thèse. Comme tu t'amusais souvent si bien à le dire, « ta thèse, c'est grâce à moi ». Je dois l'avouer, OUI, je n'en serai pas là si tu ne m'avais pas soutenue et répondu à mes inquiétudes à la sortie du Master. Puis, lors de ces trois années de thèse, tu as été là, à chaque étape, pour me conseiller, me guider mais aussi pour me faire rire, me divertir....et que de bons moments nous avons passés ensemble....que de souvenirs.....de la peinture des agneaux en rouge et noir et en jaune et bleu...aux soirées barbecue, crêpes, cinéma, canoë, TV « l'amour est dans le pré »,.... ou encore « time's up avec Lionel et Alex qui trichaient tout le temps !,....qu'est-ce qu'on s'est marré quand même !....

La vie ne t'as pas gâtée, et pourtant, tu as tout le temps été là pour moi, quand ça allait ou quand ça n'allait pas...Ta force de caractère, ton courage, ta détermination qui font de toi la jeune chercheuse au plus beau CV que je connaisse, m'ont encouragée à me surpasser...Jamais je n'oublierai ce que tu as fait pour moi ...Ce travail c'est le mien, c'est le tien, c'est le fruit d'une rencontre, d'une amitié que je n'oublierai jamais...

Je souhaite enfin adresser une pensée pour :

Michel Fabre, qui fut l'un des acteurs indispensable de mes expérimentations. Les repas et les discussions « Rugby » à l'Annexe à ses côtés resteront de très bons moments.

Danielle Comby. Sa gentillesse et son sourire étaient le soleil de chacune de mes pauses café.

Mes grands-parents maternels. Leurs souvenirs m'ont apporté chaque jour de la force et du courage.

Guillaume, mon cousin. « Le fil n'est pas coupé, il est toujours là », et ma détermination dans ce travail, c'est grâce à lui.



**« La bible Maya raconte que Dieu a créé l'Homme avec le maïs
puisque'il existe des maïs jaune, noir, rouge et blanc »**

Tables des matières

Introduction	21
Synthèse bibliographique	27
1.Évolution de l'amidon et des parois végétales au cours du cycle de développement du maïs et lors de la fermentation dans l'ensilage	28
1.1. Influence du stade de maturité sur la composition morphologique et chimique du maïs fourrage.....	28
1.1.1 La maturation de la plante de maïs au cours du cycle de végétation et son évaluation	28
1.1.2 Modifications de la morphologie de la plante de maïs avec le stade de maturité	32
1.1.3 Les constituants chimiques de la plante entière et des fractions « épi et canne » : évolution en fonction du stade de maturité	33
1.1.3.1 L'amidon.....	33
1.1.3.2 Les constituants pariétaux ou parois végétales (NDF)	35
1.1.3.3 Autres constituants de la plante entière	37
1.2 Influence de la fermentation dans l'ensilage sur la composition chimique du maïs fourrage.....	39
1.2.1 Les processus de fermentation	39
1.2.2 Évolution des constituants chimiques de la plante entière au cours de la fermentation.....	40
1.3 Influence de la variété sur la composition chimique du maïs fourrage	41
2. Devenir de l'amidon et des parois végétales du maïs au cours de la digestion chez les ruminants	44
2.1. Méthodes de mesures pour caractériser la digestion de l'amidon et des constituants pariétaux	45
2.1.1 Mesure de la digestibilité dans l'ensemble du tractus digestif	45
2.1.2. Mesure de la digestion dans les différents compartiments digestifs	46
2.1.2.1 Méthode <i>in situ</i> ou <i>in sacco</i> pour la mesure de la dégradation dans rumen.....	46
2.1.2.2. Mesure des flux digestifs: technique du double marquage	48
2.2. Les mécanismes généraux de la digestion de l'amidon et des parois végétales du maïs chez les ruminants	49
2.2.1. Digestibilité dans l'ensemble du tube digestif	49
2.2.1.1. Digestibilité <i>in vivo</i> du NDF	49
2.2.1.2. Digestibilité <i>in vivo</i> de l'amidon.....	49
2.2.2. Digestion dans le rumen.....	50
2.2.2.1. Dégradabilité du NDF dans le rumen (mesures <i>in sacco</i>).....	51
2.2.2.2. Dégradabilité du NDF dans le rumen (mesures <i>in vivo</i>).....	52
2.2.2.3. Dégradabilité de l'amidon dans le rumen (mesures <i>in sacco</i>)	53
2.2.2.4. Dégradabilité de l'amidon dans le rumen (mesures <i>in vivo</i>).....	53
2.2.3. Digestion dans le compartiment intestinal	54
2.2.3.1. Digestibilité du NDF dans le gros intestin	54

2.2.3.2. Digestibilité de l'amidon dans l'intestin grêle et le gros intestin.....	54
2.2.4. Fractions non digérées retrouvées dans les fèces.....	55
2.2.4.1. Fraction de NDF non digérée.....	55
2.2.4.2. Fraction d'amidon non digérée.....	55
2.3 Facteurs de variation de la digestion du maïs fourrage chez les ruminants	56
2.3.1. Influence du stade de maturité du maïs sur la digestion du maïs fourrage	56
2.3.1.1. Dans l'ensemble du tube digestif.....	56
2.3.1.2. Dans le rumen	59
2.3.1.3. Dans les intestins.....	60
2.3.2 Influence du génotype du maïs sur la digestion du maïs fourrage	61
2.3.2.1. Dans l'ensemble du tube digestif.....	61
2.3.2.2. Dans le rumen	62
2.3.2.3. Dans les intestins.....	63
2.3.3 Influence de la conservation en ensilage sur la digestion du maïs fourrage.....	64
2.3.2.1. Dans l'ensemble du tube digestif.....	64
2.3.2.2. Dans le rumen	64
2.3.2.3. Dans les intestins.....	65
3. Prévion de la valeur énergétique du maïs ensilage	66
3.1. La valeur énergétique du maïs ensilage : définitions, caractéristiques et méthodes actuelles d'évaluation en France et à l'international	66
3.1.1 Calcul de la valeur énergétique en France	66
3.1.2 Méthodes de prévion de la digestibilité en France	66
3.1.3 Prévion de la valeur énergétique dans les autres pays	68
3.2. Améliorer ou préciser la prévion de la valeur énergétique du système français : enjeux et nouveaux critères	70
3.2.1 Pistes proposées pour améliorer la prévion de la valeur énergétique	70
3.2.2.1. La teneur en parois végétales non digestibles (NDFnd)	70
3.2.2.2. Les critères <i>in sacco</i> et <i>in vitro</i> : un lien possible avec la dMO ?	71
3.2.2 La révision des systèmes d'unité d'alimentation énergétique et protéique français : définition et objectif du projet Systali.....	71

Objectifs scientifiques et stratégie expérimentale 76

Matériel végétal de l'étude 81

1. Conditions climatiques pendant le cycle de développement des maïs.....	83
1.1 Maïs cultivés à la station expérimentale de La Jaillière : deux années de mesures aux conditions climatiques très contrastées	83
1.2 Maïs cultivés à la station expérimentale de Crouël : une année de mesure particulièrement chaude et sèche.....	84
2. Caractéristiques agronomiques des maïs avant la récolte	85

3. Rendement et composition chimique des maïs à la récolte.....	87
4. Paramètres liés à la conservation des maïs sous forme d'ensilage.....	88

Chapitre 1 Influence du stade de maturité et de la variété sur la digestibilité in vivo de l'ensilage de maïs (<i>Article en préparation pour Animal</i>)	91
--	-----------

Chapitre 2 Influence de la conservation en ensilage et du conditionnement des échantillons sur la dégradation ruminale <i>in situ</i> de la matière sèche, de l'amidon et des parois végétales du maïs fourrage (<i>Peyrat et al., 2014 dans "Animal Feed Science and Technology"</i>).....	127
--	------------

Chapitre 3 Influence de la conservation en ensilage, du stade de maturité et de la variété sur la dégradation ruminale <i>in situ</i> de la matière sèche, de l'amidon et des parois végétales du maïs fourrage (<i>Article en preparation pour Animal</i>)	155
--	------------

Chapitre 4 Effets du stade de maturité en interaction avec la variété sur la digestion ruminale et intestinale de l'ensilage de maïs chez la vache laitière tarie (<i>Article soumis à Journal of Dairy Science</i>)	185
---	------------

Discussion	221
-------------------------	------------

1. Variabilité de la composition chimique, de la digestibilité dans l'ensemble du tube digestif et de la dégradabilité dans le rumen	223
--	-----

1.1. Influence du stade de maturité.....	223
--	-----

1.1.1 Composition chimique	223
----------------------------------	-----

1.1.2 Digestibilité dans l'ensemble du tube digestif (modèle mouton).....	224
---	-----

1.1.3 Digestibilité dans l'ensemble du tube digestif (modèle vache).....	226
--	-----

1.1.4 Constituants digestibles.....	228
-------------------------------------	-----

1.1.5 Dégradabilité ruminale (mesures in sacco)	229
---	-----

1.1.6 Dégradabilité ruminale (mesures in vivo).....	230
---	-----

1.2. Influence de la variété.....	231
-----------------------------------	-----

1.2.1 Composition chimique	231
----------------------------------	-----

1.2.2 Digestibilité dans l'ensemble du tube digestif	233
--	-----

1.2.3 Dégradabilité et digestibilité ruminale (mesures in sacco et in vivo)	233
---	-----

1.3. Variations liées aux conditions climatiques.....	234
---	-----

1.3.1 Composition chimique	234
----------------------------------	-----

1.3.2 Digestibilité dans l'ensemble du tube digestif	234
--	-----

1.3.3 Constituants digestibles.....	234
-------------------------------------	-----

1.3.4 Dégradabilité ruminale (mesures in sacco)	235
---	-----

1.4. Influence de la conservation en ensilage	235
---	-----

2. Prévion des paramètres de la digestion.....	237
--	-----

2.1 Prévion de la digestibilité <i>in vivo</i> de la matière organique (dMO)	238
--	-----

2.2 La dégradation <i>in sacco</i> permet-elle de prévoir la digestibilité <i>in vivo</i> ?	240
---	-----

2.3 Relation entre la dMO <i>in vivo</i> et la fraction pariétale non digestible	242
2.4 Peut-on prévoir l'amidon dégradable ?	246
Conclusion et perspectives.....	251
Valorisations scientifiques	273
Annexes.....	275

Liste des figures

Figure 1 : Morphologie et cycle de développement du maïs	29
Figure 2 : Détermination du stade de maturité de la plante de maïs d'après la position de la ligne de remplissage du grain.....	30
Figure 3 : Influence du stade de maturité sur la composition morphologique du maïs en vert	32
Figure 4 : Relation apparente entre la teneur en amidon et la teneur en MS de la plante entière d'ensilage de maïs	34
Figure 5 : Relation apparente entre la teneur en amidon et la teneur en MS de la plante entière de maïs en vert.....	34
Figure 6 : Évolution de la teneur en NDF avec la maturité pour le maïs en vert.....	36
Figure 7 : Évolution de la teneur en ADF avec la maturité pour le maïs en vert.....	36
Figure 8 : Évolution de la teneur en ADL avec la maturité pour le maïs en vert.....	37
Figure 9: Évolution de la teneur en glucides solubles avec la maturité pour le maïs en vert .	38
Figure 10 : Évolution des constituants chimiques de la plante entière (moyenne $\pm$ erreur type) avec la fermentation dans l'ensilage	40
Figure 11 : Structure de l'amidon farineux (grains dentés) et vitreux (grains cornés) et caractéristiques de leur endosperme.....	42
Figure 12 : Digestion de l'amidon et des parois végétales chez les bovins	51
Figure 13 : Relation entre la digestibilité de la matière organique (dMO) des maïs plante entière en vert et leur teneur en parois végétales non digestibles (NDFnd).....	57
Figure 14 : Relation entre la digestibilité de la matière organique des maïs plante entière en vert et leur teneur en amidon (NDFnd)	58
Figure 15 : Évolution de la dégradabilité in sacco et de la digestibilité in vivo de l'amidon et du NDF de l'ensilage de maïs avec la maturité.....	60
Figure 16: Les différentes étapes de l'utilisation de l'énergie par les ruminants	69
Figure 17 : Objectifs et stratégies expérimentales de la thèse.....	80
Figure 18 : Alimentation en eau des cultures de maïs en 2011 et 2012	84
Figure 19 : Écart de sommes de températures de l'année 2012 avec la médiane (1982-2011) sur la période du 16 avril au 20 octobre	85
Figure 20: Confection des silos-sacs pour les maïs récoltés sur le site de La Jaillière	88
Figure 21 : Confection des silos boudins pour les maïs récoltés sur le site de Crouël	88
Figure 22 : Évolution de la teneur en amidon et en NDF des maïs (vert et ensilé) de la thèse et des maïs vert ayant servi à l'élaboration des Tables INRA (2007) selon la maturité.....	224
Figure 23 : Évolution de la digestibilité in vivo de la MO, de l'amidon et du NDF avec la maturité (mesures sur moutons)	225
Figure 24 : Digestibilité in vivo de la MO et du NDF issues des données de la thèse et des valeurs mesurées en vert (Tables INRA, 2007) pour une teneur en MS supérieure à 25% ...	226
Figure 25 : Évolution de la digestibilité in vivo de la MO, de l'amidon et du NDF avec la maturité (mesures sur vaches)	227

Figure 26 : Comparaison des teneurs en NDF et ADF et de la digestibilité in vivo du NDF des ensilages de maïs récoltés à Crouël entre les deux expérimentations in vivo « vaches » et « moutons »	228
Figure 27 : Évolution de la teneur en MO digestible, en amidon digestible et en NDF digestible avec la maturité (mesures in vivo sur moutons)	229
Figure 28 : Évolution de la dégradabilité de la MS, du NDF et de l'amidon dans le rumen avec la maturité (mesures in sacco sur vaches)	230
Figure 29 : Évolution de la dégradabilité de la MS, du NDF et de l'amidon dans le rumen avec la maturité (comparaison des mesures in sacco et in vivo sur vaches)	231
Figure 30 : Variabilité de la teneur en amidon et de la teneur en NDF des ensilages de maïs de l'étude selon la variété et l'année de récolte	232
Figure 31 : Influence de la fermentation dans l'ensilage sur la dégradabilité in sacco (DT) de la MS, de l'amidon et du NDF	236
Figure 32 : Préviation de la dMO in vivo mesurée à partir des modèles M1, M2, M3 et M4 proposés par Andrieu (1995)	238
Figure 33 : Relation entre la dMO in vivo et la dégradation in sacco de la MS à 24h et à 48h	240
Figure 34 : Relation entre la digestibilité in vivo du NDF et la dégradation in sacco de la MS à 24h et à 48h	241
Figure 35 : Relation entre la quantité de NDF non digestible in vivo et la quantité de NDF non dégradable in sacco à 24h et à 48h	242
Figure 36 : Relation entre la dMO in vivo et la teneur en NDFnd in vivo	243
Figure 37 : Relation entre la digestibilité enzymatique du NDF (DCNDF) et la digestibilité in vivo du NDF et de la MO.....	243
Figure 38 : Relation entre la digestibilité enzymatique de la plante entière (DCS) et la digestibilité in vivo de la MO.....	244
Figure 39 : Relation entre la digestibilité DINAG et la digestibilité du NDF in vivo et la digestibilité de la matière organique in vivo	245
Figure 40 : Évolution du critère DCNDF et du critère DINAG selon la maturité, les variétés et l'année de récolte	245
Figure 41 : Variabilité de la teneur en amidon dégradable dans le rumen des ensilages de maïs	247

Liste des tableaux

Tableau 1 : Correspondance entre l'aspect du grain après écrasement et les teneurs en MS de la plante entière	30
Tableau 2 : Partition de la digestion de l'amidon et des parois végétales du maïs fourrage à partir des données de la littérature.....	50
Tableau 3 : Évolution variétale des composantes agronomiques de la plante de maïs en vert, et variations de la composition chimique et de la digestibilité de l'ensilage de maïs à partir de diverses variétés entre 1958 et 2002	62
Tableau 4 : Principes de calcul de la valeur énergétique des aliments en France	67
Tableau 5: Prédiction de la digestibilité in vivo de la MO (dMO en %) à partir de la composition chimique (g/kg MO) et de la digestibilité enzymatique de la MS.....	67
Tableau 6 : Les systèmes d'alimentation énergétique utilisés dans différents pays.....	69
Tableau 7 : Caractérisation des variétés de maïs et des stades de récolte utilisés dans les expérimentations de l'étude	83
Tableau 8 : Caractéristiques des maïs avant la récolte	86
Tableau 9 : Caractéristiques des maïs à la récolte et après fermentation	87
Tableau 10 : Caractéristiques fermentaires des ensilages de maïs	89
Tableau 11 : Corrélations entre la digestibilité in vivo du NDF (dNDF) et de la MO (dMO) de l'ensilage de maïs et des critères agronomiques mesurés sur le maïs en vert.....	246
Tableau 12 : Corrélations de la dégradabilité théorique in sacco de l'amidon (DT) et de la teneur en amidon dégradable de l'ensilage de maïs avec des critères agronomiques, chimiques et enzymatiques mesurés sur le maïs en vert.....	248

Introduction

En France, comme dans la moitié nord de l'Europe mais aussi au Canada et aux États-Unis, les surfaces consacrées au maïs fourrage sont relativement importantes. En Europe, la surface de maïs fourrage a considérablement augmenté depuis les années 60 pour atteindre 5,6 millions d'hectares en 2011. En France, cette surface de maïs fourrage représentait 11,6% de la surface fourragère principale (SFP) en 2013 soit 5,5% de la surface agricole utile (SAU) (source Agreste, 2014). En 2013, la culture de maïs fourrage a atteint un rendement moyen de 12,5 tonnes de MS/ha. La production de maïs fourrage est très liée à la production laitière et se concentre donc principalement dans les trois régions d'élevage Pays-de-Loire, Bretagne et Basse Normandie qui totalisent 60% de la sole de maïs fourrage. Les surfaces de maïs fourrage sont également très importantes dans les régions du Sud-Ouest (Midi Pyrénées, Pyrénées Atlantique, Aquitaine) où les exploitations allaitantes avec engraissement de jeunes bovins sont nombreuses. Malgré une baisse du nombre d'élevages laitiers et allaitants (-37% en 10 ans) et un recul important du cheptel laitier (-12% en 10 ans), les surfaces de maïs fourrage restent relativement stables (~1,4 Mha), soutenues par une augmentation de la productivité par vache laitière (+10% en 10 ans) et par la baisse de la part d'herbe pâturée dans la ration.

Depuis presque 40 ans, le maïs fourrage est le fourrage principal des rations hivernales des vaches laitières (Khan *et al.*, 2014) et des taurillons à l'engrais (Arsić *et al.*, 2012). Avec le maïs ensilage, les éleveurs disposent d'une ration de base à forte valeur énergétique qui assure la couverture des besoins (entretien et lactation ou engraissement) des ruminants à haut niveau de production. Étant donné son importance dans l'alimentation des ruminants, de nombreux travaux ont été menés afin de préciser la valeur nutritive énergétique de l'ensilage de maïs (Andrieu et Demarquilly, 1974a). L'influence des facteurs de variation de la valeur nutritive a aussi été analysée qu'il s'agisse de la variété (Barrière *et al.*, 1995 ; Argillier et Barrière, 1996), du stade de maturité (Andrieu *et al.*, 1993 ; Demarquilly, 1994) ou des caractéristiques fermentaires du maïs fourrage (Andrieu et Demarquilly, 1974b). À partir de ces résultats, plusieurs équations ont été proposées pour prévoir la valeur nutritive au laboratoire. Ces prévisions reposent avant tout sur l'estimation de la digestibilité de la matière organique de la plante entière. Ces équations ne donnent donc pas d'indications sur la nature de l'apport d'énergie qui peut provenir de deux substrats très différents : l'amidon et les parois végétales. En effet, l'ensilage de maïs est un aliment complexe et hétérogène, composé d'une fraction amylacée (le grain) et d'une fraction pariétale (les tiges et les feuilles) dont les proportions relatives dans la plante entière varient notamment en fonction du stade de maturité, des variétés et des conditions climatiques. Ces deux fractions sont aussi

caractérisées par des niveaux et des sites de digestion différents, ce qui contribue à une variabilité importante dans la quantité et la nature des nutriments fournis à l'animal. En effet, les parois végétales ne sont digérées que dans les compartiments microbiens (rumen essentiellement et dans une moindre mesure gros intestin), et conduisent à la fourniture d'énergie à l'animal par les produits terminaux de la fermentation. En revanche, la digestion de l'amidon se répartit entre le rumen, l'intestin grêle et le gros intestin, la digestion dans l'intestin grêle pouvant conduire à une fourniture non négligeable de glucose. De plus, ces deux fractions se caractérisent par une variabilité importante concernant leurs vitesses de digestion dans les différents compartiments digestifs, qui peuvent influencer leur digestion totale dans le tube digestif. Ces caractéristiques de la digestion des fractions sont tributaires de plusieurs facteurs de variation qui ont fait l'objet de plusieurs études ces dernières années. Ainsi, par exemple, l'influence du stade de maturité et de la variété sur la digestion dans le rumen a été analysée pour la fraction amylacée (thèse de C. Philippeau, 1998) et la fraction pariétale (thèse de M. Tovar-Gomez, 1998). Une autre étude (thèse de I. Fernandez, 2003) s'est intéressée à l'effet de la finesse de hachage sur la digestion des deux fractions dans l'ensemble des compartiments du tube digestif.

Avec les évolutions récentes des variétés, les itinéraires techniques, et les stades de maturité à la récolte (on observe sur le terrain une tendance à récolter plus fréquemment à des teneurs en MS supérieures à 35% voire à 40%), il est important de réactualiser les données sur la valeur énergétique de l'ensilage de maïs et de valider voire préciser son système de prévision (les données qui sous-tendent les tables INRA et les équations de prévision ayant été acquises entre 1987 et 1993). Depuis les derniers travaux de Barrière *et al.* (2005), aucune étude n'a été mise en œuvre pour analyser la digestibilité *in vivo* des nouveaux maïs. Barrière *et al.* (2005) évoquaient notamment une nette diminution de la digestibilité des parois végétales entre les variétés des années 50 et les variétés actuelles, et ce malgré une meilleure spécialisation des maïs pour une utilisation en fourrage ou en grain. Par ailleurs aujourd'hui, pour les ensilages de maïs, aucune référence officielle n'est présente dans les tables INRA (2007) sur la dégradabilité de l'amidon dans le rumen. Pourtant ce paramètre est très important, d'une part pour évaluer la matière organique fermentescible dans le rumen et donc sa valeur azotée *via* la synthèse microbienne qui en résulte et, d'autre part, pour améliorer la complémentation des rations basées sur l'ensilage de maïs en relation avec la maîtrise de la qualité des produits et des risques liés à la santé animale.

À partir des constats précédents, l'Unité Mixte de Recherche sur les Herbivores (UMRH) et ARVALIS-Institut du Végétal, déjà collaborateurs sur les précédents travaux du

maïs fourrage, ont décidé de construire un programme de recherches sur la digestion et la valeur nutritive des ensilages de maïs. Ce projet a alors été mis en œuvre au travers d'une thèse CIFRE et d'un contrat de recherche financé avec le soutien de l'Union Française des Semenciers (UFS) et de la Fédération Nationale des Producteurs de Semences de Maïs et de Sorgho (FNPSMS). L'amélioration de la connaissance et de la prévision de la valeur nutritive de l'ensilage de maïs dans ses différentes dimensions (digestibilité, devenir dans le rumen des fractions amidon et parois végétales) constitue un des enjeux de l'amélioration des systèmes d'alimentation des ruminants conduite actuellement par le département Physiologie Animale et système d'Élevage de l'INRA dont fait partie l'UMRH mais représente aussi l'un des objectifs des travaux de recherche et développement conduits par ARVALIS-Institut du Végétal. Désireux d'obtenir sur le terrain une validation du système de prévision de la valeur nutritive de l'ensilage de maïs ou, dans le cas contraire, une amélioration de sa précision en fonction de critères liés à la fraction amidon et aux parois végétales, l'UFS et la FNPSMS ont donc appuyé financièrement ce projet de thèse et ont aussi contribué aux réflexions autour de la réalisation de ce programme.

Le travail de cette thèse s'est focalisé sur la variabilité de la digestion de l'amidon et des parois végétales de l'ensilage de maïs dans les différents compartiments du tube digestif du ruminant et sur les conséquences associées au niveau de l'évaluation de sa valeur nutritive.

Dans une première approche bibliographique nous avons réalisé une synthèse des principaux facteurs de variations de la digestion de l'amidon et des parois végétales du maïs, à savoir le stade de maturité, la variété et le mode de conservation (maïs en vert ou ensilé) utilisé pour les mesures, ce dernier n'ayant été que très peu étudié jusqu'à présent. Cette bibliographie présente également les systèmes actuels de prévision de la valeur nutritive de l'ensilage de maïs en France et à l'international ainsi que leurs perspectives d'amélioration.

La seconde partie de cette thèse traite de l'approche expérimentale, et a pour objet 1) de préciser l'influence de la variété, du stade de maturité et du mode de conservation sur la digestion ruminale, intestinale et dans l'ensemble du tube digestif du maïs fourrage et de ses différentes fractions ; 2) d'analyser les conséquences de cette variabilité sur la prévision de la valeur énergétique et notamment sur la prévision de la digestibilité de la matière organique (dMO) ; 3) de proposer de nouveaux critères liés à la nature de cette MO digérée (essentiellement amidon et parois végétales) à partir de critères chimiques (teneur en amidon, NDF,...), morphologiques (pourcentage d'épis, matière sèche du grain ou des tiges et feuilles,...), agronomiques (nombre de jours de culture, somme de températures) et enzymatique (digestibilité enzymatique sur plante entière ou sur résidu pariétal).

Synthèse bibliographique

1. Évolution de l'amidon et des parois végétales au cours du cycle de développement du maïs et lors de la fermentation dans l'ensilage

Le maïs fourrage est une céréale fourragère composée de deux fractions :

- l'épi, qui contient l'amidon dans les grains,
- la canne (tiges et feuilles), qui renferme la majeure partie des constituants pariétaux (cellulose, hémicellulose, lignine ; ensemble ils composent la fraction appelée « parois végétales », cette fraction étant globalement quantifiée sous la forme de « NDF »)

Le stade de récolte de la plante de maïs et les processus de fermentation qui ont lieu lors de la conservation en ensilage, jouent un rôle non négligeable sur la proportion respective de grain et de canne, et donc sur la composition chimique de l'ensemble « amidon + parois végétales ». L'étude de l'influence de ces deux facteurs sur la morphologie et la composition chimique du maïs fourrage est donc indispensable avant d'analyser leur impact sur la digestion de l'ensilage de maïs par les ruminants.

1.1. Influence du stade de maturité sur la composition morphologique et chimique du maïs fourrage

1.1.1 La maturation de la plante de maïs au cours du cycle de végétation et son évaluation

Le cycle de croissance du maïs, qui traduit les différentes modifications morphologiques du maïs (Figure 1), se divise en trois phases (Carpentier et Cabon, 2011) :

-une phase végétative, allant de la germination à la différenciation de la panicule mâle. Au cours de cette phase, l'appareil végétatif (tige, feuilles et racines) va se mettre en place et servira à la captation du rayonnement solaire, de l'eau et des sels minéraux (Duburcq *et al.*, 1983). Cette phase de développement se termine lorsque 6 à 10 feuilles sont visibles à l'extérieur de la plante (Soltner, 2005).

-une phase générative, marquée par la croissance simultanée des appareils reproducteurs et végétatifs, se terminant à la fécondation. La floraison mâle, la floraison femelle et la pollinisation correspondent à trois stades physiologiques de l'appareil reproducteur très utilisés dans le suivi du développement de la plante de maïs.

-une phase reproductive allant de la fécondation jusqu'à la maturité du grain. Cette phase débute par le remplissage des grains qui correspond au transfert des produits issus de la

photosynthèse, de la partie végétative vers les grains de l'épi. Durant cette phase, la plante atteint sa taille maximale (généralement entre 1 et 3 mètres de hauteur) et la partie végétative et le grain atteignent leur poids maximal. Le poids final du grain est déterminé en fonction du stock de granules d'amidon. Cette phase de remplissage dépend étroitement des conditions pédoclimatiques : la disponibilité en eau régule le développement de la partie grain (Randjelovic *et al.*, 2011) tandis que la température et le rayonnement solaire régissent plutôt la croissance de la partie végétative (Kruse *et al.*, 2008). La maturation du grain correspond à la dernière phase du cycle et débute après la fin du remplissage du grain c'est-à-dire quand le grain a accumulé 90% de la matière sèche qu'il aura à maturité. (Goytino et Gay, 1991). La maturité physiologique des grains est atteinte lorsque ces derniers ont cessé d'accumuler de la matière sèche. Cette période de maturation du grain se fait au détriment de la tige et des feuilles qui vont entrer en sénescence. Pour éviter cela, de nouvelles variétés dites « Stay Green » apparaissent depuis quelques années sur le marché, et se caractérisent par la faculté de leur tige à rester longtemps verte afin que la partie grain accumule plus lentement la matière sèche (Arriola *et al.*, 2012).

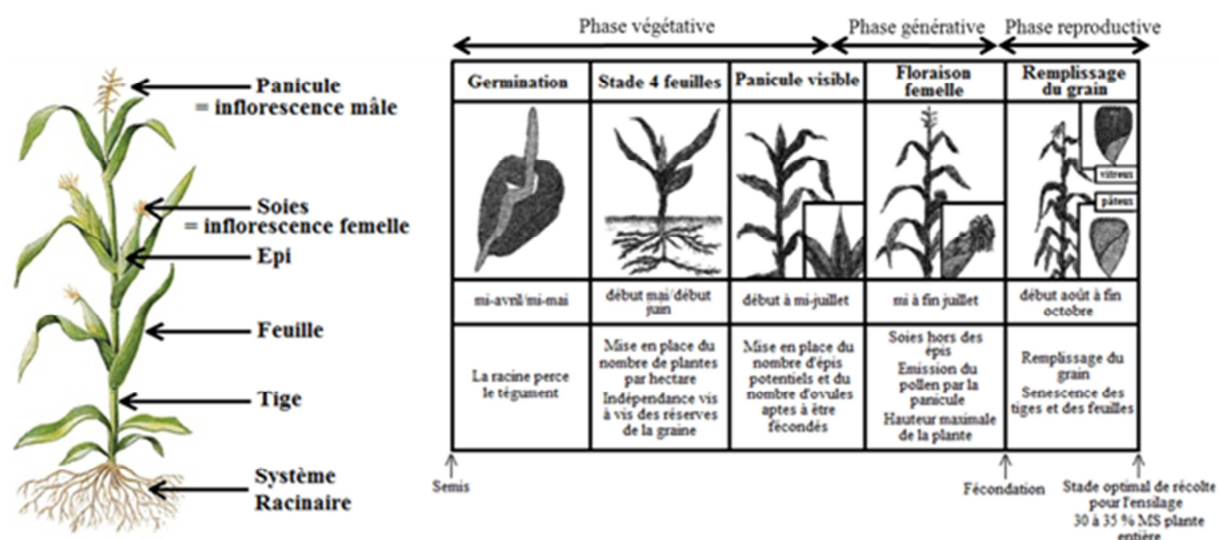


Figure 1 : Morphologie et cycle de développement du maïs (adapté de Soltner, 2005)

Dans la littérature, la maturité de la plante de maïs, est souvent exprimée selon la maturité du grain avec deux critères principaux :

-**l'aspect du grain après écrasement** qui permet de distinguer 4 stades : **le stade laiteux** (le grain est jaune mat et après écrasement, un liquide blanchâtre, constitué d'amidon et d'eau, s'écoule), **le stade pâteux** (le grain est jaune pâle, et après écrasement on obtient un produit pâteux d'où aucun liquide n'exsude), **le stade pâteux-dur** (le grain jaune clair et dur,

peut se rayer à l'ongle) et **le stade vitreux** (le grain jaune brillant et dur, ne se raye plus à l'ongle).

-**la position de la ligne de remplissage du grain** : elle correspond à l'accumulation de l'amidon dans le grain qui commence à la pointe du grain et progresse vers la base où se trouvent les tissus les plus humides. Cette évolution est visible de l'extérieur du grain à partir du stade pâteux et correspond à la ligne de remplissage que l'on peut suivre sur les grains (Gay, 1984). L'optimum pour la récolte se situe au stade pâteux dur (Carpentier et Cabon, 2011) (Figure 2).

						
Début remplissage Floraison +250 à 300 d/j • Grain encore rond • 5 feuilles et plus vertes sous l'épi	1 ^{er} lentilles vitreuses au sommet de quelques grains	Prévision possible de la date de récolte Lentille vitreuse bien visible au sommet de la majorité des grains	Début de récolte possible • 1/4 d'amidon vitreux • Quelques spathes desséchées	Période optimale de récolte • Floraison +600-650d/j • Les 3 amidons répartis en 3 tiers • Toutes les spathes sont desséchées • Idéal : plus de 2 feuilles vertes sous l'épi	Fin optimum Stade ensilage • Grain 50% vitreux • Laiteux à la pointe	Stade ultime de récolte • Grain 2/3 vitreux • Plus du tout de lait

Figure 2 : Détermination du stade de maturité de la plante de maïs d'après la position de la ligne de remplissage du grain (adapté de Soltner, 2005)

Ces différents critères concernant la maturation du grain ne sont que des repères indicatifs et visuels au champ. Leur détermination, souvent imprécise, ne permet pas un suivi quotidien et détaillé de la culture (Ledent, 1991). Aussi, il a été possible de mettre en relation l'aspect du grain et **le pourcentage de MS de la plante entière**, ce dernier étant l'un des critères les plus utilisés pour définir la maturité de la plante (Tableau 1).

Tableau 1 : Correspondance entre l'aspect du grain après écrasement et les teneurs en MS de la plante entière (adapté de Carpentier et Cabon, 2011)

Aspect du grain	Teneur en MS de la plante entière (%)
Laiteux	< 25
Pâteux	27-29
Pâteux dur	30-35
Vitreux dur	>40

Mise en place par Demarquilly (1969), cette relation a été rétablie à partir des nouvelles conditions climatiques et des changements dans les pratiques de récolte (Carpentier et Cabon, 2011). Le stade vitreux du grain, correspondant à un pourcentage de MS de la plante entière de 33 à 35% selon Demarquilly (1969), est aujourd'hui défini à partir de 40% de MS de la plante entière par Carpentier et Cabon (2011). La période optimale de récolte pour le maïs ensilage se caractérise désormais par un taux de MS de la plante entière entre 30 et 35 % c'est-à-dire quand le rendement du grain a atteint son maximum avant le dessèchement de la partie tige-feuille (Phipps *et al.*, 2000). Cet optimum est également à moduler en fonction d'une part du développement respectif des épis et des tiges, et d'autre part de l'état de l'appareil végétatif (tiges + feuilles). Le taux optimal de matière sèche de la plante pour la récolte sera alors plus faible (29-30%MS) si la proportion d'épis est faible et plus élevé (35%) si la proportion d'épis est élevée. Un appareil végétatif riche en eau réduit le taux de matière sèche alors qu'en cas de dessèchement, l'appareil végétatif peut apporter 1 à 3 points de MS supplémentaires.

Cependant, le pourcentage de MS de la plante entière ne permet pas à lui seul de définir avec précision le stade de récolte car le comportement de la plante de maïs dépend des conditions climatiques, de la variété et des techniques culturales. Le stade de récolte peut alors aussi être caractérisé par **le nombre de jours écoulés depuis le semis ou la floraison femelle** c'est-à-dire à la sortie des soies. Andrieu (1976) a d'ailleurs établi un lien étroit entre le nombre de jours écoulés depuis la floraison femelle et la teneur en MS de la plante entière ($r=0,98$, $N=74$). Une autre unité de mesure a été établie par Bloc et Gouet (1978) pour évaluer le stade de récolte : c'est **la somme des températures moyennes journalières depuis le semis ou depuis la date de floraison femelle (Φ , exprimée en degré jours):**

$$\Phi_i = \sum_i^{\text{date de recolte}} \left[\frac{\text{Max } T^\circ - \text{Min } T^\circ}{2} - T_0 \right]$$

Avec T_0 , la température seuil ou « zéro de végétation » (pour le maïs, T_0 est fixé à 6°C) et i , la date de semis ou de floraison femelle

Ce critère qui prend en compte la température, déterminante dans la croissance et le développement de la plante, est précis et est fortement relié à la teneur en MS de la plante entière ($r=0,94$) mais aussi à celle du grain ($r=0.96$) et de l'épi ($r=0.96$) (Bloc *et al.*, 1984). Ce critère permet également de définir la précocité d'un hybride (Carpentier et Cabon, 2011). Un hybride précoce a besoin d'une somme de température de 80 degrés jours de moins pour arriver à même maturité qu'un hybride de référence adapté à des conditions climatiques

locales précises. Les variétés précoces sont en général utilisées dans les régions froides où les températures et la lumière ne sont pas idéales pour la croissance du maïs. Les variétés tardives, qui ont besoin de 80 degrés jours supplémentaires pour arriver à maturité par rapport à un hybride de référence, sont utilisées dans des régions où l'ensoleillement et les températures estivales sont élevés.

D'autres facteurs comme le déficit hydrique (O'Neill *et al.*, 2004 ; Msughter Adamgbe et Ujoh, 2013), le gel (Meisser, 2000), la densité de semis (Soltner, 2005), le type de sol (Oberle et Keeney, 1990), la fertilisation azotée (Islam *et al.*, 2012) ou la latitude déterminant la longueur de la photopériode (Sacks *et al.*, 2010 ; Mussadiq *et al.*, 2012); influencent également la croissance des tiges et des épis ainsi que le remplissage des grains.

1.1.2 Modifications de la morphologie de la plante de maïs avec le stade de maturité

Au cours de la phase reproductive (remplissage + maturation), la teneur en MS des différentes fractions morphologiques de la plante de maïs (fraction tiges-feuilles et fraction épis contenant les grains) vont évoluer significativement jusqu'au stade pâteux (Flachowsky *et al.*, 1993). En raison de la formation et du remplissage des grains, la proportion d'épis (grains + reste de l'épi) dans la plante entière augmente significativement de 42 à 58% MS entre le stade laiteux et pâteux (Demarquilly, 1994) (Figure 3). Inversement proportionnelle à la proportion d'épis, la proportion de la fraction tige et feuilles dans la plante entière diminue entre le stade laiteux et pâteux. Après le stade pâteux, la répartition de la MS est plutôt stable et les grains formés au stade vitreux dur constituent à eux seuls 50% de la MS de la plante entière. La teneur en MS de la plante entière augmente donc avec le stade de maturité et est étroitement liée à l'évolution de la composition morphologique, notamment à l'accroissement de la part des épis dans la plante entière (Meisser, 2000).

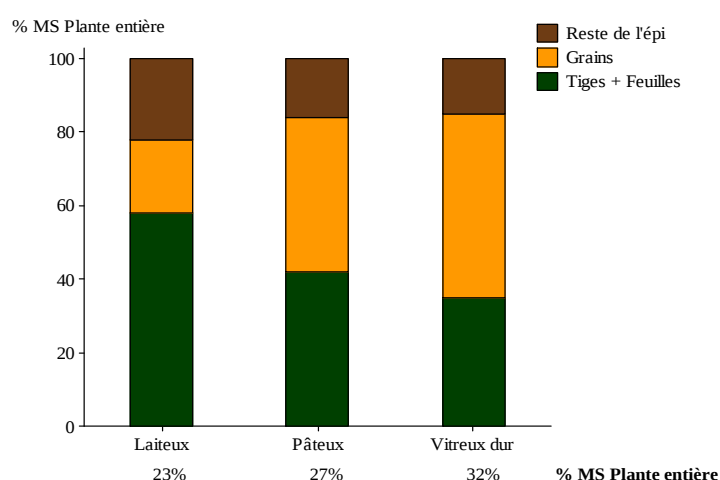


Figure 3 : Influence du stade de maturité sur la composition morphologique du maïs en vert (adapté de Demarquilly, 1994 ; N=20)

1.1.3 Les constituants chimiques de la plante entière et des fractions « épi et canne » : évolution en fonction du stade de maturité

Au cours du développement du maïs, la composition chimique de la plante entière et de ses fractions (épis et tige-feuilles) évolue en conséquence des modifications morphologiques décrites précédemment. Pour illustrer ces évolutions de composition chimique, la base de données INRA ayant servi à l'élaboration des valeurs Tables INRA (France) et à leur révision en 2007 a été utilisée. Les données de cette base qui regroupe 254 échantillons de maïs fourrage (maïs vert), dont l'essentiel a été publié par Andrieu *et al.* (1993), ont été comparées aux relations publiées récemment par Khan *et al.* (2014) à partir de 96 données sur l'ensilage de maïs issues de la littérature. Les relations établies ci-dessous à partir de Khan *et al.* (2014) et de la base de données INRA ont été étudiées en intégrant un effet essai.

1.1.3.1 L'amidon

L'amidon, composé d'amylose et d'amylopectine (deux polymères de glucose), est essentiellement concentré dans la partie grain de l'épi et plus précisément dans l'endosperme. La plante entière de maïs contient en moyenne $24,2\% \pm 7,77$ (INRA, 2007) et $33,3\% \pm 6,63$ d'amidon (Khan *et al.*, 2014) mais cette proportion augmente fortement avec la maturité de la plante : +15 pts entre 25 et 40% de MS de la plante entière (INRA, 2007) et +24 pts entre 23 et 40% de MS de la plante entière (Khan *et al.*, 2014). Cette augmentation de la teneur en amidon dans la plante entière résulte de la croissance des épis et de la transformation des glucides solubles en amidon dans les grains au cours de la phase de remplissage (Allen, 2009). Comme Khan *et al.* (2014), l'analyse de la base de données INRA (2007) montre que la corrélation entre la teneur en MS de la plante entière et la teneur en amidon est positive (Figures 4 et 5).

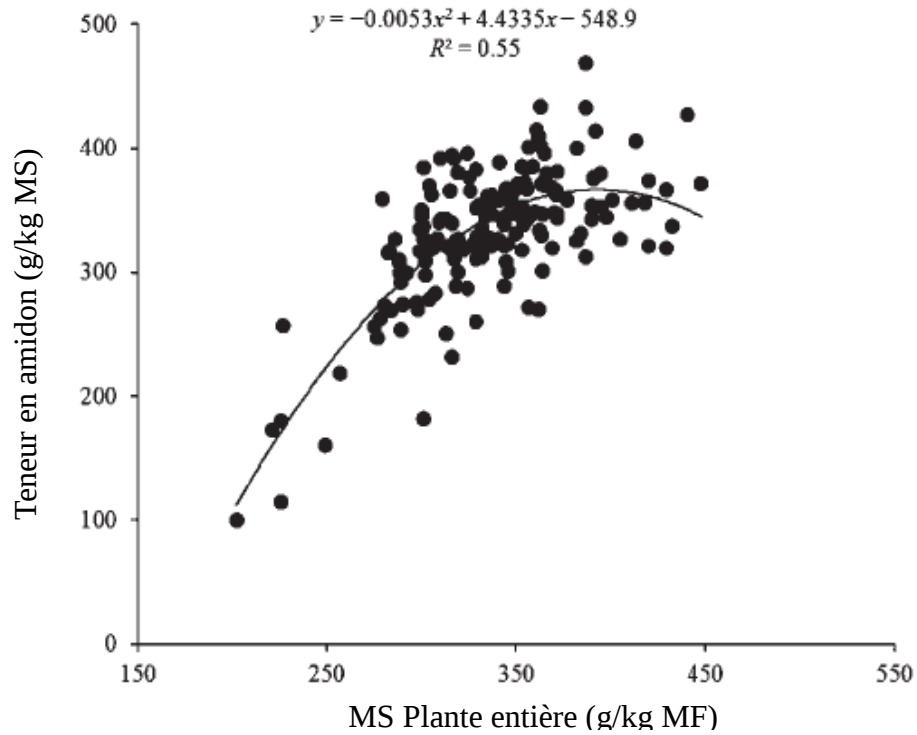


Figure 4 : Relation apparente entre la teneur en amidon et la teneur en MS de l'ensilage de maïs plante entière (Khan et al., 2014)

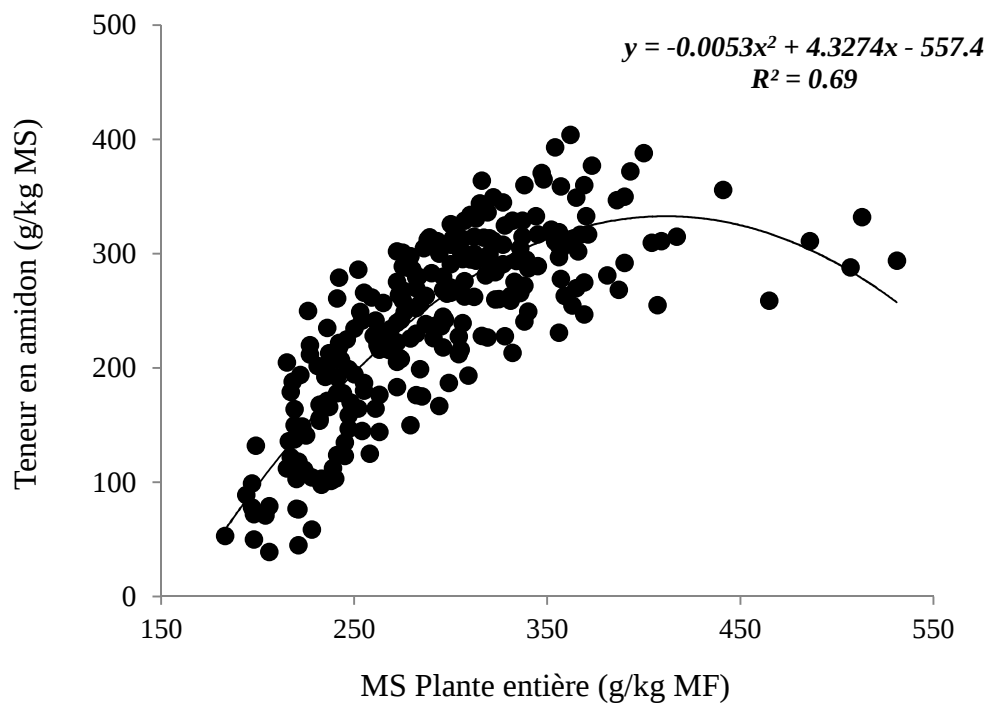


Figure 5 : Relation apparente entre la teneur en amidon et la teneur en MS de la plante entière de maïs en vert (INRA, 2007)

1.1.3.2 Les constituants pariétaux ou parois végétales (NDF)

Les parois des cellules végétales de la plante de maïs (NDF) sont des structures hétérogènes composées principalement de glucides structuraux (cellulose et hémicellulose) de protéines et de composés phénoliques (lignines et acides phénoliques). Les liaisons entre la cellulose et la lignine constituent la nature du maillage des constituants pariétaux. Les méthodes de dosage utilisées pour estimer la teneur en constituants pariétaux des plantes (NDF, CB, ADF, ADL, Annexe 1) ont leurs limites (variabilité des données suite à différentes méthodologie de mesures, Khan *et al.*, 2014), mais elles restent tout de même couramment employées dans la mesure où les biais sont connus et comparables au sein d'une même espèce végétale.

Les parois végétales sont essentiellement localisées dans la partie non-grain mais leur proportion est très variable d'une étude à l'autre. Au stade ensilage (~32% MS plante entière), les tiges et les feuilles contiennent respectivement 72% et 70% de NDF d'après Daccord *et al.* (1996). Plus récemment, Masoero *et al.* (2006) montrent des proportions plus faibles: 62% de NDF pour les tiges et 59% de NDF pour les feuilles. Selon Marvin *et al.* (1995), des variations considérables de la teneur en parois végétales existent dans la partie non-grain. Le grain contient seulement 8% du NDF (Coors *et al.*, 1997) et selon les tables INRA-AFZ (2002) de la valeur des aliments concentrés (2634 données), le grain de maïs contient 12% de NDF. Avec la maturité et notamment au moment du remplissage du grain, la proportion de NDF dans l'ensemble tige-feuilles augmente et la composition des parois végétales change. Afin de conserver une structure rigide au cours de sa croissance, la tige s'enrichit en cellulose et en lignine au détriment de la teneur en hémicellulose (Jarrige *et al.*, 1995 ; Coors *et al.*, 1997 ; Masoero *et al.*, 2006).

Les teneurs moyennes en NDF, ADF et ADL de la plante entière de maïs sont respectivement de 47,1%, 22,9%, 2,5% MS (INRA, 2007) et de 39,9%, 22,0%, 1,8% MS (Khan *et al.*, 2014). La proportion de NDF, inversement reliée à la teneur en amidon ($R^2=0,60$, INRA, 2007 ; $R^2=0,67$, Khan *et al.*, 2014) diminue fortement avec la maturité (Figure 6) : -4 points entre 25 et 40% de MS plante entière (INRA, 2007) et -17 points entre 23 et 39% de MS plante entière (Khan *et al.*, 2014). Cette diminution s'explique notamment par l'augmentation plus rapide de la proportion de grains dans la plante entière parallèlement à l'augmentation de la teneur en NDF dans les tiges (Bal, 2006). D'après Sutton *et al.* (2000), cette baisse de la teneur en NDF dans la plante entière aurait lieu plutôt au début de la phase de remplissage du grain.

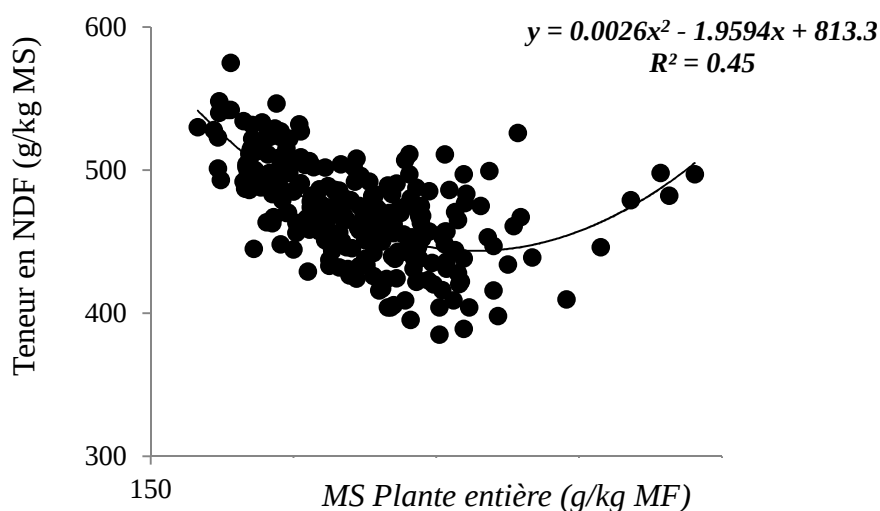


Figure 6 : Évolution de la teneur en NDF avec la maturité pour le maïs en vert (INRA, 2007)

La teneur en ADF dans la fraction NDF de la plante entière diminue (Figure 7) avec la maturité (-3 points entre 25 et 40% de MS plante entière, INRA 2007 ; -8 points entre 23 et 39% de MS plante entière; Khan *et al.*, 2014) tandis la teneur en ADL reste relativement stable (Figure 8).

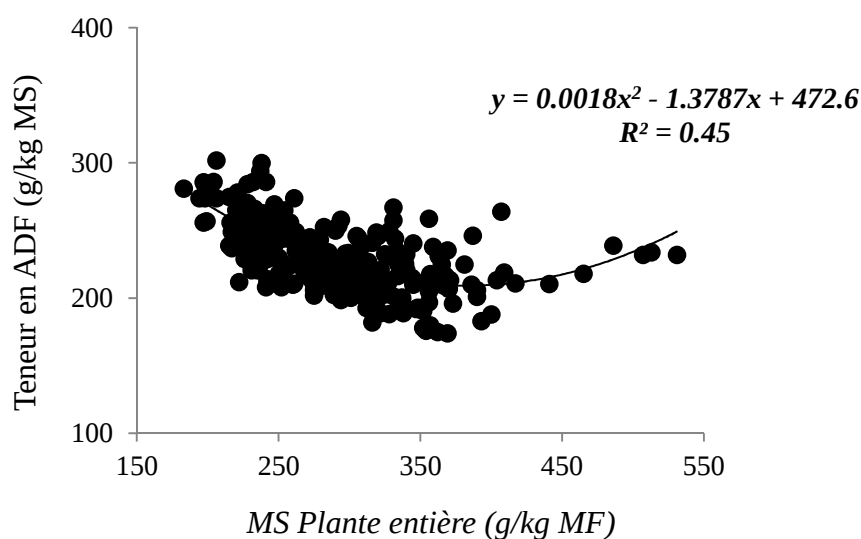


Figure 7 : Évolution de la teneur en ADF avec la maturité pour le maïs en vert (INRA, 2007)

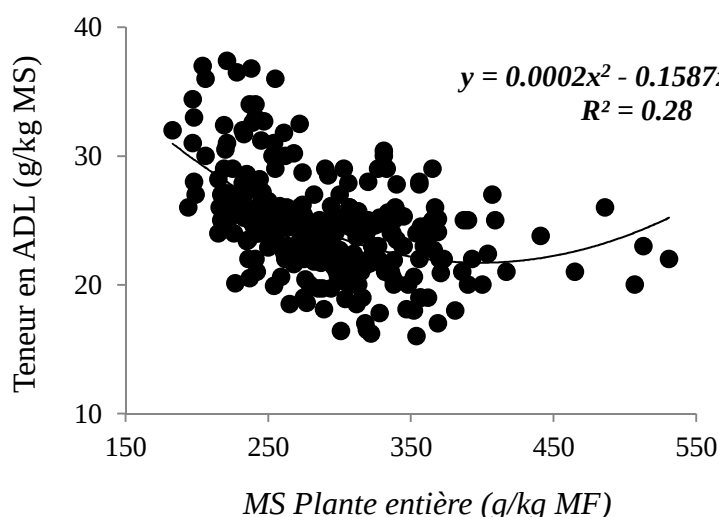


Figure 8 : Évolution de la teneur en ADL avec la maturité pour le maïs en vert (INRA, 2007)

1.1.3.3 Autres constituants de la plante entière

Les matières azotées totales (MAT), présentes surtout dans les limbes et les feuilles, représentent une faible part de la MS de la plante entière. La teneur en MAT décroît légèrement après la floraison femelle pour se stabiliser ensuite à partir du stade laiteux du grain. Cette diminution résulte de la synthèse rapide d'amidon au détriment de l'azote du grain.

La plante entière de maïs contient peu de MAT (en moyenne $7,5\% \pm 1,0$ dans INRA, 2007 et $7,4\% \pm 1,0$ dans Khan *et al.*, 2014). La teneur en MAT varie légèrement avec la maturité de 7,2 à 7,1 % MS entre 25% et 40% de MS de la plante entière (INRA, 2007) et de 8,7 à 7,2% MS entre 23 et 39%MS de la plante entière (Khan *et al.*, 2014). Michalet-Doreau *et al.* (2004) dans leur synthèse font le même constat à partir de 13 310 données sur le maïs en vert : la teneur en MAT est faible ($7,7\% \pm 0,7$) et varie légèrement de 7,8 à 7,6% MS entre 28,5 et 40% de MS. La teneur en MAT des organes de la plante (tiges, grains, spathes et rafles) évolue peu avec la maturité. Seule la teneur en azote des feuilles diminue sensiblement de 13,5% à 8,5% entre le stade laiteux correspondant à 128 jours après le semis et le stade vitreux correspondant à 168 jours après le semis (Aerts *et al.*, 1976). La contribution du grain à la fraction azotée totale augmente par contre à l'approche du stade vitreux du fait de l'augmentation de la part du grain mais également de la faible teneur en MAT des fractions végétatives. La MAT du grain représente alors 65 % de la MAT de la plante entière à un stade de maturité de 35% de MS de la plante entière (Kuehn *et al.*, 1999).

La teneur en glucides solubles, qui constitue avec l'amidon la partie glucides cytoplasmiques, diminue de 20% à 5% entre 20% et 40% de MS de la plante entière de maïs en vert (INRA, 2007). Cette diminution s'explique notamment par l'augmentation concomitante de la teneur en amidon du maïs avec l'avancement de la maturité (corrélation négative, $R^2=0,77$; Figure 9). Cette relation est seulement valable pour la plante verte puisque dans l'ensilage les glucides solubles sont quasiment fermentés de façon totale.

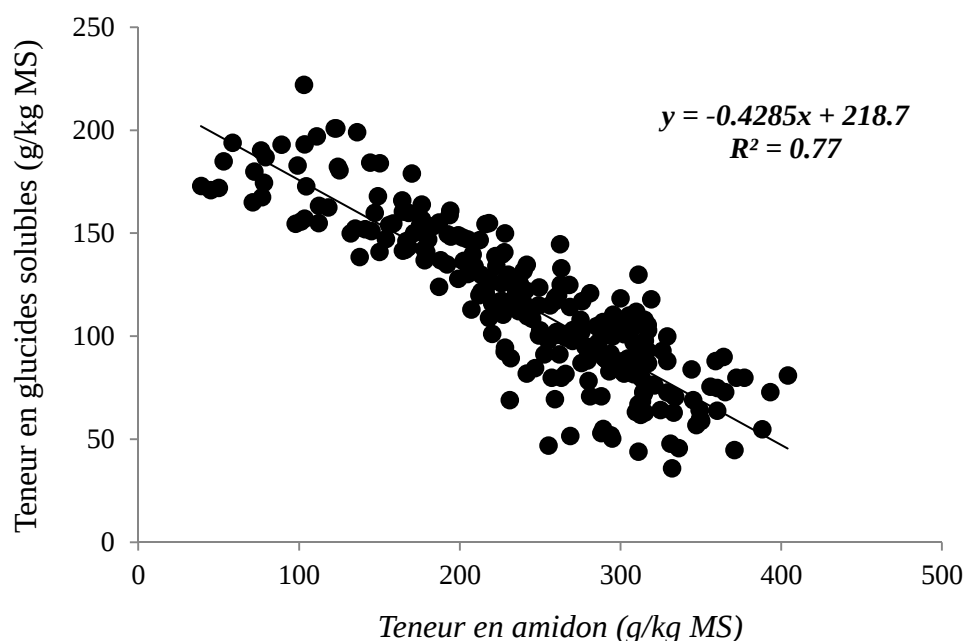


Figure 9: Évolution de la teneur en glucides solubles avec la maturité pour le maïs en vert (INRA, 2007)

Les lipides, présents surtout dans les grains sous la forme de triglycérides, ne représentent que 2,7 à 4,1% de MS de la plante entière (Khan *et al.*, 2012). Leur accumulation est progressive et devient maximale 200 jours après le semis (Schittenhelm, 2008).

Enfin, la teneur en matières minérales (cendres) est elle aussi relativement faible. Elle représente de 5 à 7% de la plante entière (Demarquilly, 1994), 2% de l'épi et 6% de la tige (Demarquilly, 1969) et est relativement constante avec l'avancement du stade de maturité (Schittenhelm, 2008). La valeur énergétique élevée de l'ensilage de maïs s'explique d'ailleurs par sa teneur en énergie brute élevée du fait d'une teneur en matière organique de l'ordre de 95%. Du fait de sa faible teneur en minéraux, il est nécessaire d'apporter, dans les régimes à base d'ensilage de maïs, plus de compléments minéraux qu'avec des régimes à base d'ensilage d'herbe.

1.2 Influence de la fermentation dans l'ensilage sur la composition chimique du maïs fourrage

Parmi les modes de conservation des fourrages, l'ensilage en coupe directe sans préfanage est la forme de conservation qui permet le mieux de valoriser la plante entière en maintenant sa valeur énergétique initiale sur une période de plusieurs mois (Baumont *et al.*, 2011). Après avoir rappelé rapidement les processus de fermentation qui permettent d'obtenir un ensilage de maïs (ou maïs fermenté), l'influence de la conservation en ensilage sur les constituants chimiques du maïs sera analysée à partir de deux bases de données : ARVALIM® (propriété d'ARVALIS Institut du Végétal) qui regroupe 238 échantillons de maïs fourrage (de 2001 à 2012) et une autre base de données INRA qui contient 125 échantillons (de 1984 à 2003). Ces deux bases de données ont été élaborées à partir d'expérimentations *in situ* visant à analyser la dégradabilité ruminale du maïs fourrage en fonction de la variété, du stade de maturité et du type de conditionnement (broyage, séchage, etc..) de l'échantillon.

1.2.1 Les processus de fermentation

L'ensilage est une méthode qui permet une conservation de la plante entière de maïs sous forme humide. Ce procédé se caractérise par deux phases principales qui diffèrent dans leur durée et leur intensité (Weinberg et Muck, 1996 ; Pahlow *et al.*, 2003). La phase aérobie initiale consiste en l'utilisation de l'air emprisonné entre les particules du fourrage de maïs permettant l'activité des microbes et des enzymes aérobies pendant quelques heures jusqu'à l'anaérobie complète. Dans ce milieu en anaérobie, débute alors la deuxième phase avec la mort des cellules végétales et la libération par plasmolyse de leur contenu cellulaire. Les glucides solubles relâchés par la cellule sont alors utilisés par la flore bactérienne anaérobie. La quasi-totalité de ces molécules disparaît et permet la production d'acide lactique, d'acides gras volatils (AGV) et d'alcools (totalement digestibles) : c'est la fermentation lactique qui dure de 1 à 2 semaines.

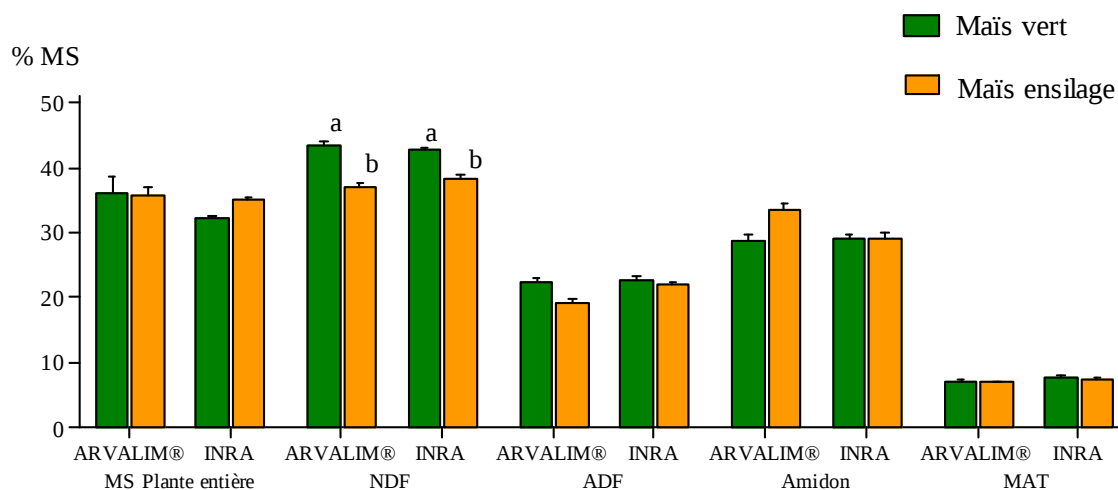
Cette fermentation entraîne une chute importante et rapide du pH ($\leq 4,0$) qui engendre une sélection des bactéries lactiques (plus résistantes aux faibles pH) et de ce fait inhibe les fermentations butyriques néfastes (Demarquilly, 1994). Un fourrage ensilé est alors considéré comme stabilisé après 6 semaines de conservation en milieu anaérobie (Pahlow *et al.*, 2003).

La bonne qualité de conservation de l'ensilage de maïs est tributaire de plusieurs conditions de réussite auxquelles il faut veiller à respecter au moment de la récolte et de l'entreposage du silo (Savoie et Jofriet, 2003, Annexe 2). De par sa teneur élevée en MS, sa

teneur en glucides solubles non limitante et surtout son pouvoir tampon faible, le maïs se conserve très bien sous forme d'ensilage à condition d'être haché finement (Demarquilly, 1994).

1.2.2 Évolution des constituants chimiques de la plante entière au cours de la fermentation

Peu d'études sont disponibles à propos de l'évolution de la composition chimique avec la fermentation. Aussi, nous avons utilisé les comparaisons entre maïs en vert et maïs fermentés disponibles dans les deux bases de données ARVALIM® et INRA (Annexe 3). Pour cela, nous avons extrait seulement les données qui concernent des comparaisons entre des maïs fermentés et leur correspondant en vert (N= 15 pour la base de données INRA et N=59 pour ARVALIM®). Les différences entre la moyenne du maïs ensilage et celle du maïs en vert pour chaque constituant (MS, NDF, ADF, Amidon, MAT) ont été analysées avec la procédure MIXED de SAS (version 9.3, 2002). La MS de la plante entière ne diffère pas entre le maïs en vert et l'ensilage de maïs dans la base de données ARVALIM ® (P=0,93) et dans la base INRA (P=0,10) (Figure 10).



Les lettres a et b représentent des différences significatives entre les moyennes de chaque barre

Figure 10 : Évolution des constituants chimiques de la plante entière (moyenne $\pm$ erreur type) avec la fermentation dans l'ensilage (Bases de données ARVALIM®, N=59 et INRA, N=15)

Du fait du phénomène d'hydrolyse des hémicelluloses dans les constituants pariétaux, la teneur en NDF des maïs diminue ($P < 0,01$) avec la fermentation dans l'ensilage (-6 pts pour ARVALIM® et -4 pts pour INRA) et la teneur en amidon a tendance ($P = 0,08$) à augmenter par effet de dilution (+5 points pour ARVALIM® ; pas d'effet significatif dans la base INRA, $P = 0,92$). Grâce à la diminution rapide du pH (en dessous de 4) pendant la fermentation, les enzymes protéolytiques de la plante de maïs, actives à pH optimal entre 5,5 et 6,0, ne dégradent qu'une faible proportion des protéines (Demarquilly, 1994), ce qui peut expliquer l'équivalence des teneurs en MAT entre les maïs en vert et l'ensilage de maïs (Figure 10, $P = 0,99$ pour ARVALIM® et $P = 0,24$ pour la base INRA). Dans leur synthèse, Michalet-Doreau *et al.* (2004), montrent une légère augmentation de la teneur en MAT notamment parce que les pertes de MAT lors du processus d'ensilage (jus, gaz) ou du séchage à l'étuve (produits volatils) sont plus faibles que celles du reste de la matière sèche. Cette légère augmentation concerne essentiellement la fraction tiges-feuilles (Russel, 1986). Le processus d'ensilage induit surtout d'importantes modifications au niveau de la composition de la fraction azotée. La teneur en azote soluble (en % de l'azote total), augmente en moyenne de 26 à 47% avec l'ensilage et cette augmentation est d'autant plus importante que la MS de l'ensilage est faible (Andrieu et Demarquilly, 1974a).

Récemment, certains auteurs se sont intéressés à l'évolution des constituants chimiques en fonction de la durée de conservation de l'ensilage. En effet, bien que pour Pahlow *et al.* (2003) l'ensilage est considéré comme stable au bout de 6 semaines, certaines études (Hermann *et al.*, 2011 ; Der Bedrosian *et al.*, 2012) montrent que plus la durée de conservation sous forme d'ensilage est longue, plus la perte en MS (sous forme de gaz, de jus ou de moisissures) est importante. Parallèlement, une conversion de l'acide lactique en acide acétique est observée à partir du 3^{ième} mois de conservation, améliorant au passage la stabilité aérobie de l'ensilage (Weinberg et Chen, 2013) puisque l'acide acétique inhibe les levures et les moisissures (Moon, 1983). Aucune étude récente n'est cependant disponible à propos de l'évolution des teneurs en amidon et en parois végétales après une période de conservation de l'ensilage prolongée.

1.3 Influence de la variété sur la composition chimique du maïs fourrage

En France, l'augmentation du nombre de variétés inscrites au catalogue français (de 59 inscriptions en 1986 à 154 en 2007) traduit une plus grande diversité des variétés de maïs disponibles et s'explique notamment par la spécialisation des usages du maïs en tant que

fourrage ou en tant que grain (Cadot et Le Clerc, 2010). Néanmoins, depuis 2009, le nombre de variétés inscrites au catalogue français a diminué de 16% en raison notamment de l'ouverture du catalogue aux pays de l'Est et du refus des organismes génétiquement modifiés (OGM). Le critère de classement des variétés dans le catalogue français est la précocité, qui exprime le temps nécessaire à la plante pour accomplir totalement son cycle. Selon la durée plus ou moins importante de la période favorable au développement du maïs (humidité et température), une variété plus ou moins précoce sera choisie. Selon Barrière et Emile (2000b), les variétés proposées à la commercialisation depuis la fin des années 90, ont une floraison de plus en plus tardive favorisant la mise en place et le développement d'un appareil végétatif et photosynthétique, et ont une meilleure précocité de maturité du grain (remplissage plus rapide du grain). Avec le réchauffement climatique observé au cours des 30 dernières années, l'utilisation de variétés tardives a également augmenté (Lorgeou et Souverain ; 2003).

Mais depuis 1999, les inscriptions au catalogue français prennent aussi en compte la valeur énergétique en observant la qualité du grain (teneur en amidon) et la qualité des tiges et feuilles déterminée selon leur digestibilité (Barrière et Emile, 2000a). Les variétés de maïs sont alors généralement regroupées en deux familles d'après la texture de leur grain (Kotarski, 1992 ; Philippeau et Michalet-Doreau, 1997) : celles à **grains cornés** composés d'un endosperme vitreux épais où les granules d'amidon sont encapsulés d'une matrice protéique, et celles à **grains dentés** contenant majoritairement un albumen farineux où les granules d'amidon sont faiblement liés par une mince matrice protéique (Figure 11).

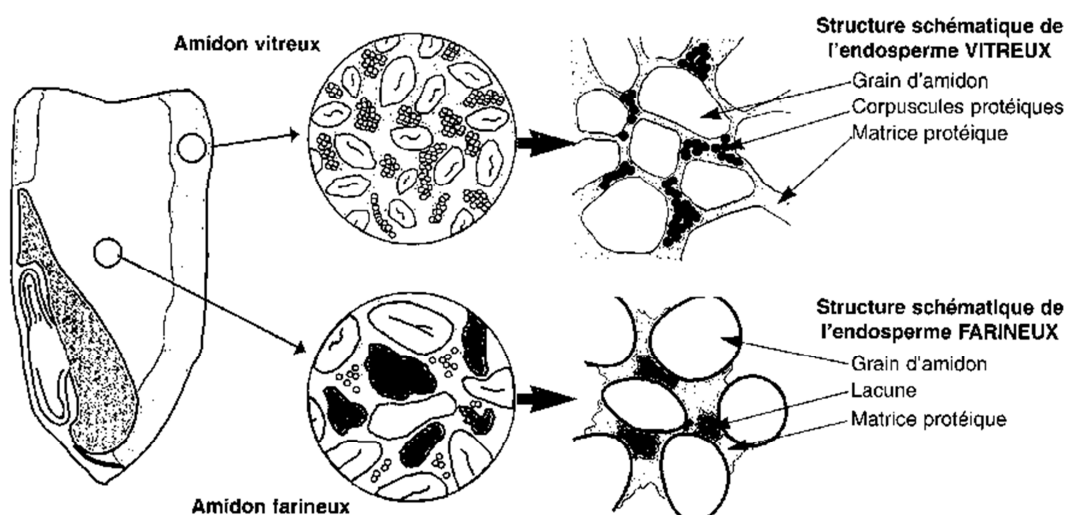


Figure 11 : Structure de l'amidon farineux (grains dentés) et vitreux (grains cornés) et caractéristiques de leur endosperme (Soltner, 2005)

Des hybrides à **grains cornés-dentés** qui sont une combinaison génétique des deux types précédents, sont composés de 50% d'albumen vitreux et 50% d'albumen farineux. Étant donné la variabilité importante entre les pôles corné et denté, les variétés sont alors notées « corné à corné-denté » ou « corné-denté à denté ». Pour la production de maïs fourrage, ces trois types de variétés sont utilisés mais des spécialisations se distinguent tout de même entre ces variétés. Le caractère denté correspond à des variétés à floraison relativement tardive (à cycle long) qui sont adaptées au climat chaud et sec du Sud-Ouest de la France et sont donc riches en amidon. Le caractère corné, lui, apporte la possibilité de cultiver du maïs dans des zones moins favorables thermiquement (comme au Nord-Ouest de la France). Du fait de leur précocité de floraison et de leur plus forte tolérance au froid, ces variétés sont caractérisées par des teneurs en amidon plus faibles (Khan *et al.*, 2014). Enfin, les variétés de type « corné-denté » permettent de combiner précocité de floraison et teneur en amidon intermédiaire. Les variétés se distinguent donc aussi par la qualité de leur tiges et feuilles c'est-à-dire par leur résistance à la verse et par leur digestibilité de la fraction tiges-feuilles exprimée par le critère DINAG (Argilier et Barrière, 1996). Enfin, selon Michalet-Doreau *et al.* (2004), la teneur en MAT des maïs varie aussi selon le type de variété mais ces variations ne sont que partiellement dues aux effets de la sélection sur le rendement et ne semblent pas liées aux autres composantes de la plante entière comme la teneur en grain.

Grâce à une segmentation de la gamme des variétés de maïs (variétés à haute valeur énergétique avec teneur en amidon élevée et forte digestibilité des tiges-feuilles, variétés avec un équilibre de la digestibilité des tiges-feuilles et de la richesse en amidon, variétés pauvres en amidon mais avec une forte digestibilité des tiges-feuilles), l'éleveur peut, selon le profil de son système, (maïs fourrage et céréales, maïs fourrage et luzerne, maïs fourrage et aliment complet, etc.), choisir l'option qui lui convient le mieux.

Si nous résumons cette première partie, trois facteurs de variation influencent la composition morphologique et chimique de la plante de maïs distribuée à l'animal sous forme d'ensilage : le stade de maturité à la récolte, le processus de fermentation au cours de la conservation en ensilage, et le type de variété utilisé.

La composition morphologique de la plante de maïs évolue jusqu'au stade pâteux du grain. La fraction épi (notamment la fraction grain dans l'épi) augmente significativement jusqu'au stade pâteux en raison du remplissage des grains et cela, au détriment de la fraction tiges-feuilles qui diminue par effet de dilution dans la MS de la plante entière. Ces modifications morphologiques, avec l'avancement de la maturité se

traduisent du point de vue de la composition chimique, par une forte augmentation de la teneur en amidon jusqu'au début du stade vitreux dur diminuant, par effet de dilution, la teneur en NDF et dans une moindre mesure, la teneur en MAT et la teneur en glucides solubles.

Avec la fermentation dans l'ensilage, les glucides solubles diminuent puisqu'ils sont quasiment totalement dégradés pour la production d'acide lactique, d'AGV et d'alcool à l'origine de l'acidification dans l'ensilage. Cette acidification ($\text{pH} < 4.0$) inactive les enzymes protéolytiques qui ne dégradent alors qu'une faible partie des protéines (d'où la stabilité de la teneur en MAT avec la fermentation). La teneur en NDF diminue avec la fermentation en raison de l'hydrolyse partielle des hémicelluloses et induit, par effet de dilution, l'augmentation de la teneur en amidon.

Le choix de la variété peut aussi modifier la morphologie et la composition chimique du maïs. Selon le type de grain (corné, corné-denté, denté) et la qualité des tiges et des feuilles (DINAG plus ou moins élevé) de la variété, l'éleveur peut moduler la teneur en amidon et la digestibilité de la partie tiges-feuilles.

Toutefois, ne serait-il pas possible d'améliorer la précision en étudiant l'influence de ces trois facteurs de variation sur la partition de la digestion de l'amidon et des parois végétales dans les différents compartiments du tube digestif des ruminants (rumen et intestin) ? Avant cela, revenons sur les mécanismes généraux de la digestion de l'amidon et du NDF et les méthodes de mesures utilisées pour mesurer le niveau et la vitesse de cette digestion.

2. Devenir de l'amidon et des parois végétales du maïs au cours de la digestion chez les ruminants

L'ensilage de maïs constitue un aliment riche en énergie ($\sim 0,80$ UFV/kg MS ou $0,90$ UFL/kg MS), mais pauvre en protéines et en minéraux. En effet, dans les rations des vaches laitières, il représente 50 à 80% de l'apport énergétique, mais n'apporte qu'entre 25 et 60 % des protéines nécessaires à la couverture des besoins de l'animal (Cabon et Carpentier, 2012). Étant donné que cette source d'énergie est apportée essentiellement par les glucides (amidon et parois végétales), nous nous intéresserons uniquement à la digestion de ces deux fractions. Avant cela, il est nécessaire de rappeler quelles sont les méthodes de référence employées pour mesurer la digestion des fourrages riches en amidon comme l'ensilage de maïs.

2.1. Méthodes de mesures pour caractériser la digestion de l'amidon et des constituants pariétaux

2.1.1 Mesure de la digestibilité dans l'ensemble du tractus digestif

La mesure de référence pour connaître la digestibilité d'un aliment dans l'ensemble du tractus digestif est la méthode *in vivo* réalisée chez le mouton. Cette méthode consiste à mesurer la proportion d'un constituant X (MS, MO, Amidon, NDF, etc..) disparue entre l'aliment et les fèces. La digestibilité d_x , appelée digestibilité apparente, est donc obtenue par le calcul suivant (Demarquilly *et al.*, 1995) :

$$d_x = \frac{(I \times X_i) - (F \times X_f)}{(I \times X_i)}$$

Avec I, la quantité de matière sèche ingérée ; F, la quantité de matière sèche excrétée dans les fèces ; X_i , la teneur en constituant X dans la matière ingérée et X_f , la teneur en constituant X dans la matière excrétée dans les fèces

La digestibilité apparente prend en compte, dans les fèces, la fraction d'origine alimentaire et la fraction endogène liée au renouvellement cellulaire et à la croissance microbienne. Pour obtenir la digestibilité réelle, il est nécessaire de retrancher cette fraction endogène des fèces. En l'absence de marqueur spécifique, cela est difficilement réalisable lorsqu'on mesure une digestibilité de la matière organique ou de l'azote. En revanche, lorsqu'on mesure la digestibilité des parois végétales, on peut supposer que l'on s'approche d'une digestibilité réelle, le résidu NDF fécal étant débarrassé des substances endogènes (Demarquilly *et al.*, 1995).

Dans la plupart des pays, les mesures de digestibilité sont réalisées sur des moutons (pour des raisons pratiques et économiques, Demarquilly *et al.*, 1995). Les résultats obtenus sont directement transposés aux bovins (Chenost et Martin-Rosset, 1985 ; Soto-Navarro *et al.*, 2014), qui sont les principaux utilisateurs de l'ensilage de maïs. Demarquilly *et al.* (1995) rappellent les règles et précautions nécessaires à une mesure fiable et répétable, en termes de nombres d'animaux, de durée des périodes d'adaptation et de mesure, etc.

Les mesures de digestibilité *in vivo* sur moutons ont fait l'objet de nombreuses études jusqu'à la fin des années 1990 (cf. Andrieu *et al.*, 1993 ; Barrière *et al.*, 2004). Depuis le début des années 2000, les mesures *in vitro* et *in situ* (voir ci-dessous) ont remplacé les

mesures *in vivo*, jugées trop laborieuses et coûteuses (Huhtanen *et al.*, 2008 ; Opsi *et al.*, 2013). Mais ces techniques *in vitro* (digestibilité *in vitro* dans le jus de rumen d'après Tilley et Terry, 1963 et digestibilité *in vitro* à partir de la mesure de la production de gaz d'après Menke *et al.*, 1988) simulent de façon imparfaite la digestion réelle observée *in vivo* chez l'animal (Damiran *et al.*, 2008). Les mesures de digestibilité enzymatique *in vitro* (Aufrère *et al.*, 1992) ou la spectrophotométrie dans le proche infrarouge (SPIR) sont également beaucoup utilisées pour prévoir la digestibilité *in vivo* (cf. partie 3).

2.1.2. Mesure de la digestion dans les différents compartiments digestifs

2.1.2.1 Méthode *in situ* ou *in sacco* pour la mesure de la dégradation dans rumen

Pour mesurer précisément la dégradabilité des aliments dans le rumen, la méthode des sachets de nylon (dégradation *in situ* ou *in sacco*) a été développée chez la vache (Van Keuren et Heinemann, 1962 ; Demarquilly et Chenost, 1969). Cette technique consiste à introduire des sachets en nylon, qui contiennent le fourrage étudié, dans le rumen de l'animal *via* une canule. Les sachets sont retirés du rumen après différents temps d'incubation afin d'obtenir une cinétique de dégradation. À partir de cette cinétique, il est alors possible de calculer une dégradabilité théorique (DT) qui représente la faculté d'un constituant (MS, amidon, parois végétales, etc..) à être dégradé pendant son séjour dans le rumen lorsque l'activité microbienne n'est pas limitante. Pour un constituant donné, la DT dépend donc du taux de dégradation par les microorganismes du rumen (en heure⁻¹) mesurée *in sacco*, et d'un taux de passage kp (en heure⁻¹), fixé a priori, qui représente le taux de transit des particules hors du rumen.

Deux méthodes sont disponibles pour calculer la DT :

- la méthode pas à pas prenant en compte la vitesse de dégradation (considérée comme constante entre 2 temps de mesure successifs) et le taux de transit des particules hors du rumen (Kristensen *et al.*, 1982). Ce taux de transit des particules hors du rumen est souvent fixé à 6% par heure mais peut être plus faible pour des constituants comme les parois végétales qui ont un temps de séjour dans le rumen plus long (Mertens *et al.*, 1993).

- la méthode par ajustement. Parmi les différents 'ajustements possibles (Mertens *et al.*, 1993), le modèle exponentiel de 1^{er} ordre avec temps de latence (Dhanao, 1988) et sans temps de latence (Ørskov et Mc Donald, 1979) sont les plus utilisés. Le modèle qui caractérise le mieux la dégradation de la MS, de l'azote et de l'amidon est le modèle d'Ørskov et Mc Donald puisque ces constituants se dégradent rapidement dans le rumen tandis que la dégradation des parois végétales (moins immédiate du fait du délai nécessaire aux

microorganismes pour coloniser les parois végétales) s'ajuste mieux avec le modèle de Dhanoa (Nozière et Michalet-Doreau, 2000).

La cinétique de dégradation est ajustée, à partir d'une régression non linéaire suivant l'équation :

$$\begin{aligned} D(t) &= a + b (1 - e^{-c(t-L)}) && \text{si } t \geq L \\ D(t) &= a + b e^{-ct} && \text{si } t < L \end{aligned}$$

Avec **D(t)** la fraction dégradée au temps *t* (en %) ; **a**, la fraction rapidement dégradée (en %) ; **b**, la fraction lentement dégradée (en %) ; **c**, le taux de dégradation (en h⁻¹) ; **t**, le temps d'incubation (en h) ; et **L**, le temps de latence (en h).

La DT de chaque constituant du fourrage (MS, amidon, parois végétales, azote) est ensuite calculée à partir de ces paramètres et du taux de transit des particules hors du rumen selon l'équation :

$$DT = a + \frac{(b \times c \times e^{-(k_p \times L)})}{(c + k_p)}$$

Avec **a**, **b**, **c**, et **L** comme décrit ci-dessus et *k_p* (en h⁻¹) le taux de transit des particules hors du rumen

La méthode de référence *in sacco* pour les fourrages est la méthode de Michalet-Doreau *et al.* (1987). Elle est utilisée pour caractériser la dégradation ruminale des matières azotées des fourrages (NRC, 2001; NorFor, 2011, Nozières *et al.*, 2007) et des fractions pariétales et amylacées des aliments (Sauvant *et al.*, 1994 ; Offner *et al.*, 2003). Toutefois sa mise en œuvre selon la méthodologie classique (échantillon séché et broyé à une grille de 1 mm) n'est pas valable pour apprécier les variations de dégradabilité de l'amidon du maïs fourrage. Le broyage de l'ensilage de maïs (qui a déjà subi un hachage à la mise en silo) induit des pertes particulières d'amidon très élevées (Philippeau et Michalet Doreau, 1998), qui rendent difficiles la mise en évidence des variations de la dégradabilité de l'amidon dans le rumen.

La méthode *in sacco* peut aussi être utilisée pour mesurer la digestibilité intestinale (totale, dans l'intestin grêle ou dans le gros intestin). Pour cela, les sachets de nylon contenant l'échantillon de fourrage, sont introduits dans la partie intestinale au travers d'une canule placée au duodénum (entrée de l'intestin grêle) ou à l'iléum (fin de l'intestin grêle) et sont récupérés dans les fèces (Ali *et al.*, 2012).

2.1.2.2. Mesure des flux digestifs: technique du double marquage

L'objectif de la mesure des flux digestifs est de connaître le bilan *in vivo* des actions de digestion dans le rumen et les intestins (quantification de l'ingéré, du flux duodénal et du flux fécal), voire de quantifier la partition de la digestion entre l'intestin grêle et le gros intestin (quantification du flux iléal). Contrairement au flux fécal qui est quantifié par une collecte totale des fèces, la mesure des flux duodénaux et iléaux consiste à perfuser en continu, par la canule du rumen, un marqueur indigestible, et à prélever, par une canule permanente placée au duodénum (voire à l'iléon), des échantillons de digesta à intervalles de temps réguliers sur le nycthémère. On fait alors l'hypothèse que le marqueur marque de façon homogène les digesta, et que l'échantillon prélevé est représentatif du contenu passant.

Afin de pouvoir calculer le flux duodénal ou (iléal) d'un constituant X (amidon, parois végétales...), à partir d'un marqueur M, il faut d'abord déterminer le flux duodénal (ou iléal) de la MS à partir de la formule suivante :

$$\text{Flux duodénal MS (kg/j)} = \frac{\text{quantité de M excrété dans les fèces (g /j)}}{[\text{M}] \text{ dans l'échantillon duodénal (g/kg MS)}}$$

Le flux duodénal ou iléal d'un constituant noté X est alors estimé à partir du calcul suivant :

$$\text{Flux duodénal de X (kg/j)} = [\text{X}] \text{CTD (kg/kg MS)} \times \text{Flux duodénal MS (kg/j)}$$

Enfin grâce à la mesure du flux duodénal, il est possible de calculer la digestibilité apparente ruminale (notée dR) ou intestinale (notée dI) d'un constituant noté XX à partir des formules suivantes :

$$\text{dR}_{\text{XX}} (\%) = \frac{(\text{flux ingéré de X} - \text{flux duodénal de X})}{\text{flux ingéré de X}} \times 100$$

$$\text{dI}_{\text{XX}} (\%) = \frac{(\text{flux duodénal de X} - \text{flux fécal de X})}{\text{flux duodénal de X}} \times 100$$

Lorsqu'un seul marqueur est utilisé, il s'agit en général de l'Ytterbium (Yb) (Fanchone *et al.*, 2013 ; Nozière *et al.*, 2014). Pour limiter les risques de biais éventuels de marquage et d'échantillonnage, il est possible d'utiliser en parallèle un deuxième marqueur indigestible dans les intestins, qui peut être un marqueur interne (ADF, ADL ou alcanes, Kozloski *et al.*, 2014) ou externe. Dans ce cas, l'un des marqueurs est plus spécifique de la

phase liquide (ex, le chrome EDTA noté Cr) et l'autre plus spécifique de la phase particulaire (ex, le chlorure d'ytterbium noté Yb) (Siddons *et al.*, 1985). Il est alors possible, soit de moyenner les résultats obtenus avec les 2 marqueurs (Peyraud, 1987), voire avec 3 marqueurs (Hristov, 2007; Krizsan *et al.*, 2010) soit de faire une correction théorique de l'échantillon prélevé selon la méthode du double marquage, mise au point sur moutons et proposée par Faichney (1993). Cette méthode est basée sur le principe que le rapport de concentration des 2 marqueurs dans le flux de digesta « vrai » est égal au rapport de concentration de ces 2 marqueurs dans les fèces.

Les méthodes de marquage sont donc très variées et le choix le plus approprié est très dépendant de la nature des rations étudiées et de la qualité de la chirurgie.

2.2. Les mécanismes généraux de la digestion de l'amidon et des parois végétales du maïs chez les ruminants

2.2.1. Digestibilité dans l'ensemble du tube digestif

2.2.1.1. Digestibilité *in vivo* du NDF

La digestibilité *in vivo* apparente du NDF dans l'ensemble du tube digestif est en moyenne de 50%. Elle varie avec l'avancement de la maturité mais aussi selon la hauteur de coupe au moment de l'ensilage (Fernandez *et al.*, 2004) (Tableau 2). Andrieu *et al.* (1993) observent, en moyenne, une digestibilité *in vivo* apparente du NDF de 56% du NDF ingéré qui varie de 76% à 42% entre 18 et 51 % de MS (N=234).

2.2.1.2. Digestibilité *in vivo* de l'amidon

La digestibilité *in vivo* apparente de l'amidon dans l'ensemble du tube digestif est en moyenne de 99% de l'amidon ingéré et peut varier selon la maturité et la hauteur de coupe au moment de la récolte (Fernandez *et al.*, 2004) (Tableau 2). D'après Jensen *et al.* (2005), l'amidon de l'ensilage de maïs est digéré en moyenne à 99% dans l'ensemble du tube digestif et varie faiblement entre 98 et 100% entre 26% et 40% de MS de la plante entière.

Tableau 2 : Partition de la digestion de l'amidon et des parois végétales du maïs fourrage à partir des données de la littérature

Reference	MS plante entière (%)	Digestibilité de dans le tube digestif total (% ingéré)		Dégradabilité in sacco ou digestibilité in vivo dans le rumen (% ingéré)		Digestibilité dans les intestins (% ingéré)			Fraction non digérée (% ingéré)	
						Intestin grêle	Gros intestin			
		NDF	Amidon	NDF	Amidon	Amidon	NDF	Amidon	NDF	Amidon
Jurjanz et Monteils (2005) ¹	35,6	-	-	29,6	88,10	-	-	-	-	-
Jensen et al. (2005) ^{1,2}	26,0	56,0	100,0	39,0	93,0	6,5	4,1	2,8	44,0	0,0
	35,0	51,0	99,0	38,0	91,0	7,5	3,9	6,4	49,0	1,0
	40,0	43,0	98,0	33,0	91,0	8,2	4,4	5,8	57,0	2,0
Fernandez et al. (2004) ¹	27,6	50,6	99,4	60,1	91,3	3,1	-	7,7	49,4	0,6
	28,40	49,3	99,5	53,1	77,7	11,6	-	8,8	50,7	0,5
Ali et al. (2012) ²	35,8	-	-	-	-	-	7,5	0,5	59,6	0,5
INRA (2007)	25,0	56,0	-	-	-	-	-	-	-	-
	30,0	54,0	-	-	-	-	-	-	-	-
	35,0	54,0	-	-	-	-	-	-	-	-
	40,0	54,0	-	-	-	-	-	-	-	-

¹ Mesures *in sacco*

² Mesures *in vivo*

2.2.2. Digestion dans le rumen

Les aliments ayant subi la mastication sont hydrolysés en sucres simples (glucose) et en acides aminés dans le rumen sous l'action de la fermentation par la flore microbienne du rumen (bactéries, protozoaires et champignons). Cette fermentation ruminale génère :

- des gaz : méthane (CH₄), dioxyde de carbone (CO₂),
- de l'ammoniac (NH₃) ;
- de la chaleur (sous forme d'ATP) ;
- des acides gras volatils (AGV) : acide acétique (C2), acide propionique (C3) et acide butyrique (C4) qui représentent plus de 90% des AGV. La proportion respective de ces trois AGV est très variable, et dépend fortement de la nature du régime et du niveau d'ingestion (Nozière *et al.*, 2011), qui conditionnent le pH intra-ruminal.

2.2.2.1. Dégradabilité du NDF dans le rumen (mesures *in sacco*)

Les parois végétales (NDF) sont majoritairement digérées dans le rumen (Figure 12). Mais peu de références sont disponibles sur la dégradabilité *in sacco* du NDF de l'ensilage de maïs dans le rumen. Nous utiliserons donc, dans cette partie, les deux bases de données ARVALIM® et INRA pour illustrer le niveau de dégradabilité du NDF dans le rumen mais aussi celui de l'amidon (Annexe 3).

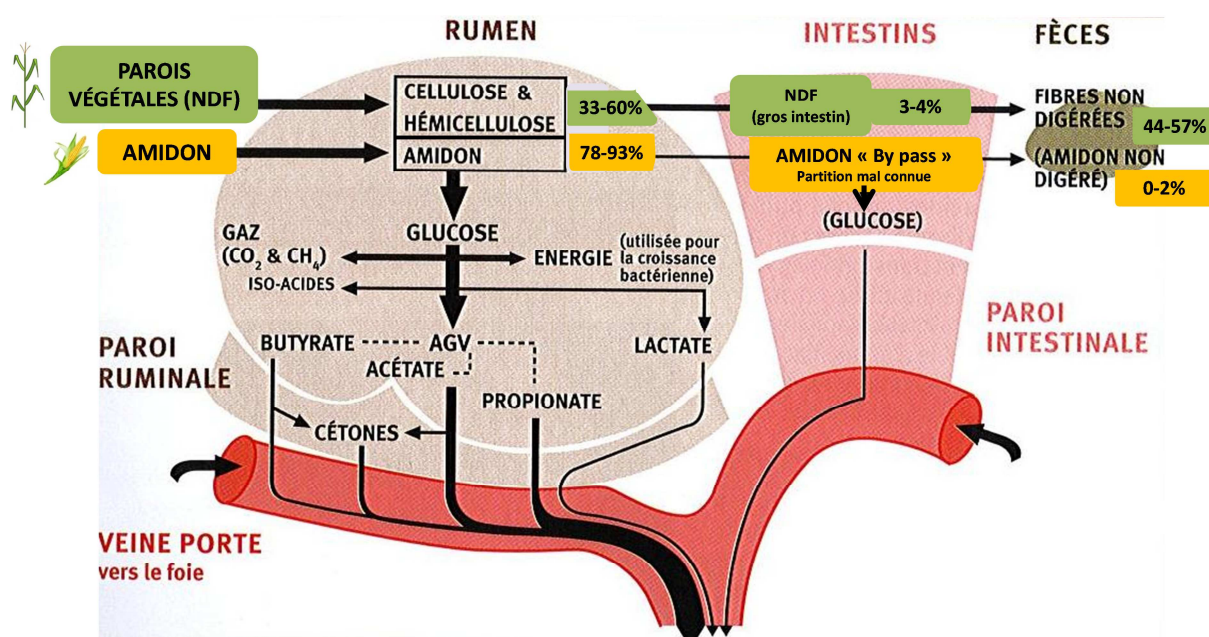


Figure 12 : Digestion de l'amidon et des parois végétales chez les bovins (adapté de Brocard et Leclerc, 2010 ; les proportions sont exprimées en % d'amidon ingéré et de NDF ingéré à partir de Fernandez et al., 2004 et de Jensen et al., 2005)

La dégradabilité théorique du NDF dans le rumen mesurée *in sacco* (DT) est de $25 \pm 10\%$ en moyenne dans la base INRA (N=25) et de $33 \pm 5\%$ en moyenne dans la base ARVALIM® (N=191). Les données issues d'ARVALIM® sont en accord avec ceux de Jurjanz et Monteils (2005) et Jensen *et al.* (2005) (cf Tableau 2).

La variabilité importante des données, notamment dans la base de données INRA, s'explique par des différences de conditionnement des échantillons dans les différents essais. En effet, dans la base de données INRA, 15 données sont issues d'un essai expérimental utilisant des échantillons frais et broyés grossièrement (taille des particules $> 4\text{mm}$) pour lesquels les valeurs de dégradabilité du NDF sont plus basses que pour les autres échantillons de la base qui sont séchés et broyés à 3 mm. Pour la base ARVALIM®, les valeurs de

dégradabilité du NDF correspondent à des échantillons séchés et broyés à 4 mm et pour les données issues de Jurjanz et Monteils (2005) et Jensen *et al.* (2005), les échantillons étaient séchés et broyés à 1,5 mm. Dulphy *et al.* (1999) ont fait ce constat sur les fourrages herbagers et ont montré que le type de conditionnement des échantillons (séchage, broyage) influençait fortement la dégradabilité *in sacco* de la MS et de l'azote. Dulphy *et al.* (1999) ont alors confirmé l'intérêt d'utiliser la méthode de Michalet-Doreau *et al.* (1987) comme méthodologie standard pour l'étude de la dégradation de l'azote des fourrages dans le rumen. Cependant, pour les fourrages riches en amidon comme l'ensilage de maïs, aucune méthode « standard » n'est aujourd'hui disponible, ce qui explique la variabilité importante des données de dégradabilité *in sacco* dans la littérature.

La valeur du taux de transit des particules dans le rumen (kp) utilisée dans le calcul de la dégradabilité *in sacco* (DT) est généralement fixée à 6% comme c'est le cas dans les deux bases de données ARVALIM® et INRA et dans Jurjanz et Monteils (2005). Cependant, selon le type de constituant étudié (MS, NDF, Amidon, Azote) le kp de 6% n'est pas toujours représentatif du taux de transit réel des particules dans le rumen (Mertens, 1993). L'utilisation d'un kp de 2% dans le calcul de la dégradabilité du NDF par Jensen *et al.* (2005) peut aussi expliquer la moyenne légèrement plus élevée de la dégradabilité du NDF dans leur étude.

Enfin, comme nous le verrons par la suite, la variabilité importante de la dégradabilité du NDF s'explique aussi en grande partie par des variations liées au stade de maturité (Jensen *et al.*, 2005).

2.2.2.2. Dégradabilité du NDF dans le rumen (mesures *in vivo*)

Peu de références sont disponibles sur la digestibilité ruminale mesurée *in vivo* (par la technique des flux) à partir de l'ensilage de maïs seul. La plupart des études *in vivo* concernent des régimes à base d'ensilage de maïs destinés à des animaux en production qui ont des niveaux d'ingestion plus élevés que les vaches taries des expérimentations *in sacco* des bases de données ARVALIM® et INRA. Les valeurs de dégradabilité du NDF *in sacco* sont donc difficilement comparables avec des mesures *in vivo* issues de la littérature. Toutefois, pour les études *in vivo* où la proportion d'ensilage de maïs est majoritaire dans la ration (Fernandez *et al.*, 2004), la variabilité de la digestibilité du NDF dans le rumen est très liée à la maturité de la plante entière de maïs (cf Tableau 2).

2.2.2.3. Dégradabilité de l'amidon dans le rumen (mesures *in sacco*)

L'amidon est majoritairement fermenté dans le rumen (*cf* Figure 12). La dégradabilité de l'amidon dans le rumen est en moyenne de $90\pm 6\%$ (ARVALIM®, N=167) et de $93\pm 6\%$ (INRA, N=29) et varie de 32 points entre 23 et 44% de MS plante entière (ARVALIM®) et de 42 points entre 24% et 40% MS (INRA) (Annexe 3). Ces résultats sont en accord avec l'étude *in sacco* de Jurjanz et Monteils (2005) qui montre une dégradabilité moyenne de l'amidon de la plante entière de maïs de 88% (*cf* Tableau 2). Dans l'étude de Jensen *et al.* (2005), la dégradabilité moyenne de l'amidon est plus élevée (94%) notamment parce que le kp utilisé pour le calcul de la dégradabilité est plus faible (kp=5%) que dans les deux bases de données ARVALIM® et INRA et dans Jurjanz et Monteils (2005) (kp=6%).

Comme pour le NDF, la dégradabilité de l'amidon mesurée *in sacco* est très variable et dépend fortement du mode de conditionnement de l'échantillon. Philippeau et Michalet-Doreau (1997) montrent effectivement, sur la partie grain, qu'un broyage trop fin de l'échantillon (2mm) induit des pertes particulières d'amidon importantes au travers des pores du sachet. Cette perte en particules conduirait à des valeurs plus élevées de dégradabilité de l'amidon qu'avec un broyage de l'échantillon plus grossier (>3mm). La variabilité très élevée de la base INRA s'explique en grande partie par des différences de conditionnement. En effet, les dégradabilités *in sacco* de la base INRA ont été mesurées sur des échantillons frais et broyés grossièrement (>4 mm, N=15) et sur des échantillons secs et broyés à 1,5 mm (N=9) ou à 3 mm (N=5). La variabilité de la base ARVALIM® est principalement due à l'évolution du stade de maturité puisque tous les échantillons utilisés pour la mesure de dégradabilité de l'amidon ont été broyés à 4 mm.

2.2.2.4. Dégradabilité de l'amidon dans le rumen (mesures *in vivo*)

In vivo, Khan *et al.* (2014) observent qu'en général, 63 à 93% de l'amidon de l'ensilage de maïs est dégradé dans le rumen. Toutefois, dans la plupart des études utilisées par Khan *et al.* (2014), l'ensilage de maïs n'est pas la seule source d'amidon du régime et n'est parfois même pas majoritaire. Dans la littérature, seuls les résultats de Fernandez *et al.* (2004) et Jensen *et al.* (2005) pour lesquels l'ensilage de maïs représente la source majoritaire d'amidon dans la ration, semblent pertinents dans l'analyse de la digestibilité ruminale *in vivo* de l'amidon. En moyenne, la digestibilité apparente *in vivo* de l'amidon dans le rumen est de 85% et varie selon la maturité et la hauteur de coupe à la récolte (Fernandez *et al.*, 2004) (*cf*

Tableau 2). D'après Jensen *et al.* (2005), la digestibilité apparente *in vivo* de l'amidon dans le rumen est en moyenne de 92% et varie de 91 à 93% entre 26 et 40% de la MS de la plante entière.

2.2.3. Digestion dans le compartiment intestinal

2.2.3.1. Digestibilité du NDF dans le gros intestin

La part de NDF non dégradée dans le rumen ne peut pas être digérée dans l'intestin grêle mais peut l'être dans le gros intestin. D'après Ali *et al.* (2012), la proportion de NDF digérée dans le gros intestin (méthode des sachets mobiles) est en moyenne seulement de 8 % du NDF ingéré et peut varier de 4 à 11% selon la teneur en NDF des maïs de l'étude (*cf* Tableau 2). Dans l'étude de Jensen *et al.* (2005) où l'ensilage de maïs est majoritaire dans la ration, la digestibilité du NDF dans le gros intestin est plus faible et varie de 3 à 4% entre 26 et 40% de MS de la plante entière.

2.2.3.2. Digestibilité de l'amidon dans l'intestin grêle et le gros intestin

L'amidon est essentiellement fermenté dans le rumen mais une partie (l'amidon « by pass ») peut échapper à cette digestion (*cf* Figure 12). L'amidon « by pass » subit une digestion de type enzymatique au niveau de l'intestin grêle, ce qui entraîne la production de glucose qui est absorbé au niveau de la paroi de l'intestin grêle. Toutefois, la digestion de l'amidon « by pass » de l'ensilage de maïs dans le compartiment intestinal (intestin grêle + gros intestin) est plutôt méconnue. Jusqu'à présent, pour estimer la matière organique fermentescible (MOF) et donc la quantité de protéines microbiennes disponibles, le calcul proposé par INRA (2007) considérait que tout l'amidon était dégradé dans le rumen. Or certaines études montrent qu'une partie de cet amidon est digéré dans la partie intestinale. Ali *et al.* (2012) montrent, à partir de mesures *in sacco* au niveau du duodénum et de l'iléum, que $34 \pm 10\%$ de l'amidon de l'ensilage de maïs est digéré dans l'intestin grêle et $0.5 \pm 0.9\%$ dans le gros intestin. Mais les écarts-types élevés liés à ces moyennes suggèrent que la variabilité est importante entre les ensilages de maïs de cette étude.

En se référant à des données *in vivo* où la seule source d'amidon est l'ensilage de maïs, la proportion de l'amidon qui est digestible dans l'intestin est effectivement plus faible que celle mesurée par Ali *et al.* (2012). En moyenne, 7% de l'amidon de l'ensilage de maïs est digéré dans l'intestin grêle (Fernandez *et al.*, 2004 et Jensen *et al.*, 2005) et 5% dans le gros intestin (Jensen *et al.*, 2005 ; 8% selon Fernandez *et al.*, 2004) (*cf* Tableau 2).

Ces proportions varient fortement selon le stade de maturité : de 0 à 17% dans l'intestin grêle et de 5 à 10% dans le gros intestin entre 24 et 33% de MS de la plante entière dans l'étude de Fernandez *et al.* (2004). Ces proportions sont de l'ordre de 6 à 8% dans l'intestin grêle et de 0 à 0.8% dans le gros intestin entre 26 et 40% de MS de la plante entière dans l'étude de Jensen *et al.* (2005).

La quantité d'amidon digérée dans l'intestin va surtout dépendre de la quantité d'amidon qui arrive au niveau du duodénum (pour l'intestin grêle) et au niveau de l'iléum (pour le gros intestin) mais aussi de la dégradabilité de l'amidon dans le rumen (Nocek and Tamminga, 1991).

2.2.4. Fractions non digérées retrouvées dans les fèces

2.2.4.1. Fraction de NDF non digérée

En raison d'une faible compensation dans la partie intestinale, la proportion de NDF non digérée est importante et la variabilité de la dégradation du NDF dans le rumen se retrouve au niveau fécal. D'après Fernandez *et al.* (2004), la proportion de NDF indigestible du maïs fourrage s'élève en moyenne à 225g/kg de MS ingérée (soit en moyenne 50% du NDF ingéré) (*cf* Tableau 2). Andrieu *et al.* (1993) observent qu'en moyenne, la proportion de NDF indigestible est légèrement plus faible (205g/kg MS ingérée) et varie de 170 à 260 g/kg de MS ingérée entre 18 et 53% de MS (N=234) de la plante entière.

2.2.4.2. Fraction d'amidon non digérée

Une faible partie de l'amidon est indigestible et se retrouve dans les fèces. Cette proportion d'amidon indigestible est en moyenne de 0,6% (Fernandez *et al.*, 2014) et de 1% (Jensen *et al.*, 2005) de l'amidon ingéré. Cette proportion d'amidon peut toutefois varier de 0,5% à 0,6% selon la maturité et la hauteur de coupe à la récolte dans l'étude de Fernandez *et al.* (2004) et de seulement 0 à 2% entre 26 et 40% de MS de la plante entière dans l'étude de Jensen *et al.* (2005). La proportion d'amidon retrouvée dans les fèces dépend de la teneur en amidon et de sa digestibilité dans le rumen et donc de sa compensation dans la partie intestinale. C'est pourquoi, l'estimation précise de la digestion de l'amidon « by pass » serait nécessaire.

L'amidon et les parois végétales ont donc des niveaux de digestion très variables dans l'ensemble du tube digestif et dans les différents compartiments digestifs (rumen et intestins). Mais quels sont les principaux facteurs qui sont à l'origine de cette variabilité ?

2.3 Facteurs de variation de la digestion du maïs fourrage chez les ruminants

Khan *et al.* (2014) ont montré l'importance de plusieurs facteurs de variation de la digestibilité dont les principaux sont le stade de maturité et la variété et dans une moindre mesure, les pratiques à la récolte (hauteur de coupe, éclatement du grain, etc.), les conditions climatiques (température, gel, rayonnement solaire, précipitations), l'agronomie du sol (nature du sol, fertilisation,...). Récemment, Der Bedrosian *et al.* (2012) et Weinberg et Chen (2013) ont montré, *in vitro*, que la conservation en ensilage pouvait également fortement influencer la digestibilité de la plante entière mais peu d'études sont disponibles sur ce sujet. Dans cette partie, nous aborderons donc l'influence des trois principaux facteurs de variation de la digestibilité qui sont le stade de maturité à la récolte, la variété et la conservation. Afin de mieux comprendre les variations de la digestibilité de la plante entière et de ses fractions énergétiques (amidon et parois végétales), nous analyserons la digestibilité de façon globale dans l'ensemble du tube digestif mais aussi dans les différents compartiments du tube digestif (rumen et intestins).

2.3.1. Influence du stade de maturité du maïs sur la digestion du maïs fourrage

2.3.1.1. Dans l'ensemble du tube digestif

La digestibilité apparente de la matière organique notée dMO (représentative de la plante entière) est élevée et globalement peu variable : en France, en moyenne, elle s'élève à 70% (N=478, Barrière *et al.*, 2004) et varie entre 61 et 77% selon la variété utilisée. Les dMO ayant servi à l'élaboration des tables INRA (2007) sont légèrement plus faibles avec une moyenne de $72 \pm 3\%$ et ont une plage de variation de 66 à 78 % entre 18 et 53% de MS de la plante entière (N=254). Des valeurs comparables sont observées en Angleterre (en moyenne 71%, Browne *et al.*, 2005), aux Etats-Unis (en moyenne 68%, méta-analyse de 24 références de 2000 à 2006 ; Ferraretto et Shaver, 2012), aux Pays Bas et Canada (en moyenne 69% ; synthèse de données de 1992 à 2013, Khan *et al.*, 2014), en Suisse (en moyenne 73%, Arrigo et Stoll, 2012) et même en Bulgarie (en moyenne 68%, Kirilov, 1999) ou au Brésil (en moyenne 66%, Dos Santos *et al.*, 2011).

La digestibilité de la matière organique correspond à la somme pondérée de la digestion des différents constituants de la plante (Daccord *et al.*, 1996). Avec l'avancement du stade de maturité, la dMO n'évolue que très faiblement (Meisser, 2000). En effet,

l'augmentation de la part du grain dont la digestibilité est élevée (en moyenne supérieure à 95%, d'après Khan *et al.*, 2014) compense la diminution de la digestibilité des tiges et feuilles (baisse moyenne de 52 à 39%, Khan *et al.*, 2014). La digestibilité des ensilages de maïs dépend donc essentiellement de la teneur en constituants pariétaux non digestibles (NDFnd) comme l'a montré Andrieu *et al.* (1993) (Figure 13).

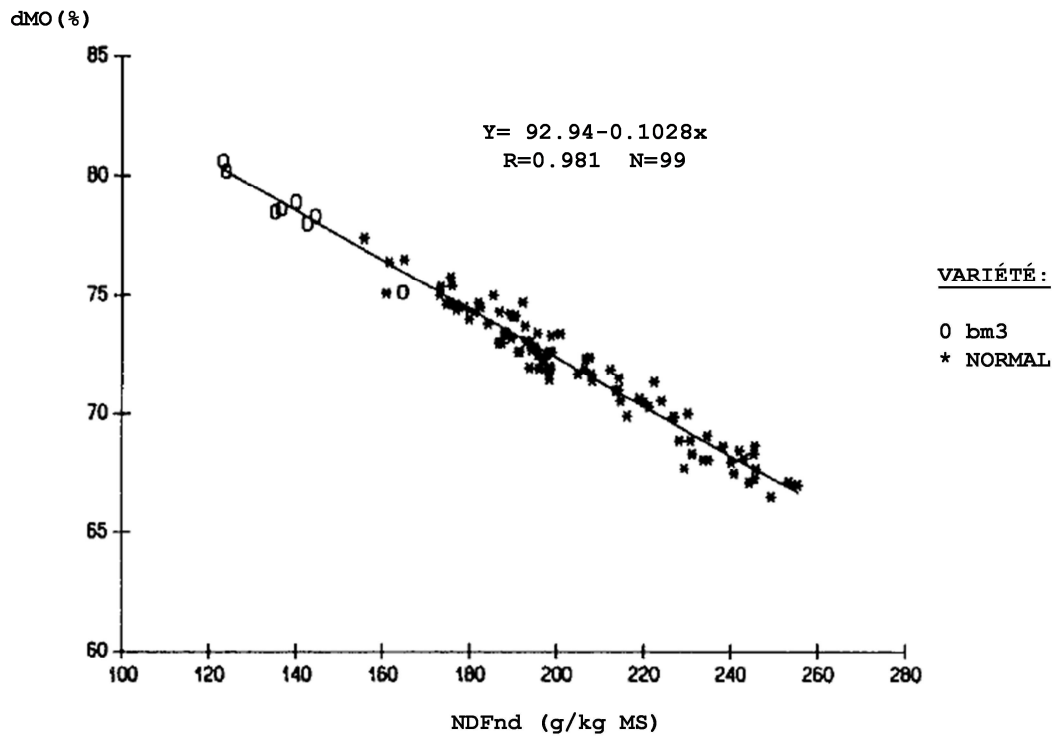


Figure 13 : Relation entre la digestibilité de la matière organique (dMO) des maïs plante entière en vert et leur teneur en parois végétales non digestibles (NDFnd) (Andrieu *et al.*, 1993)

La dMO de la plante entière, comme le soulignent Barrière *et al.* (1992), dépend en fait plus fortement de la qualité de la tige et des feuilles que de la proportion de grains ou de la teneur en amidon. Demarquilly *et al.* (1994), montrent effectivement que la dMO augmente très faiblement en fonction de la teneur en amidon (Figure 14). Pourtant, la proportion d'épis a longtemps été considérée comme un facteur essentiel, notamment en Allemagne (Meisser, 2000).

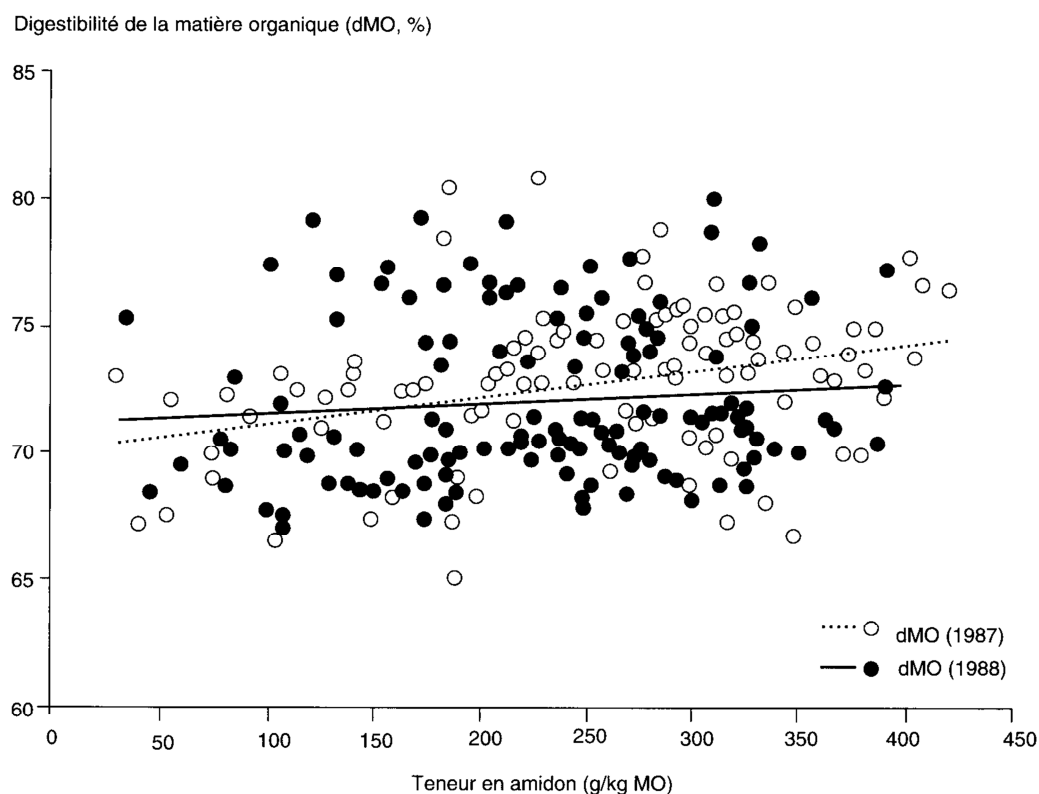


Figure 14 : Relation entre la digestibilité de la matière organique des maïs plante entière en vert et leur teneur en amidon (NDFnd) (Demarquilly, 1994)

De nombreuses études ont été réalisées pour tenter d'apprécier les variations de la digestibilité de deux fractions énergétiques de la plante : l'épi (riche en amidon) et la partie tige-feuilles (riche en NDF).

Avec l'avancement de la maturité, les variations de digestibilité liée à l'épi de maïs sont faibles et proviennent surtout de la rafle (Hepting, 1988 cité par Meisser, 2000). La digestibilité des parois végétales (fraction NDF) issues des tiges et feuilles diminue fortement avec la maturité. Cette baisse de la digestibilité du NDF, liée au degré de lignification de la plante de maïs avec l'avancement de la maturité (Barrière *et al.*, 2003) peut être plus précoce lorsque les températures au cours de la croissance sont élevées notamment en raison d'une sénescence des tiges et feuilles qui intervient plus rapidement (Meisser et Weiss, 1999 ; Boon *et al.*, 2012). Mais, la relation entre la teneur en lignine et la diminution de la digestibilité du NDF avec le stade de maturité dépend surtout du génotype de la plante de maïs (Barrière *et al.*, 2003). A l'inverse un déficit hydrique provoque un défaut de développement de l'épi et des tiges-feuilles, un arrêt de l'exportation des glucides solubles vers le grain au profit des tiges et des feuilles qui compensent le manque qualitatif de l'épi par une augmentation de leur digestibilité avec la maturité (Meisser, 2000).

2.3.1.2. Dans le rumen

La dégradabilité de la plante entière dans le rumen, représentée par la dégradabilité de la MS, diminue avec le stade de maturité (Philippeau et Michalet-Doreau, 1997 ; Jensen *et al.*, 2005). Cette baisse s'explique en partie par une diminution de la dégradabilité de l'amidon caractérisée par un niveau et une vitesse de dégradation plus faible. Philippeau et Michalet-Doreau (1997) observent effectivement que la dégradation *in sacco* de l'amidon contenu dans les grains de maïs non-ensilé diminue linéairement avec la maturité que ce soit pour des maïs dentés ($R^2=0,85$) ou des maïs cornés ($R^2=0,93$). La diminution du niveau et de la vitesse de dégradation de l'amidon est notamment causée par une augmentation de la vitrosité lors de la maturation des grains de maïs (Philippeau et Michalet-Doreau, 1998 ; Philippeau *et al.*, 1999). Une corrélation négative existe entre la vitrosité des grains de maïs et la dégradation ruminale de la MS ($R^2=0,82$; Ngonyamo-Majee *et al.*, 2009) et entre la vitrosité des grains et la dégradation ruminale de l'amidon ($R^2=0,86$; Philippeau et Michalet-Doreau, 1997).

Avec l'avancement de la maturité et donc l'augmentation de la vitrosité du grain, le taux d'humidité du grain diminue et les granules d'amidon deviennent alors plus compacts (Allen, 2009). D'après Philippeau *et al.* (2000), l'augmentation de la dureté du grain (barrière physique) est liée à une augmentation de la concentration en protéines insolubles de la matrice protéique encapsulant l'endosperme (barrière chimique). Ces protéines insolubles (les zéines) lentement dégradables limitent l'accessibilité des granules d'amidon contenus dans l'endosperme aux microbes du rumen (Mc Allister *et al.*, 1993). La vitrosité induit donc une forte diminution de la dégradabilité de l'amidon avec l'avancement de la maturité en limitant la colonisation microbienne de l'amidon contenu dans les grains de maïs (Khan *et al.*, 2014).

Pour les études *in vivo* où l'ensilage de maïs est majoritaire dans la ration, la digestibilité de l'amidon dans le rumen suit la même évolution avec la maturité que la dégradabilité de l'amidon mesurée *in sacco* : elle diminue avec l'augmentation du stade de maturité (exprimé en pourcentage de MS de la plante entière) (Figure 15).

Toutefois, la baisse de la dégradabilité de l'amidon n'est pas la seule explication à la diminution de la dégradabilité de la MS avec l'avancement de la maturité. En effet, elle s'explique aussi par la diminution de la dégradabilité de la fraction NDF. D'après les études *in vitro* de Boon *et al.* (2005), Cone *et al.* (2007) et Boon *et al.* (2012) la diminution de la dégradabilité du NDF avec l'augmentation de la maturité est reliée notamment à la teneur en lignine qui augmente et au maillage plus important de cette lignine avec les autres constituants pariétaux. Ces études montrent d'ailleurs une corrélation négative entre la

dégradabilité du NDF et la teneur en lignine considérée alors comme la barrière primaire à l'attaque des microbes au cours de la fermentation des constituants pariétaux.

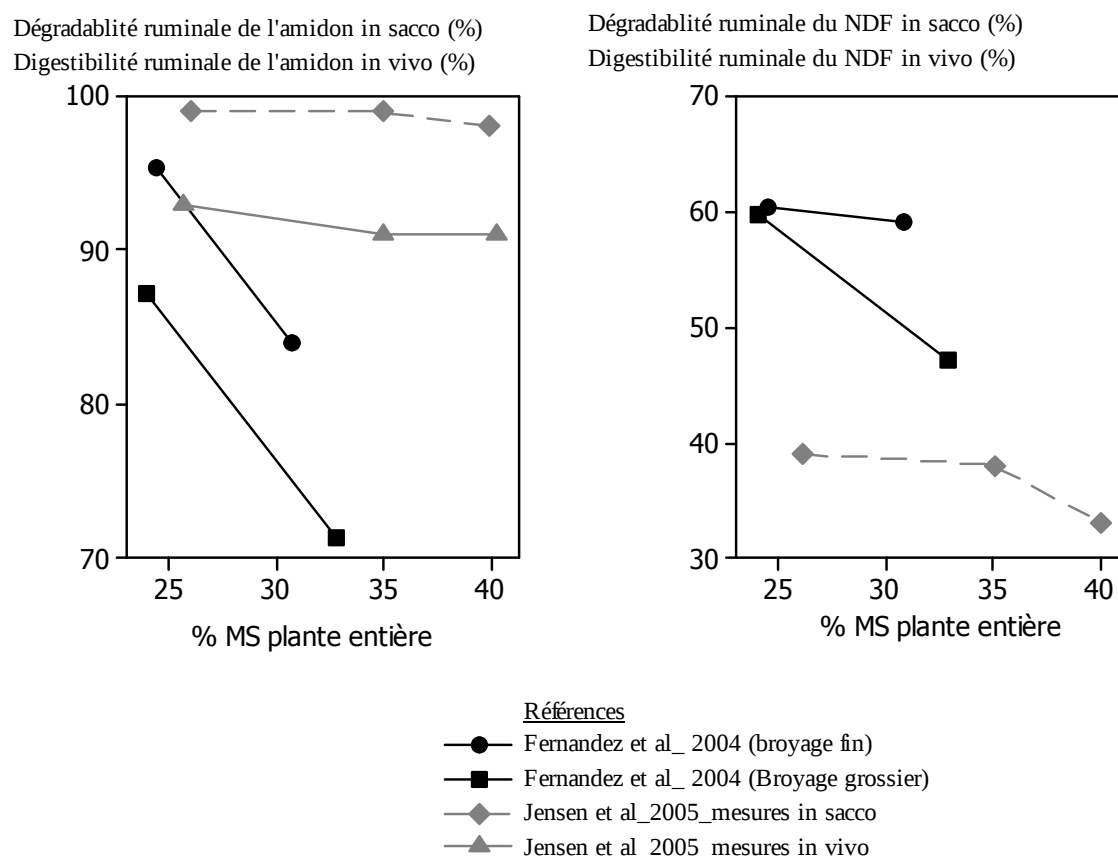


Figure 15 : Évolution de la dégradabilité in sacco et de la digestibilité in vivo de l'amidon et du NDF de l'ensilage de maïs avec la maturité

Les études *in vivo* disponibles à ce sujet et pour lesquelles l'ensilage de maïs est le fourrage principal, montrent aussi une diminution de la dégradabilité du NDF avec l'avancement du stade de maturité (Figure 15).

2.3.1.3. Dans les intestins

Peu d'études sont disponibles au sujet des variations de la digestion de l'amidon et du NDF de l'ensilage de maïs dans le compartiment intestinal.

Jensen *et al.* (2005) n'observe pas d'effet significatif de la maturité sur la digestibilité intestinale du NDF et de l'amidon. Fernandez *et al.* (2004) n'observe pas non plus d'influence significative de la maturité sur la digestibilité intestinale de l'amidon.

En conclusion, la digestibilité de la matière organique évoluerait peu avec la maturité. Ceci est dû à un phénomène compensatoire entre l'accroissement de la teneur en amidon (dont la digestibilité est élevée) et la diminution de la digestibilité des constituants pariétaux (NDF) dans l'ensemble du tube digestif. Cette baisse de la digestibilité du NDF dans l'ensemble du tube digestif est surtout reliée à la baisse importante de la dégradabilité du NDF dans le rumen ; la digestibilité intestinale du NDF n'étant pas influencée par la maturité et représentant seulement 7% de la digestibilité totale du NDF. Avec l'avancement de la maturité, la part de NDF indigestible (retrouvé dans les fèces) augmente et est surtout reliée au degré de lignification.

La digestibilité de l'amidon dans l'ensemble du tube digestif est peu variable mais le site de digestion évolue avec la maturité. En effet, avec l'augmentation de la maturité, les grains de maïs deviennent vitreux et durs limitant alors l'accessibilité de l'amidon par les microbes du rumen, ce qui engendre une diminution de la dégradabilité de l'amidon. La quantité d'amidon « by pass », c'est à dire non dégradée dans le rumen et transitant au duodénum augmente avec la maturité. En effet, avec l'avancement de la maturité, la teneur en amidon augmente mais la digestibilité de l'amidon dans le rumen diminue, ce qui explique l'augmentation du flux duodénal d'amidon. Avec l'augmentation de la maturité, il y a donc un transfert de la proportion d'amidon digérée du rumen vers la partie intestinale. En revanche, à maturité élevée, le grain est plus vitreux et est donc plus difficile à digérer. La part d'amidon indigestible et retrouvée dans les fèces augmente donc aussi avec la maturité.

2.3.2 Influence du génotype du maïs sur la digestion du maïs fourrage

2.3.2.1. Dans l'ensemble du tube digestif

La variabilité génétique de la digestibilité de la matière organique (dMO) est importante. D'après la synthèse de Barrière *et al.* (2005), présentant l'évolution de la digestibilité *in vivo* des variétés de maïs mesurée entre 1958 à 2002, la dMO a légèrement décliné avec le temps : les variétés de la fin des années 90 ont une dMO qui a diminué de 2 points par rapport aux variétés utilisées avant les années 80 (Tableau 3).

Tableau 3 : Évolution variétale des composantes agronomiques de la plante de maïs en vert, et variations de la composition chimique et de la digestibilité de l'ensilage de maïs à partir de diverses variétés entre 1958 et 2002 (Barrière *et al.*, 2005)

	Nombre de variétés	dMO %	dNDF %	NDF (%MS)	Grain (%MS)	Rendement (t MS/ha)
1958-1980	22	70,9	51,1	39,9	43,8	12,5
1981-1988	43	70,7	49,9	40,3	42,9	14,4
1989-1993	60	69,8	48,4	40,9	44,9	16,1
1994-1999	77	69,7	47,6	40,3	44,5	16,4
1999-2002	44	69,0	45,7	39,9	45,1	18,1
1958-2002	246	69,9	48,2	40,3	44,4	15,9

Ces écarts entre hybrides résultent généralement de différences liées à la composition et à la digestibilité des parois végétales. Comme énoncé précédemment, Barrière *et al.* (2004), en accord avec Andrieu *et al.* (1993), ont montré que la dMO de la plante entière dépendait très étroitement de la teneur en parois végétales non digestibles ($R^2=0,59$) et dans une moindre mesure de la teneur en grain ($R^2=0,10$). Barrière *et al.* (2005) montrent effectivement qu'en moyenne la digestibilité des parois végétales a diminué de 5,5 points en plus de 40 ans de sélection variétale, ce qui a conduit à une baisse de 2 points de dMO au niveau de la plante entière. A l'inverse, la proportion de grains dans la plante entière a augmenté en faveur d'une augmentation du rendement de plus 5 t de MS/ha entre 1958 et 2002 (Tableau 3).

La structure et l'organisation des constituants pariétaux (NDF), expliquent en majeure partie la variation génétique de la digestibilité du NDF. Barrière *et al.* (2005) préconisent alors, comme cela est fait au Pays-Bas depuis de nombreuses années, de s'intéresser à la biochimie, à l'organisation des molécules des parois végétales et à leur lignification plutôt qu'à la dMO de la plante entière pour la sélection des variétés de maïs.

2.3.2.2. Dans le rumen

À notre connaissance, aucune étude n'a montré l'influence de la variété sur la dégradabilité de la fraction NDF dans le rumen. Seuls Tovar-Gomez *et al.* (1997) mettent en évidence une plus forte dégradabilité du NDF pour les maïs bm3 qui possèdent une mutation d'un gène favorisant une faible proportion de lignine par rapport aux autres constituants.

La dégradabilité ruminale de l'amidon est par contre très variable selon les variétés qui peuvent différer selon le type d'endosperme (maïs corné ou denté). Les grains de maïs cornés,

constitués d'une large matrice protéique entourant les granules d'amidon, ont une dégradation plus lente et plus faible que les maïs dentés caractérisés par une matrice protéique plus fine (Philippeau et Michalet-Doreau, 1997). La matrice protéique limite effectivement l'accessibilité des granules d'amidon aux microbes du rumen (Philippeau *et al.*, 2000). Les maïs de type corné contiennent également plus d'amidon vitreux que les maïs dentés (respectivement 67% et 44%, Pereira *et al.*, 2004) et la vitrosité, comme énoncé précédemment avec le facteur maturité, constitue une barrière physique aux microbes du rumen. Correa *et al.* (2002) montrent aussi, qu'entre deux grains de maïs de type denté, des différences de vitrosité sont observables et suggèrent alors que la vitrosité du grain, inversement relié à la dégradabilité de l'amidon dans le rumen, pourrait être utilisée comme paramètre pour la sélection variétale.

2.3.2.3. Dans les intestins

Très peu d'études sont disponibles sur l'influence de la variété sur la digestibilité de l'amidon dans l'intestin grêle. Toutefois, Ramos *et al.* (2009) montrent par la méthode des sachets mobiles sur le grain de maïs mature, que l'effet du génotype sur la digestibilité intestinale de l'amidon (fortement relié à la dégradabilité de l'amidon dans le rumen) est plus marqué quand les grains de maïs sont broyés grossièrement.

En résumé, la variabilité génétique de la dMO est plus liée à la fraction pariétale qu'à la fraction amylacée, et plus à la digestibilité des constituants de cette fraction pariétale qu'à la teneur en NDF. Les variations de la teneur en lignine expliquent aussi en partie les différences de digestibilité des parois végétales entre les variétés de maïs.

Dans le rumen, le facteur variétal va surtout influencer la fraction amylacée et cette différence s'explique par le type d'endosperme. L'effet variétal observable sur la fraction amylacée (grain corné vs denté), n'est pas visible sur l'ensemble du tractus digestif en raison de la compensation avec la digestion de l'amidon au niveau intestinal.

Si la sélection de maïs est spécifiquement adaptée à une utilisation sous forme d'ensilage depuis presque 15 ans (Barrière and Emile, 2000b), les objectifs de sélection ont quant à eux été trop longtemps limités à des critères agronomiques (productivité, résistance à la verse, teneur en grains). Malgré les efforts poursuivis depuis une dizaine d'années pour adapter la sélection à des critères liés à la valorisation des ensilages de maïs par les ruminants (digestibilité de la matière organique), d'autres facteurs, qui influencent fortement la

variabilité génétique de la dMO, pourraient être pris en compte comme la structure biochimique des constituants pariétaux (Barrière *et al.*, 2005).

2.3.3 Influence de la conservation en ensilage sur la digestion du maïs fourrage

Aujourd'hui, pour prévoir la digestibilité de la matière organique de l'ensilage de maïs, l'hypothèse est faite que la dMO du maïs ensilage est équivalente à celle du maïs en vert (Andrieu et Demarquilly, 1974b). Effectivement, la dMO de la plante de maïs en vert permet d'avoir une idée de la valeur nutritive de l'ensilage de maïs avant l'ouverture du silo et le prélèvement de maïs lors de la mise en silo permet également de mieux respecter la représentativité de l'échantillonnage. Mais n'existe-t-il vraiment aucune influence de la conservation en ensilage sur la digestibilité totale de la MO et de ses fractions (amidon et parois) dans le tube digestif total ? Qu'en est-il au niveau des compartiments ruminal et intestinal ?

2.3.2.1. Dans l'ensemble du tube digestif

Selon Harris *et al.* (1965) et Andrieu et Demarquilly (1974a), pour des teneurs supérieures à 25% de MS, la digestibilité de la matière organique de l'ensilage (maïs fermenté) est identique à celle de la plante sur pied (maïs vert) au moment de la récolte. Toutefois, à notre connaissance, cela n'a pas été vérifié pour la digestibilité de l'amidon et des parois végétales. En revanche, des études se sont récemment intéressées à la variabilité de la digestibilité de l'amidon et des parois végétales avec la durée de stockage de l'ensilage de maïs. Weinberg et Chen (2013) montrent effectivement, *in vitro*, que les ensilages de maïs ont des digestibilités de la MS et des parois végétales qui diminuent avec la durée de conservation.

2.3.2.2. Dans le rumen

Au niveau du rumen, c'est surtout l'influence de la conservation sur la dégradabilité de l'amidon qui a été étudiée. Philippeau *et al.* (1998) ont montré que la dégradabilité de l'amidon est plus élevée avec le maïs ensilé qu'avec le maïs en vert. Le ramollissement des grains dus à l'attaque de l'enveloppe protéique pendant la fermentation dans le silo peut expliquer cette dégradabilité de l'amidon plus élevée pour les maïs fermentés. L'hydrolyse partielle de la matrice protéique dans le silo rend les granules d'amidon plus accessibles aux microbes du rumen (Philippeau et Michalet-Doreau, 1998). *In vitro*, Opsi *et al.* (2013), en

accord avec Jurjanz et Monteils (2005), montrent que la dégradabilité *in situ* de l'amidon plus élevée des maïs fermentés est due à une vitesse de dégradation plus élevée.

Le niveau et la vitesse de dégradation de l'amidon dans le rumen augmente d'ailleurs avec la durée de conservation de l'ensilage de maïs (mesuré *in vitro* par Stock *et al*, 1991 et Allen *et al*, 2009). Der Bedrosian *et al*. (2012) expliquent notamment cela par l'accentuation de la protéolyse de la matrice protéique avec la durée de conservation de l'ensilage de maïs.

Concernant l'influence de la fermentation dans l'ensilage sur la dégradabilité de la fraction pariétale, Jurjanz et Monteils (2005) montrent, *in situ*, que la dégradabilité du NDF dans le rumen est plus élevée pour les maïs fermentés car selon eux la fermentation dans le silo hydrolyse déjà une partie de la fraction NDF. Cette fraction NDF serait alors plus rapidement dégradable pour les maïs fermentés que pour les maïs en vert et expliquerait la plus forte dégradabilité du NDF pour les maïs fermentés.

2.3.2.3. Dans les intestins

À notre connaissance, aucune étude n'a observé l'influence de la fermentation dans l'ensilage sur la digestibilité intestinale de la plante entière et de ses fractions amidon et parois végétales. Toutefois, nous pouvons faire l'hypothèse qu'après la digestion dans le rumen, il n'y plus beaucoup de modifications sur les résidus qui arrivent à l'intestin.

En résumé, très peu d'études sont disponibles pour expliquer l'influence de la fermentation dans l'ensilage sur les sites et les niveaux de digestion de la plante entière de maïs et de ses fractions (amidon et parois végétales). Il est actuellement admis que la dMO de l'ensilage de maïs est équivalente à celle en vert. Mais peut-on généraliser cette équivalence à l'étude des fractions amidon et parois végétales de même qu'aux sites de digestion, rumen et intestin ? Probablement pas. La relation dMO vert= dMO ensilage est aujourd'hui utilisée dans le système de prévision de la valeur énergétique en France puisque la dMO de l'ensilage de maïs est prévue à partir de critères mesurés sur les maïs en vert. Cela présente aussi l'intérêt de prévoir la valeur de l'ensilage de maïs avant l'ouverture du silo afin de pouvoir raisonner à l'avance le rationnement hivernal des animaux.

3. Prédiction de la valeur énergétique du maïs ensilage

En France, la valeur énergétique des aliments pour ruminants, et donc de l'ensilage de maïs, est exprimée sous forme d'énergie nette en unité fourragère lait (UFL) pour les animaux en lactation ou en unité fourragère viande (UFV) pour les animaux en croissance. La valeur azotée est définie par les protéines digestibles dans l'intestin (PDI), qui regroupent les PDI d'origine alimentaire (PDIA) et d'origine microbienne (PDIM). Dans cette partie, nous nous intéresserons principalement à la prédiction de la valeur énergétique, car l'ensilage de maïs apporte essentiellement de l'énergie.

3.1. La valeur énergétique du maïs ensilage : définitions, caractéristiques et méthodes actuelles d'évaluation en France et à l'international

3.1.1 Calcul de la valeur énergétique en France

La prédiction de la valeur énergétique, par le système français est réalisée à partir de l'énergie nette (EN) selon les normes INRA (1988) (Tableau 4)

3.1.2 Méthodes de prédiction de la digestibilité en France

Pour prévoir la digestibilité de la MO de l'ensilage (dMOe), nécessaire au calcul de la valeur énergétique, Andrieu (1995) a proposé une série d'équations à partir de critères morphologiques (MS, pourcentage d'épis et de grains, somme de températures,...), de critères chimiques (protéines, amidon, NDF, etc...), de critères chimiques et enzymatiques (digestibilité enzymatique, *in vitro*, *in sacco*), et à partir d'une combinaison de ces critères. Au final, 4 modèles mathématiques (Tableau 5) ont été retenus pour estimer la digestibilité de la MO du maïs vert (dMOv) puisqu'il a été établi que la dMO du maïs ensilage (dMOe) est équivalente à celle du maïs en vert (dMOv) (Andrieu et Demarquilly, 1974b). Aujourd'hui, au laboratoire, c'est le modèle 4 (noté M4) qui est utilisé pour prévoir la digestibilité de la matière organique de l'ensilage de maïs. Bien que la MAT n'explique qu'une faible part de la variabilité de la dMO (Andrieu *et al.*, 1999), son association avec la digestibilité enzymatique de la plante entière (DCS) (bon prédicateur de la dMO, Andrieu *et al.*, 1999) dans le modèle M4 améliore effectivement la précision des équations de prédiction de la dMO par rapport aux autres modèles. Certains auteurs pensent que la teneur en MAT rendrait en partie compte des modifications subies par la plante lors de son vieillissement de, se traduisant par une baisse de la MAT entre le stade laiteux-pâteux et le stade vitreux (Johnson *et al.*, 2002).

Tableau 4 : Principes de calcul de la valeur énergétique des aliments en France (INRA, 2007)

<u>Unités d'expressions de la valeur énergétique :</u>			
$\text{UFL(kcal/kg MS)} = \frac{\text{EN}}{1700} \quad \text{car 1UFL représente 1700 kcal d'EN lait}$			
$\text{UFL(kcal/kg MS)} = \frac{\text{EN}}{1820} \quad \text{car 1UFL représente 1820 kcal d'EN lait}$			
<u>Prévision de la valeur énergétique :</u>			
$\text{EN (kcal/kg)} = \text{EB} * \text{dE}/100 * \frac{\text{EM}}{\text{ED}} * k$			
-Avec EB (kcal/kg MO), l'énergie brute de l'ensilage (EBe) estimée à partir de l'énergie brute de la plante en vert (EBv). Si MS <30%, EBe=EBv+25 et si MS>30%, EBe=EBv*1.02.			
-Avec dE (%), la digestibilité de l'énergie estimée à partir de celle de la MO (dMO, %) suivant le calcul: $\text{dE (\%)} = 1.001 * \text{dMO} - 2.86$			
-Avec le rapport EM/ED qui rend compte des pertes d'énergie sous forme de gaz et dans les urines et estimée selon la formule suivante : $\text{EM/ED} = (84.17 - 0.0099\text{CBo} - 0.0196\text{MATo} + 2.21\text{NA})/100$			
-Avec k, le rendement d'utilisation de l'énergie métabolisable qui varie avec la fonction pour laquelle il est utilisé (entretien, lactation, engraissement) et est fonction de $q = \text{EM/EB}$, la concentration en EM de l'aliment			
-pour la lactation et l'engraissement : $k_l = 0.60 + 0.24 (q - 0.57)$			
-pour l'entretien : $k_m = 0.287q + 0.554$			
-pour l'engraissement : $k_f = 0.78q + 0.006$			
-pour l'entretien et la production de viande : $k_{mf} = (k_m \times k_f \times 1.5) / (k_f + 0.5k_m)$			

Tableau 5: Prévision de la digestibilité in vivo de la MO (dMO en %) à partir de la composition chimique (g/kg MO) et de la digestibilité enzymatique de la MS (Andrieu, 1995)

	Équations	R	ETR
M1	$\text{dMO} = 79.4 + 0.0652\text{MATo} - 0.0591\text{CBo}$	0.634	1.98
M2	$\text{dMO} = 75.7 + 0.0701\text{MATo} + 0.0156\text{NDFo} - 0.0720\text{ADFo}$	0.643	1.97
M3*	$\text{dMO} = 32.5 + 0.0764\text{MATo} + 0.0049\text{AMIo} + 0.4700\text{DCS}$	0.680	1.88
M4	$\text{dMO} = 28.5 + 0.0732\text{MATo} + 0.5501\text{DCS}$	0.668	1.91

* L'amélioration de la précision liée à la prise en compte de la teneur en amidon étant faible (comparaison entre les modèles M3 et M4), il a été décidé de s'affranchir de sa détermination et de d'utiliser le modèle M4 en pratique.

Une fois le calcul de la dMO effectué, les valeurs UFL et UFV sont obtenues par les équations permettant d'estimer successivement l'EB, la dE, l'EM et au final l'EN qui ont été récapitulées dans INRA 2007 (Tableau 5) et qui sont disponibles dans le logiciel PrevAlim (Baumont *et al.* 1999).

La spectrométrie dans le proche infrarouge (SPIR), basée sur la propriété qu'ont les différents groupements chimiques des molécules à absorber le spectre lumineux, est également utilisée pour prévoir la digestibilité des maïs. Les calibrations SPIR de la dMO obtenues par Andrieu *et al.* (1999) sont plus précises que la prévision par les critères chimiques ou enzymatiques. Toutefois, pour que cette méthode soit fiable, le nombre d'échantillons utilisés pour calibrer l'équation de prévision doit être suffisamment important, car elle n'intègre pas certains facteurs de variation observés (lieu, année, date de récolte) (Andrieu et Aufrère 1996). La SPIR est largement utilisée dans les laboratoires d'analyse pour prévoir les paramètres chimiques et enzymatiques de l'équation M4, compte tenu du gain de temps qu'elle apporte, de la non-destruction de l'échantillon et du faible coût d'analyse

L'équation M4 est donc largement utilisée en France pour prévoir la dMO et la valeur énergétique du maïs fourrage, tant pour l'évaluation des variétés dans les programmes de sélection et leur inscription au catalogue officiel (à partir du critère UF) que pour l'évaluation des ensilages de maïs dans le calcul des rations pour les ruminants.

Un autre critère de prévision, appelé DINAG (Digestibilité non amidon non glucides solubles), a été proposé par Argillier *et al.* (1995) et Argillier et Barrière (1996) pour évaluer la qualité nutritionnelle des parois végétales du maïs. Ce critère, utilisé lors de l'inscription des variétés de maïs au catalogue officiel, se calcule ainsi :

$$\text{DINAG (\%)} = \frac{(\text{DCS-Amidon-Glucides solubles})}{(100-\text{Amidon-Glucides solubles})} \times 100$$

3.1.3 Prévision de la valeur énergétique dans les autres pays

La plupart des systèmes actuellement utilisés pour le rationnement énergétique sont basés sur l'expression en énergie nette (Figure 16) de la valeur des aliments et des besoins des animaux.

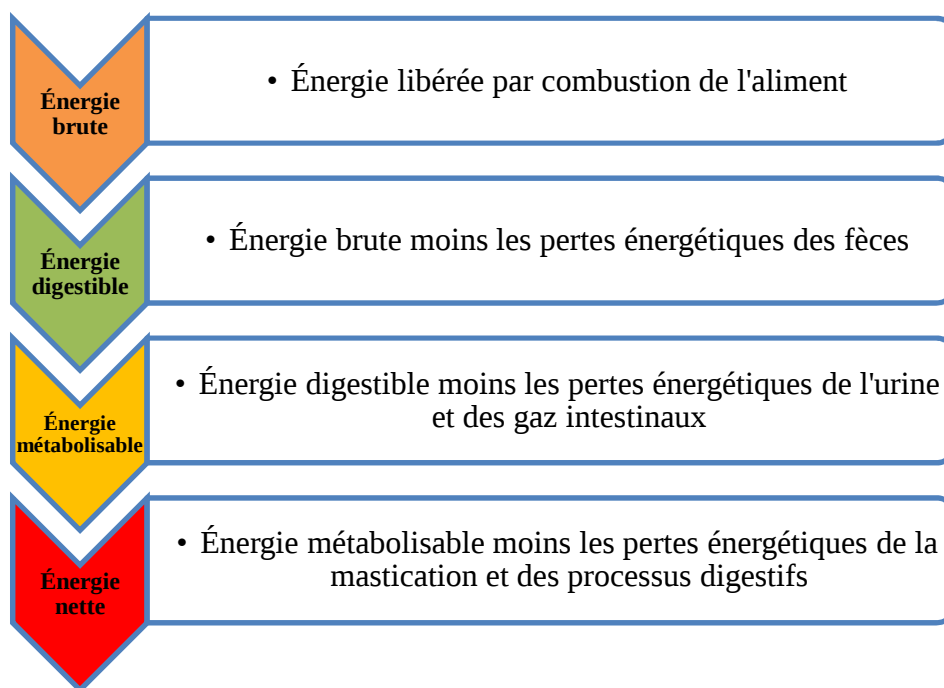


Figure 16: Les différentes étapes de l'utilisation de l'énergie par les ruminants (adapté de Vermorel et Coulon, 1992)

Excepté pour quelques-uns basés sur la teneur en énergie métabolisable (EM) des aliments, la plupart des systèmes repose sur la teneur en énergie nette lait (ENL) des aliments (Tableau 6) calculée à partir de leur teneur en énergie métabolisable (EM) et du rendement (k) d'utilisation de l'EM ($EN = EM \times k$).

Tableau 6 : Les systèmes d'alimentation énergétique utilisés dans différents pays

	Pays utilisateurs
Systèmes basés sur l'énergie métabolisable (EM) ARC (1980 revisité en 1994)	Australie, Grande Bretagne
Systèmes basés sur l'énergie nette (EN) Système EN (1991)	Allemagne
Système VEM (1978)	Belgique, Pays Bas
Système UF de l'INRA (1988, révisé en 2007)	France, Italie, Irlande
Système du NRC (révisé en 2001)	Brésil, Canada, États-Unis
Système du Norfor (2011)	Danemark, Norvège, Islande, Suède

Aux États-Unis, au Canada et au Brésil, la prévision de la valeur énergétique se fait avec l'énergie nette (EN) mais exprimée en Mégajoules/kg (Normes NRC, 2001).

Les différences entre les systèmes basés sur l'énergie nette (EN) proviennent essentiellement de la prévision de la teneur énergie métabolisable des aliments et de la correction des apports énergétiques pour tenir compte des interactions entre les aliments et de l'effet de l'accroissement du niveau d'alimentation. Il existe également des différences dans les besoins des animaux (qui parfois prennent en compte une partie des interactions entre les aliments) ou dans les rendements d'utilisation de l'énergie (k).

Aujourd'hui, la plupart de ces systèmes est en cours de rénovation comme le système UF en France (Sauvant et Nozière, 2013 ; projet Systali) et le système NE pour les pays nordiques (Norfor, 2011).

3.2. Améliorer ou préciser la prévision de la valeur énergétique du système français : enjeux et nouveaux critères

3.2.1 Pistes proposées pour améliorer la prévision de la valeur énergétique

Parmi les équations testées pour prévoir la dMO, l'équation M4 a été conservée, car elle était plus précise et plus économique que les autres équations (deux critères sont nécessaires) (Andrieu, 1995). Cependant, elle n'explique que 45% de la variabilité de la dMO. Quelques erreurs de prévision ont été observées aux stades de maturité avancés, qui ont un amidon moins dégradable dans le rumen (Cabon et Carpentier, 2012).

D'autres critères pourraient alors être intéressants pour préciser ou améliorer la prévision de la digestibilité.

3.2.2.1. La teneur en parois végétales non digestibles (NDFnd)

La teneur en NDF non digestible (NDFnd) du fourrage mesurée *in vivo* est très liée à la dMO (Andrieu *et al.*, 1999). Son augmentation conduit à une diminution de la dMO (Andrieu *et al.*, 1993). La quantité de NDFnd est le résidu issu de la digestion des parois végétales du maïs fourrage, calculée à partir de la teneur en NDF et de la digestibilité *in vivo* des parois végétales (dNDF). Agneessens *et al.* (1995) ont d'ailleurs proposé une estimation du dNDF *in vivo* au laboratoire pour établir l'équation de prévision de la dMO suivante: $dMO = 49,40 - 0,585NDF + 0,535 DNDFo$ ($n=84$, $R^2=0,89$, $ETR=1,66$)

avec DNDFo, la dégradabilité enzymatique des parois végétales élaboré par Agneessens *et al.* (1995)

À ce jour, aucune méthode de laboratoire ne permet de prédire le NDFnd ou le dNDF obtenus *in vivo* de façon précise dans le cas du maïs contrairement aux autres types de fourrages (Jarrige *et al.*, 1995). Dans les données récapitulées par Andrieu *et al.* (1999) les relations entre dNDF et les différents critères mesurés sur la plante entière ne sont pas significatives (NDF) ou très imprécises (ADF, ADL, DCS). La relation entre dNDF et DINAG est un peu meilleure.

3.2.2.2. Les critères *in sacco* et *in vitro* : un lien possible avec la dMO ?

La cinétique de dégradation *in situ* de l'ensilage de maïs permet d'approcher la digestibilité de la matière organique (dMO), par le NDF non dégradé à 48 h (NDFnd48h) (Jensen *et al.*, 2005). Par ailleurs, Jensen *et al.* (2005) montrent que la digestibilité *in vivo* et la dégradation dans le rumen suivent la même évolution avec la maturité que ce soit pour la fraction amidon ou pour la fraction pariétale. Krisan *et al.* (2012) soulignent d'ailleurs que les méthodes *in sacco* et *in vitro* sont capables de prévoir correctement la dMO des fourrages. À ce sujet, Huhtanen *et al.* (2008) montrent pour l'ensilage d'herbe que la production de gaz, par la méthode *in vitro*, permet d'estimer correctement la digestibilité des parois végétales *in vivo* et la dégradabilité des parois végétales dans le rumen. Des critères *in sacco* et *in vitro* pourraient donc être envisagés pour améliorer la précision de la prévision de la dMO de l'ensilage de maïs.

3.2.2 La révision des systèmes d'unité d'alimentation énergétique et protéique français : définition et objectif du projet Systali

Entamé en 2010, le projet Systali entrepris par l'INRA, propose une refonte des tables et recommandations alimentaires pour les ruminants. Ce projet permettra aux systèmes d'unités d'alimentation énergétique et protéique de prédire les réponses multiples des ruminants aux variations de composition des régimes et aux pratiques alimentaires (Sauvant et Nozière, 2013). Concrètement, ces nouvelles données amèneront à revoir le calcul de la valeur des aliments au sein d'une ration qui ne seront plus fixées par une table mais varieront en fonction de la composition de la ration et du niveau d'ingestion. Il sera alors possible de prédire plus précisément les apports de nutriments sur une plus large gamme de régimes, et en particulier de mieux traiter les interactions énergie x protéines, et donc de mieux prévoir les apports et les réponses aux régimes.

Dans les nouvelles tables, les unités de base, UF et PDI perdurent pour « ne pas perturber les habitudes de raisonnement » mais ces unités seront améliorées et affinées. Afin de mieux évaluer la valeur énergétique des fourrages comme l'ensilage de maïs, les nouvelles tables d'alimentation issues du projet SYSTALI permettront de caractériser la contribution des différents substrats énergétiques (amidon vs parois) à la quantité d'énergie apportée par le fourrage, ainsi que leur site de digestion (rumen vs intestins) qui conditionne également l'énergie disponible pour la synthèse de protéines microbiennes (donc la valeur PDI). Au-delà des valeurs UF, unités de base de l'énergie, d'autres critères seront intégrés comme la nature de l'amidon, la dégradabilité de l'amidon dans le rumen, la quantité d'amidon digérée dans les intestins et la teneur en parois indigestibles (Sauvant et Nozière, 2013). Par ailleurs, parmi les différents mécanismes biologiques de la digestion, les transits et la synthèse protéique microbienne seront pris en compte de façon plus fidèle. Les interactions digestives entre aliments seront également intégrées plus précisément ainsi que leurs incidences sur l'animal (santé, bien-être, qualité des produits) et l'environnement (rejets d'azote, de méthane et de phosphore liés à la digestion susceptibles d'altérer le milieu).

En résumé, le stade de maturité à la récolte et le type de variété utilisé influencent la composition morphologique et chimique de la plante de maïs et par conséquent sa digestion chez les ruminants. De plus il est nécessaire de bien évaluer les modifications entraînées par la fermentation (qui a lieu dans l'ensilage) sur la digestion du maïs fourrage dans la mesure où en pratique on va chercher à prévoir la valeur nutritive du maïs à partir de critères mesurés sur la plante en vert prélevée à la récolte avant la mise en silo.

La composition morphologique de la plante de maïs évolue jusqu'au stade pâteux du grain (~30% MS plante entière) : la fraction épi augmente significativement en raison du remplissage des grains au détriment de la fraction tiges-feuilles. Ces modifications morphologiques se traduisent, du point de vue de la composition chimique, par une forte augmentation de la teneur en amidon diminuant, par effet de dilution, la teneur en NDF, la teneur en MAT et la teneur en glucides solubles. Par contre, la digestibilité de la matière organique évolue peu avec la maturité. Ceci est dû à un phénomène compensatoire entre l'accroissement de la teneur en amidon (dont la digestibilité est élevée) et la diminution de la digestibilité des constituants pariétaux

(NDF) dans l'ensemble du tube digestif. Cette baisse de la digestibilité du NDF dans l'ensemble du tube digestif est surtout reliée à la baisse importante de la dégradabilité du NDF dans le rumen en raison de la lignification de la fraction tiges-feuille avec l'augmentation de la maturité. La digestibilité de l'amidon dans l'ensemble du tube digestif est peu variable avec la maturité mais sa dégradabilité dans le rumen diminue fortement aux stades de maturité tardifs pour lesquels les grains deviennent plus vitreux. Avec l'augmentation de la maturité, il y a également un transfert de la proportion d'amidon digérée du rumen vers la partie intestinale mais la part d'amidon indigestible est également plus importante aux stades tardifs.

Selon le type de grain (corné, corné-denté, denté) et la qualité des tiges et des feuilles (DINAG plus ou moins élevé) de la variété, l'éleveur peut moduler la teneur en amidon et la digestibilité de la partie tiges-feuilles. La variabilité génétique de la dMO est d'ailleurs plus liée à la fraction pariétale qu'à la fraction amylacée. La digestibilité des parois végétales varie en partie selon la teneur en lignine des différentes variétés de maïs. Dans le rumen, le facteur variétal (type d'endosperme) va surtout influencer la fraction amylacée. L'effet variétal observable sur la fraction amylacée (grain corné vs denté), n'est pas toutefois pas visible sur l'ensemble du tractus digestif en raison de la compensation par la digestion de l'amidon au niveau intestinal.

Avec la fermentation dans l'ensilage, la teneur en NDF diminue légèrement en raison de l'hydrolyse partielle des hémicelluloses et induit, par effet de dilution, l'augmentation de la teneur en amidon. Très peu d'études sont disponibles pour expliquer clairement l'influence de la fermentation dans l'ensilage sur les sites et les niveaux de digestion de la plante entière de maïs et de ses fractions (amidon et parois végétales). Il est actuellement admis, que la dMO dans l'ensemble du tube digestif des ensilages de maïs est équivalente à celle des maïs en vert .

Cette hypothèse sur l'équivalence entre la dMO de l'ensilage et la dMO du maïs en vert, est aujourd'hui utilisée, en France, dans le système de prévision de la valeur nutritive énergétique. Dans ce système, la dMO de l'ensilage de maïs est prévue selon l'équation M4 à partir de mesures réalisées sur le maïs en vert. Pour un agriculteur qui souhaite établir une ration alimentaire hivernale pour ses animaux, il est effectivement préférable d'avoir la valeur de la digestibilité de son ensilage de maïs avant ouverture du silo, d'où une prévision à partir de critères mesurés sur les maïs en vert. Cependant,

bien qu'ayant un écart-type de prévision faible (inférieur à 2 points de digestibilité) cette équation de prévision n'explique que 45% de la variabilité de la dMO des 254 mesures ayant servi à l'établir. Il convient aussi de s'interroger sur sa validité aujourd'hui, les variétés de maïs et les pratiques de culture et de récolte ayant certainement évolué depuis la fin des années 1980 et début des années 1990, période à laquelle les mesures de l'équation M4 ont été réalisées.

D'autres critères pourraient alors être intéressants pour préciser ou améliorer la prévision de la digestibilité comme la teneur en parois indigestibles (NDFnd) mesurée *in vivo* et même *in sacco*. Mais à ce jour, aucune méthode de laboratoire ne permet de prédire précisément le NDFnd *in vivo* de l'ensilage de maïs.

Dans le projet Systali (mis en œuvre par l'INRA), la rénovation des tables d'alimentation permettra une meilleure caractérisation du devenir des substrats dans le tube digestif (dégradabilité de l'amidon dans le rumen, quantité d'amidon digérée dans les intestins et teneur en parois indigestibles) afin d'une part de mieux estimer l'énergie réellement disponible pour la synthèse de protéines microbiennes dans le rumen (valeur PDIE), et d'autre part, à plus long terme d'évaluer les flux de nutriments absorbés et leur impact sur la qualité des produits, la santé animale et les rejets. L'ensemble des travaux conduits dans cette thèse répondront en partie à ces enjeux. Voyons donc maintenant quels objectifs ont été fixés et quelle stratégie expérimentale a été mise en œuvre dans cette thèse, pour répondre à l'ensemble des problématiques soulevées dans cette synthèse bibliographique.

Objectifs scientifiques et stratégie expérimentale

La digestibilité de la matière organique (dMO) de l'ensilage de maïs dans l'ensemble du tube digestif, est comme nous l'avons vu précédemment, essentielle à la prévision de la valeur nutritive. Entre 1987 et 1993, des mesures de digestibilités *in vivo* de la MO, mais aussi de la fraction NDF ont alors été réalisées et sont disponibles dans les tables INRA. Mais depuis, les variétés, les itinéraires techniques, et les stades de maturité à la récolte ont évolué. Peut-on donc dire que les valeurs disponibles dans les tables sont encore valables ? Sur le terrain, une tendance à récolter à des stades tardifs (MS supérieures à 35% voire à 40%) s'observe mais peu de mesures de référence de digestibilité sont disponibles à ces maturités dans les tables INRA (10% des mesures environ). Par ailleurs, on peut se demander comment des différences entre variétés sur le type d'amidon présent dans le grain (amidon à dégradation lente ou rapide) et sur le critère DINAG (digestibilité plus ou moins importante de la fraction non amidon non glucides solubles mesurée au laboratoire) se traduisent *in vivo* sur la digestibilité des substrats énergétiques dans le tube digestif complet et dans les principaux compartiments digestifs.

Le schéma présenté à la figure 17 présente de façon synthétique les 3 grands objectifs de la thèse et la stratégie expérimentale conduite pour les atteindre. Il positionne aussi les différents chapitres de la thèse par rapport à ces objectifs.

Le premier objectif de la thèse est donc **l'acquisition de nouvelles références sur la digestibilité *in vivo* de la MO et de ses principales fractions**. Pour cela, la digestibilité *in vivo* de 32 ensilages de maïs (dont les caractéristiques sont présentées dans la partie « Matériel végétal de l'étude ») a été mesurée sur le modèle mouton avec la méthode de référence de Demarquilly *et al.* (1995). L'objectif était notamment de quantifier, selon la variété et le stade de maturité à la récolte, la digestibilité de la MO et de ses fractions amidon et parois végétales. Les quantités d'amidon et de parois végétales digestibles dans l'ensemble du tube digestif ont également été évaluées pour mieux comprendre la nature de l'énergie apportée par la plante entière de maïs selon le stade de maturité ou la variété. Des critères agronomiques et climatiques (sommées des températures, pourcentage d'épis dans la plante entière, etc...) sont également disponibles dans cette étude afin de définir plus précisément le stade de maturité, actuellement simplement défini par le pourcentage de MS de la plante entière. L'ensemble des résultats de ce travail fait l'objet du **premier chapitre** de cette thèse.

Ces nouvelles références sur les digestibilités *in vivo* dans l'ensemble du tube digestif seront certes nécessaires à une meilleure évaluation de la valeur nutritive de l'ensilage de maïs dans les nouveaux systèmes d'alimentation INRA (projet SYSTALI), mais ne seront pas suffisantes. En effet, **ces nouveaux systèmes de rationnement prendront aussi en compte le devenir des fractions amidon et parois dans les différents compartiments digestifs (rumen et intestin)**. Par ailleurs, aujourd'hui dans les tables INRA, il n'y a pas de caractérisation pour l'ensilage de maïs, de la dégradabilité de l'amidon dans le rumen alors que ce paramètre est très important d'une part, pour évaluer la matière organique fermentescible dans le rumen et donc la valeur azotée via la synthèse microbienne qui en résulte et, d'autre part, pour **améliorer la complémentation des rations basées sur l'ensilage de maïs en relation avec la maîtrise de la qualité des produits et des risques liés à la santé animale**. Afin de répondre à ce deuxième objectif de la thèse consistant à **préciser la partition de la digestion du maïs fourrage dans le tube digestif du ruminant** trois autres essais sur animaux ont été menés.

Pour mesurer **la dégradabilité dans le rumen** de la plante entière de maïs et des fractions amidon et parois végétales, la technique *in situ* ou *in sacco* des sachets de nylon sur le modèle bovin a été réalisée à partir des 36 ensilages de maïs de la thèse (dont les caractéristiques sont présentées dans le chapitre suivant). Cependant, les conditions d'utilisation de cette méthode de référence (classiquement utilisée pour la mesure de la dégradabilité de l'azote alimentaire) ne sont pas standardisées pour les fourrages riches en amidon comme l'ensilage de maïs. Peut-on utiliser des échantillons de maïs en vert pour estimer la dégradabilité des fractions énergétiques de l'ensilage ? Quel est le mode de conditionnement (séchage, broyage) le mieux adapté pour cette mesure de dégradabilité ? Autant de questions non résolues auxquelles l'étude méthodologie (**chapitre 2**) a souhaité répondre.

Une fois la méthodologie fixée, nous avons ensuite mesuré la dégradabilité *in situ* dans le rumen des 36 ensilages de maïs de la thèse selon le mode de conservation (vert vs fermenté), le stade de maturité et la variété (résultats disponibles dans le **chapitre 3**).

Cependant, cette technique *in situ*, n'est qu'une estimation de la dégradabilité *in vivo*. Pour valider ces mesures, la technique des flux digestifs (système de perfusion de marqueurs indigestibles) a été réalisée et a permis de quantifier la digestion de la MO, de l'amidon, des parois végétales et de l'azote dans les différents compartiments selon le stade de maturité et la variété. L'influence de ces facteurs de variation sur la matière organique fermentescible,

l'efficacité de la synthèse microbienne et les produits issus de la fermentation dans le rumen, ont également pu être évalués dans cette étude qui fait l'objet du **chapitre 4**.

Le troisième objectif de la thèse porte sur l'amélioration de la prévision de la valeur nutritive du maïs fourrage (prévision de la dMO et de la fraction dégradable de l'amidon en particulier). L'équation de prévision M4, aujourd'hui utilisée pour prévoir la dMO *in vivo*, a été établie suite aux mesures de digestibilité *in vivo* réalisées entre 1987 et 1993 avec des maïs distribués en vert aux animaux. Cependant, **cette équation est-elle valide sur des variétés actuelles et des stades de maturité plus tardifs que ceux qui étaient employés à la fin des années 80 ?** De plus, l'équation M4, établie à partir de mesures *in vivo* sur des maïs « en vert », fait l'hypothèse que la dMO de l'ensilage de maïs est équivalent à celle des maïs « en vert ». **À partir de variétés de maïs actuelles, cette relation est-elle toujours vraie ?**

Les mesures de digestibilité *in vivo* sont souvent jugées comme longues et coûteuses et ne sont plus pratiquées que dans quelques stations expérimentales en France comme dans le monde. La mesure de la dégradabilité *in sacco* dans le rumen a été proposée comme alternative, mais **permet-elle réellement d'estimer précisément la digestibilité *in vivo* ?**

Il a été souligné que, l'équation M4 utilisée pour prévoir la dMO *in vivo* de l'ensilage de maïs en routine n'explique que 45% de la variabilité de la dMO. Le premier facteur de variation de la dMO étant la teneur en parois végétales indigestibles, est-il possible de trouver de nouveaux critères de prévision qui **rendraient mieux compte des variations de teneur en parois indigestibles dans le maïs fourrage ?** Enfin, la quantification de l'amidon dégradable dans le rumen constituant un enjeu fort pour les nouveaux systèmes d'alimentation, peut-on trouver des critères de prévision de cette fraction dans le maïs fourrage ?

Les réponses à toutes ces questions relatives à la prévision des caractéristiques digestives du maïs fourrages seront apportées par une analyse transversale des données de la thèse dans la **discussion générale**.

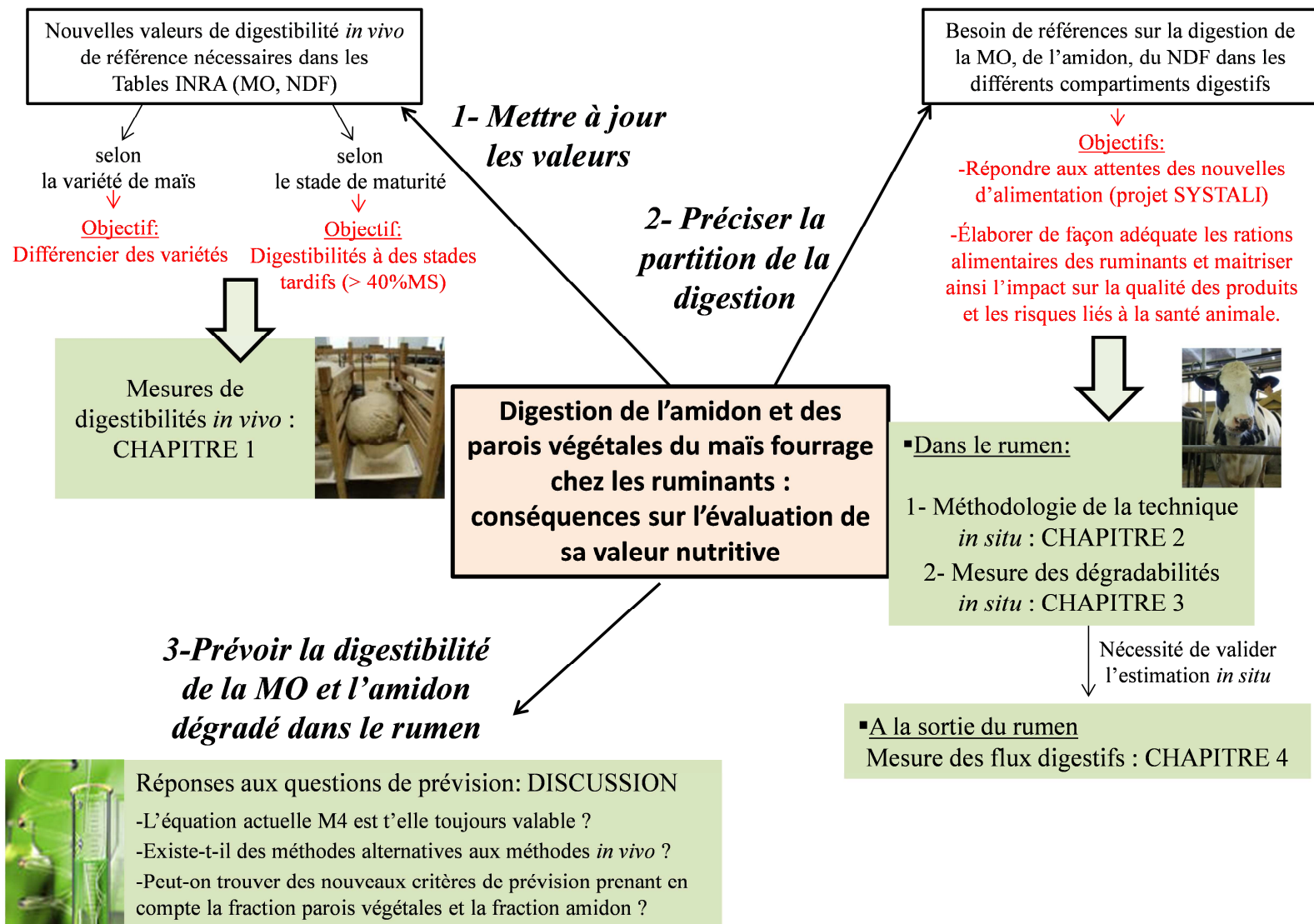


Figure 17 : Objectifs et stratégies expérimentales de la thèse

Matériel végétal de l'étude

Pour répondre aux objectifs expérimentaux de la thèse décrits précédemment, 4 variétés de maïs (notées V₁, V₂, V₃ et V₄) ont été sélectionnées dans cette thèse selon la texture du grain (corné, denté) déterminant la vitesse de dégradation de l'amidon (lente ou rapide) et selon le critère DINAG (plus ou moins élevé) défini comme la digestibilité de la fraction non amidon et non glucides solubles (Tableau 7).

Tableau 7 : Caractérisation des variétés et des stades de récolte des maïs utilisés dans les expérimentations de l'étude

<u>Variétés de maïs semées sur le site ARVALIS de la Jaillière :</u>	<u>Récoltes 2011 et 2012 à La Jaillière</u>
V1 : Variété à grain corné à corné-denté/ DINAG +	Stade 1 : 27% MS théorique
V2 : Variété à grain corné à corné-denté/ DINAG -	Stade 2 : 32% MS théorique
V3 : Variété à grain corné -denté/ DINAG +	Stade 3 : 37% MS théorique
V4 : Variété à grain denté/ DINAG -	Stade 4 : 42% MS théorique
<u>Variétés de maïs semées sur le site INRA de Crouël :</u>	<u>Récoltes 2012 à Crouël</u>
V2 : Variété à grain corné à corné-denté/ DINAG -	Stade 1 : 27% MS théorique
V3 : Variété à grain corné -denté/ DINAG +	Stade 4 : 42% MS théorique

Au total, 32 maïs (4 variétés, 4 stades de récolte, 2 années de récolte) ont été cultivés et récoltés au domaine expérimental ARVALIS- La Jaillière (La Chapelle-Saint-Sauveur, Loire-Atlantique) pour les besoins expérimentaux. Afin de disposer d'ensilages de maïs à proximité du lieu de l'expérimentation « Flux digestif » (Chapitre 4), 4 de ces maïs fourrage (2 variétés, 2 stades de récolte) ont été semés et récoltés à la station expérimentale INRA de Crouël (Clermont-Ferrand, Puy de dôme). Un effet du lieu de culture a ainsi pu être analysé.

1. Conditions climatiques pendant le cycle de développement des maïs

1.1 Maïs cultivés à la station expérimentale de La Jaillière : deux années de mesures aux conditions climatiques très contrastées

L'année 2011 s'est caractérisée par des pluies régulières pendant la période estivale maintenant ainsi le bilan hydrique positif pendant la phase critique (floraison) de besoin en

eau du maïs (Figure 18) et des températures plutôt chaudes tout au long du développement de la culture jusqu'à la maturation du grain (la somme des températures¹ relative à cette période atteint 646°C jour), ce qui a été favorable à la production d'amidon. En 2012, la pluviométrie a été plus limitée provoquant un déficit de bilan hydrique² plus important malgré l'irrigation des cultures au cours de la maturation.

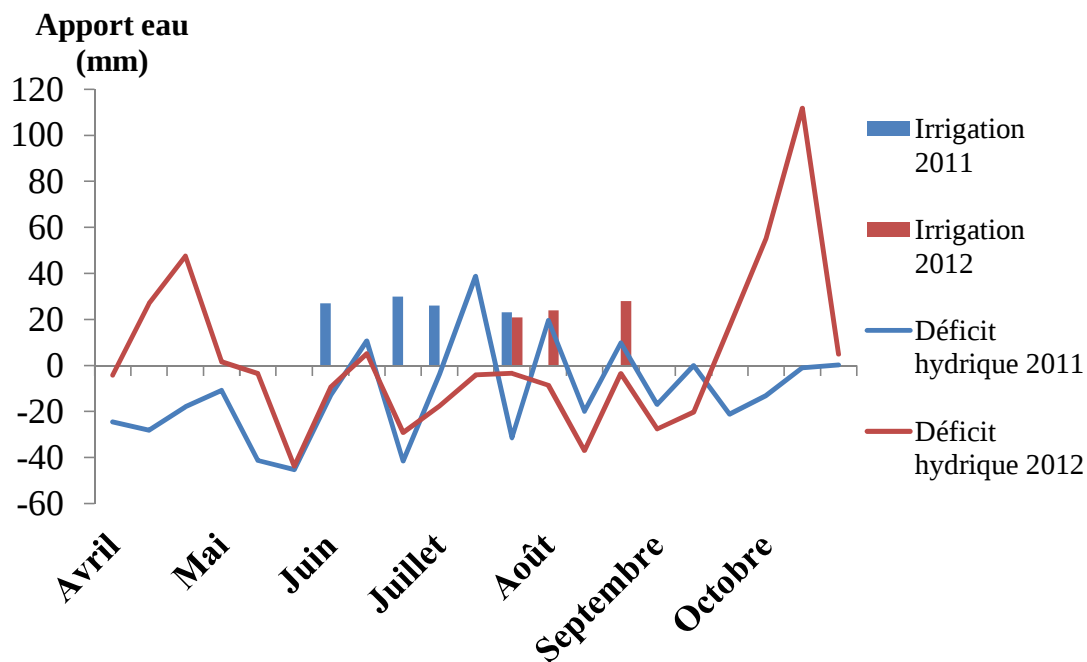


Figure 18 : Alimentation en eau des cultures de maïs en 2011 et 2012

Par rapport à 2011, les déficits de somme de température (-34°C base 6) et de lumière (-10% de rayonnement global) enregistrés entre le 15 juillet et le 31 août 2012, ont réduit la photosynthèse limitant ainsi la production de sucres et donc le stockage d'amidon dans les grains.

1.2 Maïs cultivés à la station expérimentale de Crouël : une année de mesure particulièrement chaude et sèche

Les maïs, au cours de l'année 2012 sur le site de Crouël, ont reçu un ensoleillement et des températures très élevées de la floraison jusqu'à la maturation du grain (somme des températures moyennes de 799°C). Par rapport à la médiane de la période 1982-2011, la station de Crouël a enregistré sur le cycle de culture du maïs en 2012, des records de

¹ Somme des température = $\Sigma[(T^{\circ} \text{ max} - T^{\circ} \text{ min})/2] - \text{zéro de végétation}$ (pour le maïs, zéro de végétation = 6°C)

² Bilan hydrique (mm) = Précipitations (mm) + Irrigation (mm) – Évapotranspiration (mm)

températures (plus de 140°C jours supplémentaires) alors qu'à la station de La Jaillière, la même année, les températures étaient plus basses que la médiane historique (Figure 19). Entre le 10 juillet (floraison) et le 4 septembre (date de récolte du stade 2) à Crouël, les précipitations ont été très rares. Malgré l'irrigation, les maïs ont reçu peu d'eau et les fortes chaleurs ont conduit à un assèchement de la fraction tiges-feuilles et à une déshydratation rapide des grains limitant alors leur remplissage et donc leur enrichissement en amidon.

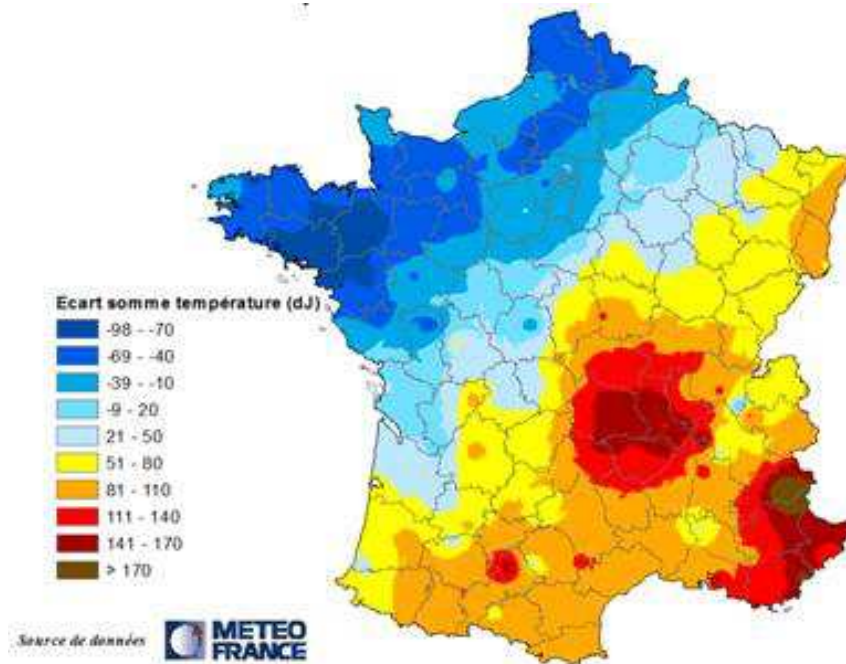


Figure 19 : Écart de sommes de températures de l'année 2012 avec la médiane (1982-2011) sur la période du 16 avril au 20 octobre

2. Caractéristiques agronomiques des maïs avant la récolte

Les 4 variétés de maïs ont été récoltées chacune à 4 stades de maturité (1, 2, 3 et 4) et les 4 variétés ont été récoltées à la même date pour chacun des stades. L'objectif était d'atteindre pour les stades 1 à 4, respectivement 27, 32, 37 et 42% de MS théorique de la plante entière (cf Tableau 7). Pour caractériser la maturité à la récolte avec d'autres critères que le pourcentage de MS de la plante entière, des mesures ont été réalisées la veille de chaque récolte. Les paramètres mesurés étaient le pourcentage d'épis dans la plante entière, la teneur en MS de la fraction épi, la teneur en MS de la fraction tiges-feuilles et leurs rendements respectifs (Tableau 8).

Tableau 8 : Caractéristiques des maïs à la récolte et après fermentation

	Stade de maturité ¹				Variété ²				Année de récolte	
	1	2	3	4	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	2011	2012
Station de la Jaillière (44)										
Teneur MS plante entière (%)	26,7	31,9	33,9	38,7	33,2	32,2	34,4	31,3	32,8	32,7
Épi/ plante entière (%)	55,3	58,7	61,6	66,7	60,2	59,7	63,2	59,2	63,3	57,9
Teneur MS de la fraction épi (%)	38,8	44,7	47,6	54,2	48,5	44,5	47,3	45,0	46,0	46,7
Teneur MS de la fraction tiges-feuilles (%)	19,5	23,0	23,0	26,3	22,2	23,4	24,7	21,6	22,0	23,9
Station de Crouël (63)										
Teneur MS plante entière (%)	30,5			47,7		38,9	39,4			36,7
Épi/ plante entière (%)	47,8			56,1		52,0	51,9			51,9
Teneur MS de la fraction épi (%)	37,3			55,9		44,9	48,2			46,6
Teneur MS de la fraction tiges-feuilles (%)	23,1			33,3		28,0	28,4			28,2

¹ Moyenne des 4 variétés

² Moyenne des 4 stades de maturité

³ Les maïs vert correspondent aux échantillons de maïs prélevés avant la mise en silo c'est-à-dire avant fermentation.

⁴ Dates de récoltes pour les maïs ensilages

La Jaillière 2011 : 24 août, 31 août, 08 septembre, 21 septembre

La Jaillière 2012 : 11 septembre, 20 septembre, 26 septembre, 24 octobre

Crouël 2012 : 14 août et 04 septembre

Ainsi, entre le stade 1 et 4, nous avons pu constater à la station expérimentale de La Jaillière, en plus de l'augmentation attendue du pourcentage de MS plante entière, une augmentation de la MS des fractions épis et tiges-feuilles et du pourcentage d'épis dans la plante entière. D'un point de vue variétal, la variété V₃ (type corné-denté), se distingue des autres par une teneur en MS plante entière, épis et tiges-feuilles plus importante ainsi qu'une proportion plus élevée d'épis dans la plante entière. L'année de récolte influe peu sur ces paramètres exceptés pour le pourcentage d'épis dans la plante entière qui est beaucoup plus important en 2011 car les conditions climatiques étaient plus favorables à la production d'épis.

Comparés aux récoltes 2012 de la station expérimentale de La Jaillière, les maïs récoltés à Crouël ont des teneurs en MS plus élevées en raison d'une part de leur forte teneur en MS des épis mais aussi suite à une dessiccation rapide de la plante sous l'effet de la chaleur.

3. Rendement et composition chimique des maïs à la récolte

Le rendement en quantité de MS des maïs de La Jaillière, augmente entre les stades de maturité 1 et 3 pour atteindre un plateau jusqu'au stade 4 (Tableau 9).

Tableau 9 : Caractéristiques des maïs avant la récolte

	Stade de maturité ¹				Variété ²				Année de récolte	
	1	2	3	4	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	2011	2012
Maïs vert										
Station de la Jaillière (44)										
Rendement (t de MS/ha)	15,5	16,4	17,3	16,8	17,4	17,2	14,9	16,4	16,8	16,2
Teneur MS plante entière (g/kg matière fraîche)	267	319	339	387	332	322	344	313	328	327
Teneur en amidon (g/kg MS)	284	323	355	387	336	307	364	344	367	308
Teneur en NDF (g/kg MS)	436	403	399	404	406	423	396	417	397	424
Teneur en MAT (g/kg MS)	74	72	70	70	71	71	72	72	76	67
Station de Crouël (63)										
Rendement (t de MS/ha)	17,9			18,1		18,1	18,1			18,1
Teneur en MS plante entière (g/kg matière fraîche)	305			477		389	394			391
Teneur en amidon (g/kg MS)	218			323		253	288			271
Teneur en NDF (g/kg MS)	438			449		453	434			444
Teneur en MAT (g/kg MS)	78			70		73	75			74
Maïs ensilés										
Station de la Jaillière (44)										
Teneur en MS plante entière (g/kg matière fraîche)	272	318	326	393	328	324	348	309	325	330
Teneur en amidon (g/kg MS)	284	326	364	419	343	314	390	346	382	314
Teneur en NDF (g/kg MS)	418	375	367	341	385	403	338	374	343	407
Teneur en MAT (g/kg MS)	79	76	75	75	76	76	76	76	82	70
Station de Crouël (63)										
Teneur en MS plante entière (g/kg matière fraîche)	305			477		389	394			367
Teneur en amidon (g/kg MS)	235			349		259	324			291
Teneur en NDF (g/kg MS)	386			353		391	348			370
Teneur en MAT (g/kg MS)	79			73		73	79			76

¹Moyenne des 4 variétés

² Moyenne des 4 stades de maturité

Le rendement entre les variétés est variable (2,5 t MS/ha entre les extrêmes) et a été en moyenne plus élevé en 2011 qu'en 2012. En effet, la faible teneur en MS de la fraction « tiges-feuilles » en 2011 a été compensée par une forte teneur en MS des épis. Avec cette plus forte proportion d'épis, les maïs récoltés en 2011 par rapport à ceux récoltés en 2012 à La Jaillière sont plus riches en amidon et inversement plus pauvres en NDF. Les températures chaudes et les pluies régulières de l'été 2011 ont également favorisé cette plus forte teneur en amidon des maïs. À Crouël, les maïs ont quant à eux, subi de très fortes chaleurs, avec un déficit hydrique significatif, ce qui explique qu'en moyenne les maïs récoltés à Crouël en 2012 soient plus pauvres en amidon que ceux récoltés la même année à La Jaillière. De plus, avec la maturité, on retrouve l'augmentation attendue de la teneur en amidon et la diminution concomitante de la teneur en NDF. Les teneurs en MAT, qui tendent à diminuer pour tous les maïs avec l'avancement de la maturité, sont globalement stables d'une variété à l'autre et d'une année sur l'autre.

Entre les maïs verts (prélevés à la mise en silo) et les maïs ensilés, des différences sont notables. Suite au processus de fermentation dans l'ensilage, une augmentation de la teneur en amidon et une diminution de la teneur en NDF s'observe, notamment au stade 4, et ce quel que soit la variété ou l'année. Peu de références sont disponibles à ce sujet, mais la diminution du NDF pourrait être due à une hydrolyse partielle des hémicelluloses au cours de la fermentation.

4. Paramètres liés à la conservation des maïs sous forme d'ensilage

Les maïs récoltés sur le site de La Jaillière en 2011 et en 2012 ont tous été conservés dans des sacs de 79 cm de haut et 15 cm de large, lesquels étaient remplis avec environ 30 kg de matière fraîche de chaque maïs (Figure 20) puis mis sous vide. Les maïs récoltés sur le site de Crouël ont été conservés dans des silos « boudins » d'environ 1,25 m de haut, 1,60 m de large et 15 m de long (Figure 21).



Figure 20: Confection des silos-sacs pour les maïs récoltés sur le site de La Jaillière



Figure 21 : Confection des silos boudins pour les maïs récoltés sur le site de Crouël

La densité à l'intérieur du silo était de 145 kg de MS/m³ pour la variété V₂ au stade de maturité 1, de 147 kg de MS/m³ pour la variété V₃ au stade de maturité 1, de 101 kg de MS/m³ pour la variété V₂ au stade de maturité 4, de 99 kg de MS/m³ pour la variété V₃ au stade de maturité 4. Les paramètres tel que le pH, les teneurs en alcools, en acides gras volatils (AGV), en acide lactique et en azote ammoniacal (N-NH₃) ont été mesurées pour connaître la qualité de conservation des ensilages. Les valeurs sont bien comprises, en référence aux valeurs de références (INRA, 2007), entre 3,7 et 3,9 pour le pH, entre 4 et 49 g/kg MS pour les alcools, entre 11 et 19 g/kg MS pour les AGV, entre 23 et 63 g/kg MS pour l'acide lactique et entre 4% et 8% pour l'azote ammoniacal (Tableau 10).

Tableau 10 : Caractéristiques fermentaires des ensilages de maïs

	Stade de maturité				Variété				Année de récolte	
	1	2	3	4	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	2011	2012
Station de la Jaillière (44)										
pH	3.8	3.7	3.7	3.9	3.8	3.8	3.8	3.7	3.7	3.9
Alcool (g/kg MS)	17.8	10.4	12.0	8.5	14.3	11.7	10.6	12.1	11.8	12.5
AGV (g/kg MS) ¹	13.2	12.4	13.0	7.1	10.7	11.6	10.6	12.8	10.1	12.8
Acide lactique (g/kg MS)	42.8	45.7	44.3	31.6	38.6	43.0	39.2	43.6	46.8	35.4
N-NH ₃ (% de N)	4.4	5.0	5.3	4.7	4.3	4.6	4.5	6.0	5.4	4.3
Station de Crouël (63)										
pH	3,7			3,8		3,7	3,7		3,7	
Alcool (g/kg MS)	7,6			4,7		3,9	8,3		6,1	
AGV (g/kg MS) ¹	11,9			8,6		10,6	10,0		10,3	
Acide lactique (g/kg MS)	44,3			36,8		41,9	39,2		40,6	
N-NH ₃ (% de N)	3,3			4,0		4,0	3,3		3,7	

¹ Les acides gras volatils (AGV) représentent la somme des 3 principaux : acétate, propionate et butyrate

Les valeurs pour le stade de maturité 4 ne peuvent pas être comparées à ces références car ces intervalles moyens, dans les Tables INRA, sont donnés pour des stades de maturité compris entre 25% et 40% de MS. Aucun problème lié à la conservation des ensilages de maïs n'a donc été décelé dans cette étude.

Chapitre 1

Influence du stade de maturité et de la variété sur la digestibilité *in vivo* de l'ensilage de maïs

(Article en préparation pour Animal)

Influence du stade de maturité et de la variété sur la digestibilité *in vivo* de l'ensilage de maïs

J. Peyrat^{a,b,c}, A. Férard^c, P. Nozière^{a,b}, A. Le Morvan^{a,b}, P.V. Protin^c, and R. Baumont^{a,b}

Résumé

L'ensilage de maïs, fourrage principal des rations des ruminants à haut niveau de production, est composé de deux fractions énergétiques : l'amidon et les parois végétales. Les proportions relatives de ces deux fractions varient fortement avec les conditions de culture, la variété et le stade de maturité de la plante à la récolte entraînant alors une grande variabilité de la nature de l'énergie apportée par l'ensilage de maïs. L'influence de ces facteurs de variation sur la digestibilité de la matière organique (MO), de l'amidon, des parois végétales (NDF) et de la matière azotée totale (MAT), a été étudiée *in vivo* chez le mouton durant 2 années. Les 32 ensilages de maïs utilisés dans cette étude étaient caractérisés par 4 variétés différant selon le type de grain (variété F1 et F2 de type corné, variété FD de type corné-denté et variété D de type denté) récoltées et ensilées à 4 stades de maturité : du stade laiteux (correspondant à une somme des températures entre le semis et la récolte de 1300 à 1400°C) au stade vitreux (correspondant à une somme des températures entre le semis et la récolte de plus de 1400°C). Avec un dispositif expérimental en carré latin répété, la digestibilité apparente des 32 ensilages de maïs a été mesurée *in vivo* à partir de la collecte des fèces de 16 moutons castrés pendant 6 jours. Les effets de la variété, du stade de maturité et de l'année de récolte ont été analysés avec la procédure MIXED de SAS. L'augmentation de la teneur en amidon du maïs ensilage s'est accompagnée d'une diminution de la teneur en NDF. La digestibilité de l'amidon était très élevée et a faiblement varié avec la progression de la maturité alors que la digestibilité du NDF a fortement diminué entre le stade laiteux et vitreux (de 551 à 434 g.kg⁻¹, P<0,01). La relative stabilité de la MO avec l'avancement de la maturité s'est expliquée par la

compensation entre l'augmentation de la quantité d'amidon digestible et la diminution de la quantité de NDF digestible. Contrairement à la digestibilité du NDF, la digestibilité de l'amidon a été significativement influencée par le type de variété : les variétés typées « grain denté » ont été associées dans cette étude à une digestibilité de l'amidon plus élevée ($P < 0,01$) que celles des variétés de type « grain corné ». Au final, cette étude montre que le choix du stade de récolte du maïs doit être bien raisonné, en prenant compte du type de variété et des conditions climatiques locales, notamment pour veiller au bon équilibre entre amidon et parois végétales digestibles dans l'ensilage de maïs distribué aux ruminants.

Influence of maturity and hybrid on *in vivo* total tract digestibility of maize silage constituents in sheep

J. Peyrat^{a,b,c}, A. Férard^c, P. Nozière^{a,b}, A. Le Morvan^{a,b}, P.V. Protin^c, and R. Baumont^{a,b}

^a INRA, UMR1213 Herbivores, Site de Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

^b Clermont Université, VetAgro Sup, UMR Herbivores, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^c ARVALIS–Institut du Végétal, Station expérimentale de la Jaillière, 44370 La Chapelle-Saint-Sauveur, France

Corresponding author:

* René Baumont, UMR 1213 Herbivores, INRA Theix, 63122 St Genès Champanelle, France

Telephone : 33 (4) 73 62 40 81

Fax :

Email : rene.baumont@clermont.inra.fr

Running head: *In vivo* digestibility of maize silage constituents

Abstract

Maize silage, commonly used in the diet of high-yielding ruminants, provides two energy fractions (starch and cell-walls or NDF). The proportion of the two energy fractions in the whole plant varies with the stage of maturity at harvest, with the type of hybrid and with climatic conditions. Therefore, the nature of energy provided by maize silage to the animal differs. This two-year study investigated the effects of stage of maturity and of hybrids on whole plant, starch, NDF and CP digestibility. Each year, four maize hybrids with different type of grain from flint to flint-dent and dent (respectively named hybrids F1, F2, FD and D) were harvested and ensiled at four maturity stages, from milk-dough stage (achieved at a sum of temperature from sowing to harvest between 1300 and 1400°C) to vitreous stage (achieved at sum of temperature higher than 1700°C). The *in vivo* apparent digestibility of the 32 maize silages was measured by total fecal collection over 6 days using 16 castrated sheep according to repeated Latin square design. The effects of hybrid, maturity stage, year of harvest were

analysed using the MIXED procedure of SAS. The increase in starch content with maturity stage was accompanied by a decrease in NDF content. Starch digestibility was very high and varied in a small range with stage of maturity whereas NDF digestibility markedly decreased between milk-dough and vitreous stage (from 551 to 434 g.kg⁻¹, P<0.01). The relative stability of organic matter digestibility (OMd) with stage of maturity was explained by the compensation between the increase in starch content of high digestibility and the concomitant decrease in NDF content and digestibility for all hybrids. Unlike NDF digestibility, starch digestibility was influenced by the hybrid: dent grain was associated with higher (P<0.01) starch digestibility than flint grain. This study showed that stage of maturity for which maize is harvested must be well-argued (taking account its interaction with hybrid and year effect) in order to insure balanced proportion of digestible starch and NDF in the maize silage fed to ruminants.

Keywords: Ruminants, maize silage, digestibility, maturity, growing conditions

Implications

Maize silage is widely used as energy source in the formulation of high-yielding ruminants' diet. Accurate evaluation of maize silage feed value is an important economic issue due to its impact on animal production and health. Agricultural practices and plant breeding have led to an increase of starch and to a decrease in cell-wall content in maize silage. The novel aspect of this study was to evaluate the *in vivo* content of digestible energy components of maize silage in relation to plant stage of maturity, type of hybrid and growing conditions.

Introduction

Maize forage takes up an important place in the high-yielding systems of production such as

dairy cows and fattening cattle. Due to its high energy value in relation to starch content, maize silage ensures large part of energy requirements for animals. However, this energy value depends on several factors, including type of hybrids (Barrière *et al.*, 1991; Harrelson *et al.*, 2008), climatic conditions (especially temperature, sunlight and water supply, Randjelovic *et al.*, 2011) and stage of maturity at harvesting (Di Marco *et al.*, 2002). From 1985 to 2000, genetic development was applied on maize plant in order to improve productivity and laying resistance (Barrière *et al.*, 2004). This genetic evolution involved changes in chemical composition of maize and, consequently, on modification on digestibility and on nature of energy available for ruminants. Otherwise, optimal harvesting for maize was advised around 320 g.kg⁻¹ of dry matter (DM) by a number of studies (Phipps *et al.*, 2000; Carpentier and Cabon, 2011) but changes in maturity stage markers lead to change in harvest of maize that are harvested at over 350 g.kg⁻¹ of DM. With the stage of maturity at harvest, the type of hybrid and climatic conditions, the proportions of the two energy fractions in the whole plant vary and so, the nature of energy provided by maize silage to the animal differs. Thus, for a better use of maize silage in ruminant's diets there is a need for a better characterisation of the digestibility of its energy fractions, and their variability with maturity stage and type of hybrid. In most of the feed evaluation systems developed for ruminant nutrition, the gold standard' to determine energy value of forages is the *in vivo* organic matter digestibility (OMd) measured in sheep (Demarquilly *et al.*, 1995). In France, extensive measurements of maize OMd were performed until the 90s (Andrieu *et al.*, 1993; Barrière *et al.*, 2004). Due to laborious and costly technique of *in vivo* methods, *in vitro* experiments are now more commonly used to estimate OMd. To the authors' knowledge, no recent studies have measured *in vivo* OMd of maize silage in sheep covering a large variability of stages of maturity and using current hybrids.

80 **Table 1**81 *Growing conditions and characteristics of maize before ensiling*

	Stage of maturity (M)				Hybrid (H)				Year of harvest (Y)	
	1	2	3	4	F ₁	F ₂	FD	D	2011	2012
Temperature sum from sowing (T _S , °C) ¹	1394	1471	1547	1740	1538	1538	1538	1538	1511	1565
Temperature sum from flowering (T _F , °C) ²	512	589	665	850	701	678	636	596	665	643
Average rainfall (mm) throughout :										
-the entire growing cycle	-	-	-	-	-	-	-	-	13	27
-the last two months of growing cycle	-	-	-	-	-	-	-	-	8	38
Dry matter of whole plant (g/kg fresh matter)	267	319	339	387	332	322	344	313	328	327
Ear/ whole plant (%)	55	59	62	67	60	60	63	59	63	58
Dry matter of ear fraction (%)	39	45	48	54	49	45	47	45	46	47
Dry matter of stem-leaf fraction (%)	20	23	23	26	22	23	25	22	22	24

82 ¹ Temperature sum from sowing to harvest (T_S) = $\sum_{\text{Sowing}}^{\text{Harvest}} \left[\frac{\text{Max } T^{\circ} - \text{Min } T^{\circ}}{2} - 6^{\circ}\text{C} \right]$ (the temperature equal to 6°C represents the vegetation zero for maize)83 ² Temperature sum from flowering to harvest (T_F) = $\sum_{\text{Flowering}}^{\text{Harvest}} \left[\frac{\text{Max } T^{\circ} - \text{Min } T^{\circ}}{2} - 6^{\circ}\text{C} \right]$ (the temperature equal to 6°C represents the vegetation zero for
84 maize)

85

86

Thus, it is important to evaluate the impact of these variation factors on the digestibility of the whole plant maize silage and its energy fractions, which determine the amount and nature of energy available for animals. The aim of this study was to assess the hybrid and maturity effects on the chemical composition and on the whole plant silage and on *in vivo* digestibility of starch, cell walls and CP. All measurements were repeated over two years with contrasting climatic conditions.

Materials and methods

The experiment was conducted in compliance with national legislation on animal care (French Ministry of Agriculture-issued Certificates of Authorization to Experiment on Living Animals, Nos. 63-30 and 63-158). The experimental protocol was approved by the Auvergne regional institutional review board for animal experimentation, under No. CE107-12.

Growing conditions of maize hybrids and silo conditioning

Four maize hybrids were chosen for the study and were grown and harvested in 2011 and 2012 at the ARVALIS–Institut du Végétal, experimental farm in north-west France (47° 27' 6.25N; 0° 57' 58.37W). These hybrids, named F₁, F₂, FD and D, were selected for their expected grain texture determining rate of starch degradation, i.e. flint to flint-dent grain (F₁ and F₂, considered “low starch availability”), flint-dent grain (FD) and dent (D, considered “high starch availability”) and differed among earliness indices (from S_A-early to S_C-late): hybrid FD was noted S_A, hybrid F₁ was noted S_B, hybrid F₂ was noted S_C, hybrid D was noted S_C). The hybrids were harvested at four stages of maturity from milk-dough stage below 300 g.kg⁻¹ of DM to vitreous stage over 400 g.kg⁻¹ of DM (Table 1). The experiment was repeated over two years, in 2011 and 2012. The year 2012 was characterized by late massive rains during grain maturation whereas 2011 recorded constant water provision from sowing to

harvest (Table 1). Irrigation was applied in 2011 and 2012 to avoid excessive water deficit: in 2011. Maturity at harvest was characterized by the sum of temperature (T°) in days-degree from sowing³ (or from flowering⁴) to harvest, whole-plant DM content, proportion of ears in the whole plant, and DM content of ear and stem-leaf fractions (Table 1). Then, maize was harvested using a precision-chop silage harvester [Class Jaguar 680 with a 4-row maize header and maize-corn cracker (3mm roll clearance); Class, Bury St., Edmonds, UK] at a stubble height of 15 to 20 cm. At harvest, 30 kg fresh matter of each of the maize silage was ensiled in polyethylene bags (790x1500mm) closed under anaerobic conditions. Before utilisation the bags were stored at ambient temperature and protected from light.

In vivo digestibility

The digestibility of 32 maize silages (four hybrids x four stages of maturity x two year of harvest) was measured on sixteen Texel whethers sheep (69 ± 7.2 kg of body weight) in individual metabolic crates as described by Demarquilly *et al.* (1995). The animals were fed at maintenance level and received daily 40 g DM/kg LW^{0.75} of maize silage in two equal meals at 0900 h and 1700 h. To ensure the rumen nitrogen balance of the diet, animals were supplemented daily with 15 g urea per day (sprinkled on the silage). Water and vitamins-mineral block were available *ad libitum*.

The 16 animals were divided in two groups of eight, respectively group 1 (G1) and group 2 (G2) and were used during the two years of measurements. Each year, the following experimental design was applied. During phase 1 (P1), the 8 animals of G1 received hybrid F₁ at four stages of maturity in a repeated 4x4 Latin squares design. Each of the four periods of the Latin square lasted 14 days with 8 days for adaptation to the maize silage and the other 6

³Temperature sum from sowing to harvest (TS) = $\sum(\text{Sowing-Harvest}) [((\text{Max T}^\circ - \text{Min T}^\circ) / 2) - 6^\circ\text{C}]$, the temperature equal to 6°C represents the vegetation zero for maize)

⁴Temperature sum from flowering to harvest (TF) = $\sum(\text{Sowing-Harvest}) [((\text{Max T}^\circ - \text{Min T}^\circ) / 2) - 6^\circ\text{C}]$, the temperature equal to 6°C represents the vegetation zero for maize)

days for digestibility measurement. During P1, G2 received hybrid F₂. The same design was repeated during phase 2 (P2) with hybrid FD for G1 and hybrid D for G2. Between P1 and P2, a digestibility measurement was achieved on all sheep (G1 and G2) with a non-experimental maize silage in order to use this measurement as a co-variable to take into account sheep effect.

During each digestibility measurement period, total faeces were collected and 25% of fresh amount per sheep was retained daily and stored at room temperature (-20°C) pending chemical analysis.

Chemical analyses

After 6 weeks to ensure even fermentation, juices from silages were sampled in order to analyse pH and fermentation products: Volatile Fatty Acid (VFA), alcohol, lactic acid and ammoniacal nitrogen (N-NH₃). According to Dulphy and Demarquilly (1981), alcohol and VFA of maize silage juice samples was analyzed by gas chromatography, NH₃-N by Conway method (1957) and Lactic acid by enzymatic method with Enzyplus® D/L-Lactic Acid kit (BioControl Systems, Inc., United States). The DM content of maize silages was determined by drying at 80°C for 48 h, and DM content of silages was corrected from losses of volatile fermentation products (Dulphy *et al.*, 1975). Silage and faeces samples (pooled by animal and period) used for determination of chemical composition were dried at 60°C for 72h, then ground through a 1 mm sieve for analysis of crude protein (CP), neutral detergent fibre (NDF) and Acid detergent fibre (ADF) and then ground through a 0.5 mm sieve for analysis of starch.

Starch content was determined by enzymatic method (ISO 15914:2004). NDF and ADF content were determined according to Van Soest and Wine (1967) using an Ankom system (Ankom® Tech. Co., Fairport, NY). For NDF determination a heat-stable amylase was used

without addition of sodium sulphite. ADF residues were obtained after boiling with ADF reagent and were expressed with residual ash. The CP (N x 6.25) content was determined using Elementar Rapid N Cube (Elementar France 5, Place Charles Béraudier 69428 Lyon Cedex 03, France) based on ISO (2008) method 16634-1.

Data analyses

The apparent digestibility (d), of a chemical component i, with i = OM (OMd), NDF (NDFd), ADF (ADFd), Hemicellulose (Hemd), Starch (STd) or CP (CPd) was calculated as:

$$\text{Apparent digestibility of } i \text{ (\%)} = \left[\frac{(\text{intake } i - \text{faecal } i)}{\text{intake } i} \right] \times 100$$

Where intake i and faecal i are equal to the daily intake and faecal excretion of the chemical component i (kg per day).

The content of apparently digestible (D) component i, with i =OM (DOM), NDF (DNDF), ADF (DADF), Hemicellulose (DHem), Starch (DST) and CP (DCP) was calculated as:

$$\begin{aligned} &\text{Apparently digestible } i \text{ (g.kg}^{-1}\text{DM)} \\ &= \text{Apparent digestibility of } i \text{ (\%)} \times \text{dietary content of } i \text{ (g.kg}^{-1}\text{ DM)} / 100 \end{aligned}$$

In the calculation of CPd and DCP, CP intake did not include urea supplementation, so that CPd and DCP concern the silage per-se in non-limiting conditions of available N in the rumen (Demarquilly *et al.*, 1995).

Statistical analyses

Normality of all data distribution was verified using the UNIVARIATE procedure of SAS (9.3 version, 2002). The chemical composition of silages, *in vivo* digestibility and digestible

Table 2

Effect of maturity, hybrid, year of harvest and theirs interactions on chemical composition of the maize (g.kg⁻¹ DM, except for DM expressed in g.kg⁻¹ of fresh matter)

	Stage of maturity (M)				Hybrid (H)				Year of harvest (Y)		RSD	Significance						
	1	2	3	4	F ₁	F ₂	FD	D	2011	2012		M	H	Y	M*H	M*Y	H*Y	M*H*Y
DM	283 ^a	328 ^b	337 ^b	407 ^c	339 ^a	330 ^{ab}	362 ^c	324 ^b	333 ^a	345 ^b	13.4	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05	0.40
OM	933 ^a	942 ^b	941 ^b	953 ^c	943 ^a	941 ^b	946 ^c	940 ^d	945 ^a	940 ^b	1.3	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
NDF	405 ^a	366 ^b	357 ^b	336 ^c	375 ^a	393 ^b	331 ^c	364 ^a	335 ^a	397 ^b	19.9	<0.01	<0.01	<0.01	0.68	0.84	<0.01	0.16
ADF	214 ^a	192 ^b	188 ^b	174 ^c	197 ^a	210 ^b	169 ^c	194 ^a	170 ^a	215 ^b	11.3	<0.01	<0.01	<0.01	0.72	0.45	<0.01	0.12
Hemicellulose ¹ (% of NDF)	47.0 ^a	47.6 ^a	47.6 ^a	48.5 ^b	47.6 ^a	46.9 ^a	49.2 ^b	46.9 ^a	49.4 ^a	45.9 ^b	1.05	<0.01	<0.01	<0.01	0.82	<0.01	<0.01	0.49
Starch	276 ^a	320 ^b	355 ^c	414 ^d	334 ^a	307 ^b	382 ^c	341 ^a	376 ^a	305 ^b	24.9	<0.01	<0.01	<0.01	0.72	<0.01	<0.01	0.95
CP	76 ^a	74 ^b	73 ^c	74 ^{bc}	74	74	74	74	80 ^a	69 ^b	1.4	<0.01	0.94	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

For each effect (M, H, or Y) means, within a row, with different subscripts differ significantly at $P < 0.05$ (Tukey-Kramer Test)

¹ Hemicellulose = (NDF-ADF)/NDF

content data were analysed using the MIXED procedure of SAS with animal included as a random effect. The fixed effects in the model were phase, period nested within phase, maturity (M), hybrid (H) nested within phase, year of harvest (Y) and their interactions (M*H, M*Y, H*Y, M*H*Y). *In vivo* digestibility and digestible content measured with the common silage between P1 and P2 was included as a covariate. Significant differences were set at $P < 0.05$ from Tukey-Kramer test.

Results

Chemical composition of the maize silages

According to reference of INRA (2007), fermentation characteristics revealed a good conservation of the maize silages: pH ranged between 3.7 ± 0.1 for the second stage of maturity to 3.9 ± 0.2 for the fourth stage of maturity. The content in N-NH₃ did not exceed 5.3 ± 1.8 measured for the third stage of maturity. The content in alcohols, VFA and lactic acid decreased from 17.8 ± 9.9 , 13.2 ± 2.4 and $42.8 \pm 9.4 \text{ g.kg}^{-1}$ DM respectively for the first stage of maturity to 8.5 ± 6.4 , 7.1 ± 1.9 and $31.6 \pm 8.9 \text{ g.kg}^{-1}$ DM respectively for the fourth stage of maturity. No marked variation in fermentation characteristics between hybrids and year of measurement were observed.

Maturity (M), hybrid (H) and year of harvest (Y) had significant effects on DM, OM, NDF, ADF, hemicellulose (% of NDF), starch and CP contents (except for hybrid effect on CP content, Table 2). Starch content increased from 276 to 414 g.kg^{-1} of DM with maturity stage whereas NDF and ADF contents decreased from 405 to 336 g.kg^{-1} of DM and from 214 to 174 g.kg^{-1} of DM, respectively. The proportion of hemicellulose in the total NDF content increase with advancing maturity from 47.0% to 48.5% of NDF. The CP content slightly decreased with stage of maturity from 76 to 74 g.kg^{-1} of DM. Hybrid FD was slightly higher in DM and OM content than hybrid F₁, followed by hybrid F₂ and hybrid D with the lowest

values ($P<0.01$). Hybrid FD was also richer ($P<0.01$) in starch than hybrids F_1 and D (both equivalent, $P=0.79$) and then, than hybrid F_2 (382, 341, 334 and 307 g.kg⁻¹ of DM, respectively). Conversely, NDF and ADF content was lowest for hybrid FD, followed by hybrid F_1 and D (both equivalent, $P=0.07$), and was highest for hybrid F_2 ($P<0.01$). The proportion of hemicellulose in the NDF fraction is higher for hybrid FD than the other hybrids (all equivalents, $P>0.05$). The DM, NDF and ADF contents were higher in 2012 than in 2011 ($P<0.01$). The contents in OM, starch and CP and the proportion of hemicellulose in NDF showed the opposite trend with higher values in 2011 than in 2012.

There were interactions among maturity and hybrid effects ($M \times H$) on DM, OM and CP contents, interactions among maturity and year effects ($M \times Y$) on DM, OM and starch contents and on proportion of hemicellulose, interactions among hybrid and year effects ($H \times Y$) for all the components, and interactions among maturity, hybrid and year effects ($M \times H \times Y$) on OM and CP contents. For each hybrid and for both years, DM content increased at least by 70 g.kg⁻¹ of DM between first and last stage of maturity (Figure 1a).

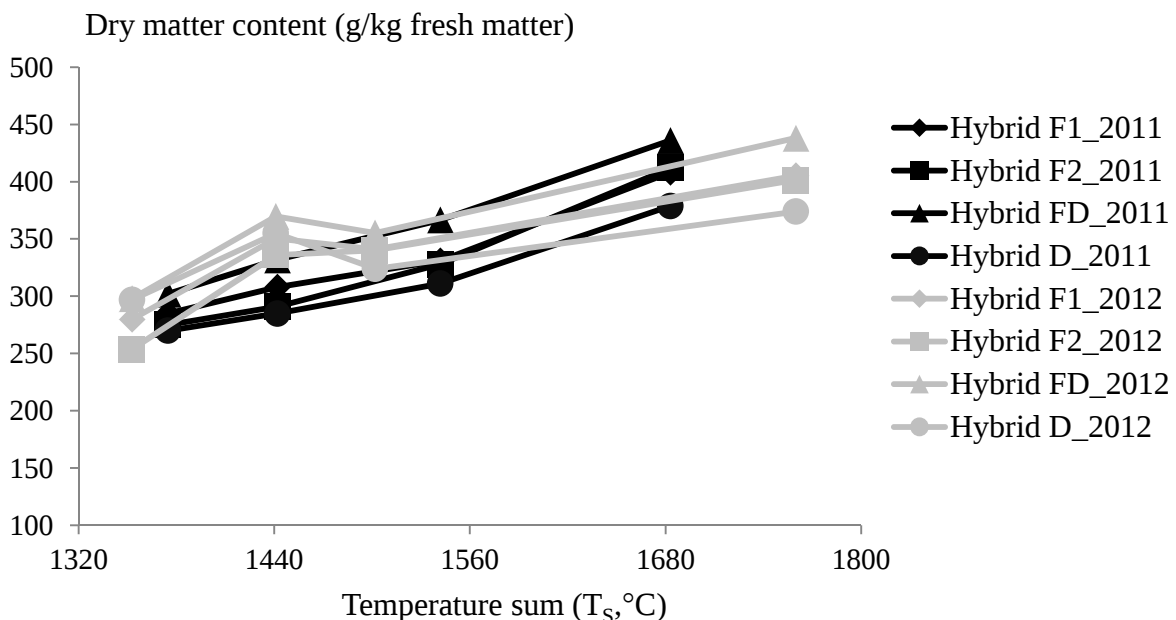


Figure 1a: Effect of stage of maturity and hybrid, over two years, on the content of dry matter

The increase in starch content between first and last stage of maturity was higher ($P<0.01$) in 2012 than in 2011 (on average +175 and + 100 g.kg^{-1} of DM respectively, Figure 1b). The NDF content was higher ($P<0.01$, Figure 1c) whereas starch content was lower ($P<0.01$, Figure 1c) in 2012 than in 2011.

Starch content (g/kg DM)

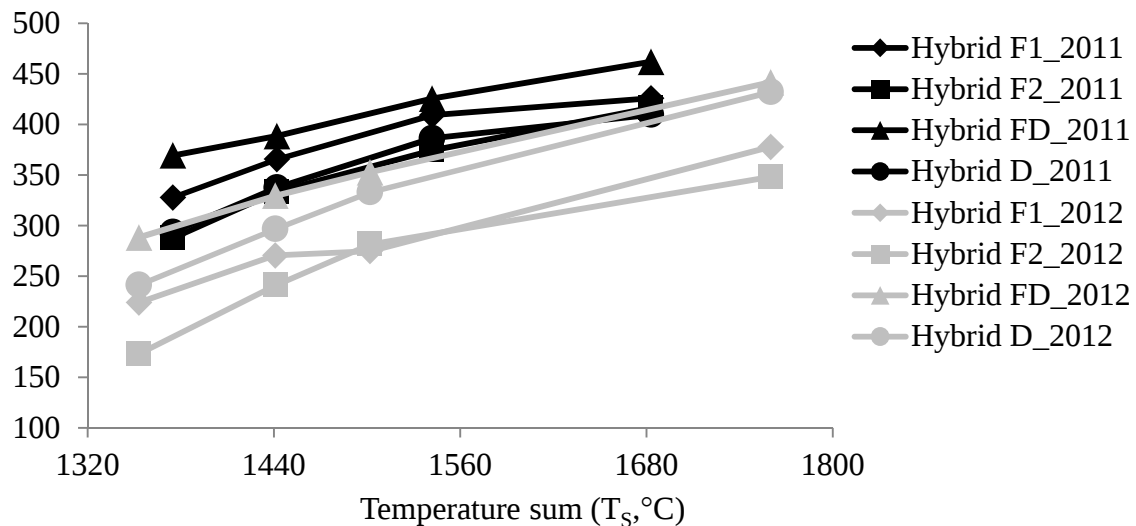


Figure 1b: Effect of stage of maturity and hybrid, over two years, on the content of starch

NDF content (g/kg DM)

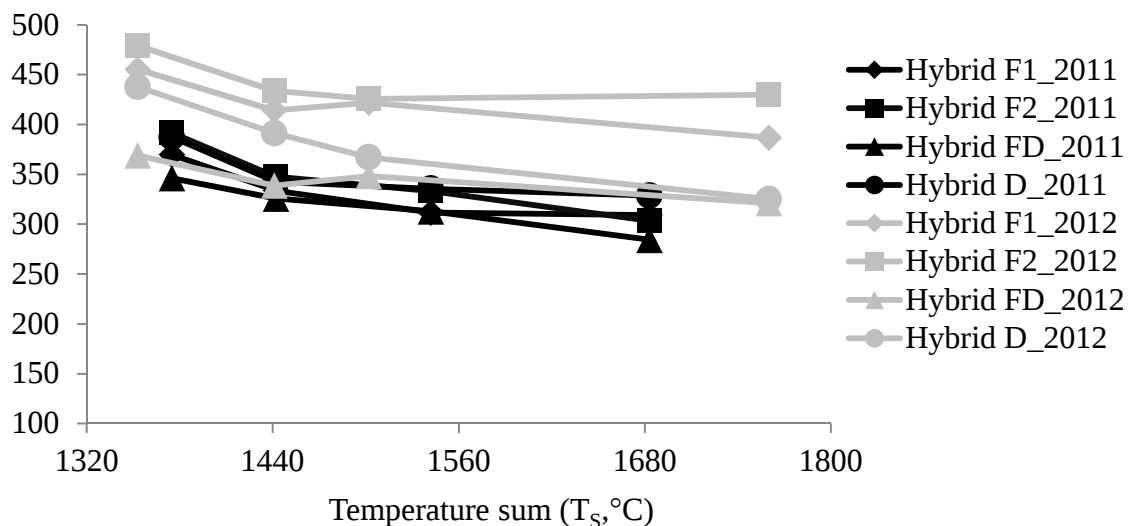


Figure 1c: Effect of stage of maturity and hybrid, over two years, on the content of NDF

Table 3Effect of maturity, hybrid, year of harvest and theirs interactions on *in vivo* digestibility of the maize silage (%)

	Stage of maturity (M)				Hybrid (H)				Year of harvest (Y)		RSD	Significance						
	1	2	3	4	F ₁	F ₂	FD	D	2011	2012		M	H	Y	M*H	M*Y	H*Y	M*H*Y
OM	72.5 ^a	73.6 ^b	73.4 ^b	72.2 ^a	72.3 ^a	71.9 ^a	74.7 ^b	72.8 ^a	74.4 ^a	71.5 ^b	2.33	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05	<0.05	<0.01	0.10
NDF	55.1 ^a	51.5 ^b	50.0 ^b	43.4 ^c	50.4	51.1	49.7	48.7	51.4 ^a	48.6 ^b	5.37	<0.01	0.51	<0.01	0.61	<0.05	0.21	<0.01
ADF	55.4 ^a	52.1 ^b	50.3 ^b	43.3 ^c	51.8	51.2	50.5	47.6	52.1 ^a	48.5 ^b	5.50	<0.01	0.18	<0.01	0.40	<0.01	0.14	<0.01
Hemicellulose	54.7 ^a	50.8 ^b	49.8 ^b	43.4 ^c	48.9	51.1	49.0	49.8	50.7 ^a	48.7 ^b	5.59	<0.01	0.21	<0.05	0.67	<0.05	0.24	<0.05
Starch	98.9 ^a	98.7 ^b	98.8 ^a	99.4 ^c	98.4 ^a	99.0 ^b	98.9 ^c	99.6 ^d	98.8 ^a	99.2 ^b	0.14	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
CP	49.2 ^a	48.6 ^a	47.5 ^{ab}	45.5 ^b	46.9	48.2	47.1	48.5	52.3 ^a	43.1 ^b	4.89	<0.01	0.54	<0.01	0.20	<0.05	<0.01	<0.05

For each effect (M, H, or Y) means, within a row, with different subscripts differ significantly at $P < 0.05$ (Tukey-Kramer Test)

In vivo apparent digestibility of maize silage constituents

The effect of maturity (M) and year of harvest (Y) was significant for OM, NDF, ADF, starch and CP apparent digestibility (Table 3).

The effect of hybrid (H) was only significant for OM and starch digestibility. The OMd increased slightly between first, second and third stages of maturity (72.5, 73.6 and 73.4 % of DM) and then decreased to 72.2 % of DM at stage of maturity 4. In contrast, NDFd, ADFd and Hemd sharply decreased with stage of maturity from 55.1 to 43.4 %, from 55.4 to 43.3 % and from 54.7% to 43.4%, respectively. The STd was constantly high but increased significantly from 98.9 to 99.4 % with stage of maturity. The CPd decreased slightly with stage of maturity from 49.2 to 45.5 %. Hybrid FD had higher ($P<0.01$) OMd than the others hybrids F_1 , F_2 and D (all equivalents, $P>0.05$). The STd of hybrid D was significantly higher than hybrid F_2 , followed by hybrid FD and was lower for hybrid F_1 . All digestibility criteria were significantly higher in 2011 than in 2012 ($P<0.01$) except for STd, that was lower in 2011 than in 2012 ($P<0.01$).

There were interactions between maturity and hybrid effects ($M\times H$) on OMd and STd, interactions between maturity and year effects ($M\times Y$) on all digestibility criteria, interactions between hybrid and year effects ($H\times Y$) on OMd, STd and CPd and interactions between maturity, hybrid and year effects ($M\times H\times Y$) on NDFd, ADFd, STd, CPd. The effect of hybrid on OMd was more marked in 2012 than in 2011 (Figure 2a): OMd of hybrid FD was higher than that of the three others hybrids in 2012 ($P<0.01$) but not in 2011 ($P>0.05$).

Organic Matter digestibility (OMd, %)

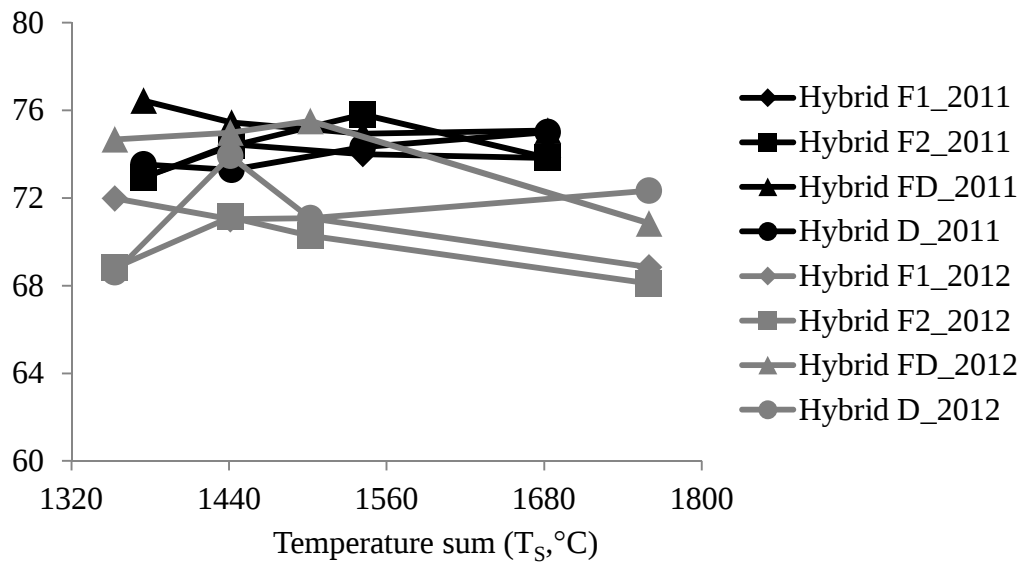


Figure 2a: Effect of stage of maturity and hybrid, over two years, on the digestibility of organic matter (OMd)

For each hybrid, the decrease of NDFd between first and last stage of maturity was greater in 2012 than in 2011 with a mean decrease of 13.0 % and 8.0 %, respectively (Figure 2b).

NDF digestibility (NDFd, %)

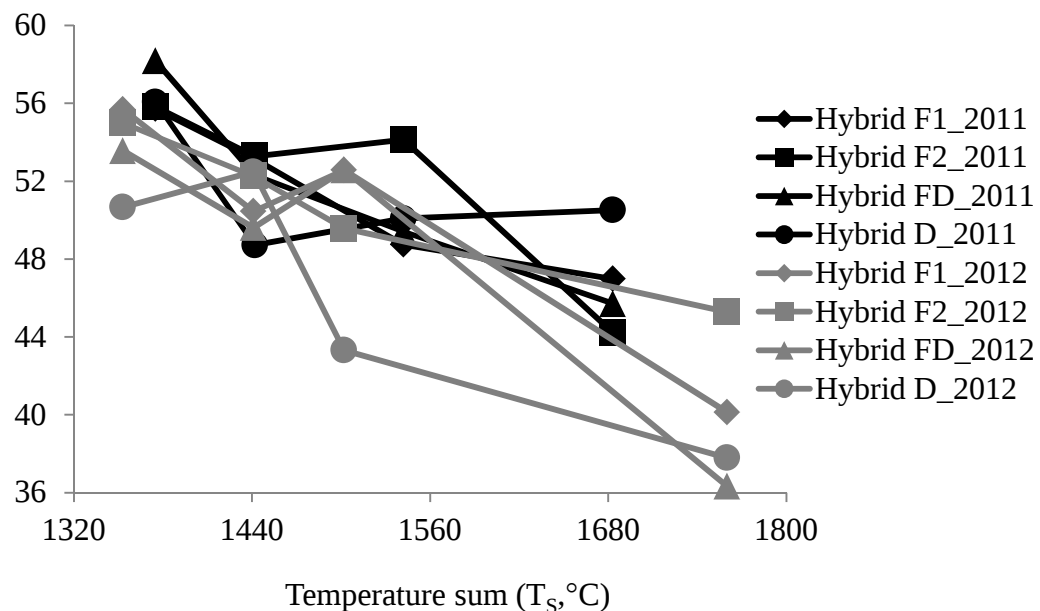


Figure 2b: Effect of stage of maturity and hybrid, over two years, on the digestibility of NDF (NDFd)

324 **Table 4**325 Effect of maturity, hybrid, year of harvest and theirs interactions on content of digestible constituents (g.kg⁻¹ of DM)

	Stage of maturity (M)				Hybrid (H)				Year of harvest (Y)		RSD	Significance						
	1	2	3	4	F ₁	F ₂	FD	D	2011	2012		M	H	Y	M*H	M*Y	H*Y	M*H*Y
OM	677 ^a	693 ^b	691 ^b	690 ^b	683 ^a	676 ^a	710 ^b	682 ^a	695 ^a	681 ^b	21.5	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05	0.08	<0.01	<0.05
NDF	223 ^a	189 ^b	180 ^b	146 ^c	192 ^a	201 ^a	167 ^b	178 ^c	182	186	26.0	<0.01	<0.05	0.56	0.76	<0.05	<0.01	<0.01
ADF	119 ^a	100 ^b	95 ^b	75 ^c	104	108	86	92	95	100	14.2	<0.01	0.14	0.30	0.57	<0.05	<0.01	<0.01
Hemicellulose	104 ^a	89 ^b	85 ^b	71 ^c	88 ^a	93 ^a	81 ^b	86 ^c	87	86	13.4	<0.01	<0.05	0.72	0.81	0.07	<0.05	<0.05
Starch	272 ^a	316 ^b	350 ^c	414 ^d	329 ^a	304 ^b	380 ^c	339 ^a	372 ^a	305 ^b	25.0	<0.01	<0.01	<0.01	0.19	<0.01	<0.01	0.35
CP	38 ^a	36 ^{ab}	35 ^{bc}	34 ^c	35	36	35	36	44 ^a	28 ^b	3.7	<0.01	0.82	<0.01	0.31	0.06	<0.01	<0.01
Σ(Digestible constituents)	535 ^a	542 ^{ab}	567 ^b	595 ^b	555 ^a	546 ^a	581 ^b	556 ^a	598 ^a	519 ^b	26.3	<0.01	<0.01	<0.01	0.21	<0.01	<0.05	<0.05

326 For each effect (M, H, or Y) means, within a row, with different subscripts differ significantly at $P<0.05$ (Tukey-Kramer Test)

Hybrid F₁ showed a more marked increase of STd with stage of maturity in 2011 than in 2012 (P<0.01, Figure 2c).

Starch digestibility (STd, %)

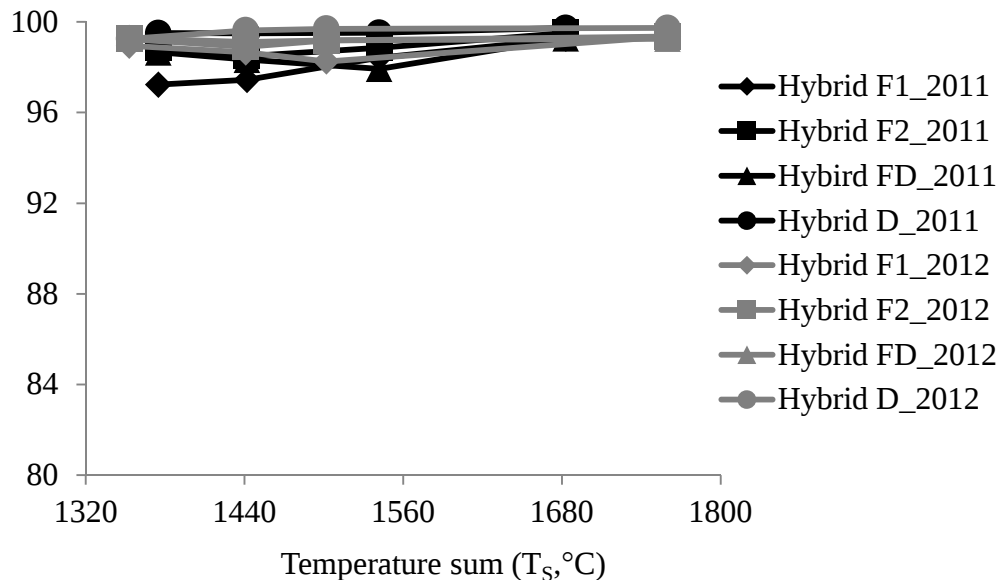


Figure 2c: Effect of stage of maturity and hybrid, over two years, on the digestibility of starch (STd)

Content of digestible constituents

The effect of maturity (M) was significant on the content of all digestible constituents. The effect of hybrid (H) was significant on DOM, DNDF, DHem and DST and the effect of year (Y) was only significant on DOM, DST and DCP (Table 4). With stage of maturity, DOM and DCP contents increased respectively from 677 to 690 g.kg⁻¹ of DM and decreased from 38 to 34 g.kg⁻¹ of DM. The effect of stage of maturity was more marked on DNDF, DADF, DHem and DST contents: DNDF, DADF, DHem content strongly decreased from 223 to 146 g.kg⁻¹ of DM, from 119 to 75 g.kg⁻¹ of DM, and from 104 g.kg⁻¹ to 71 g.kg⁻¹ of DM respectively, whereas DST content sharply increased from 272 to 414 g.kg⁻¹ of DM. The DOM content of hybrid FD was higher (P<0.01) than that of the others hybrids (all equivalents, P>0.05). The DNDF and DHem content was higher for hybrid F₁ and hybrid F₂ (both equivalents, P>0.05)

than for hybrid D ($P<0.01$), and was the lowest for hybrid FD ($P<0.01$). Conversely, DST content was higher for hybrid FD than for hybrids D and F_1 (both equivalent, $P=0.16$), and was lowest for hybrid F_2 ($P<0.01$). Finally, DOM, DST and DCP contents were higher in 2011 than in 2012 (respectively $P<0.05$, $P<0.01$ and $P<0.01$).

There were interactions among maturity and hybrid ($M \times H$) effects on DOM content; among maturity and year ($M \times Y$) effects on DNDF, DADF and DST contents; among hybrid and year ($H \times Y$) effects on all digestible constituent contents, and among maturity, hybrid and year effects ($M \times H \times Y$) effects on DOM, DNDF, DADF, DHem and DCP contents. For every hybrid, DOM did not vary ($P>0.05$) with stage of maturity except in 2012, when DOM for hybrid F_1 increased significantly between stage 1 and stage 2, decreased significantly between stage 2 and stage 3, then tended to increase ($P=0.07$) between stage 3 and stage 4 (Figure 3a).

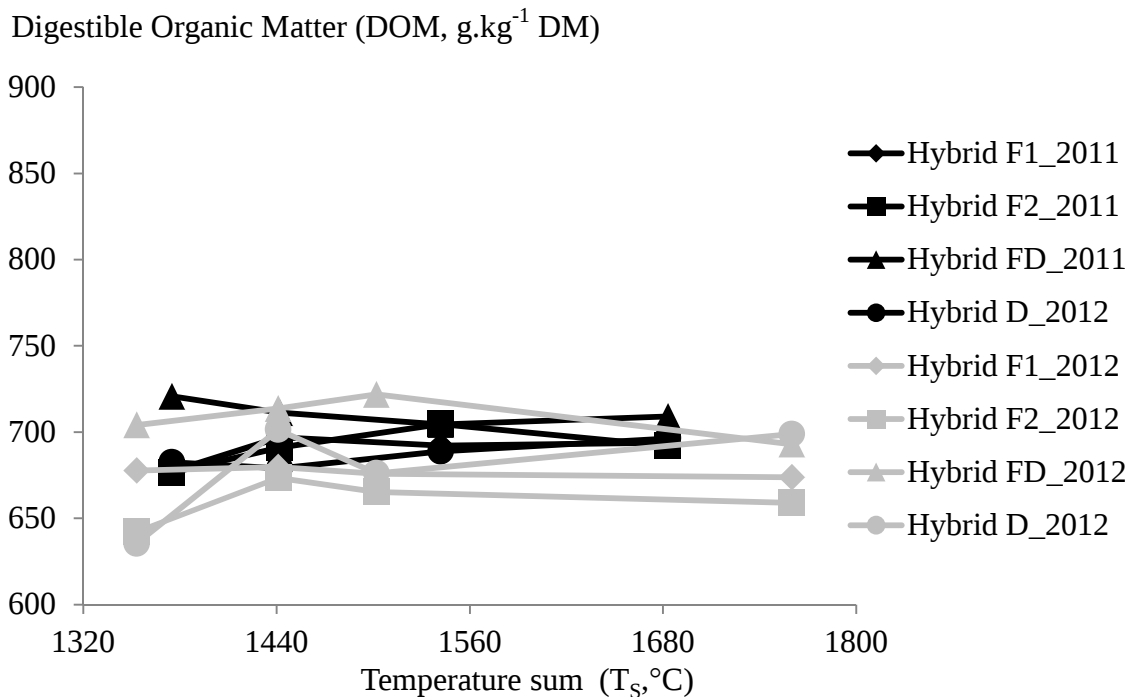


Figure 3a: Effect of stage of maturity and hybrid, over two years, on the content of digestible organic matter (DOM)

For both years, DNDF decreased significantly between first and last stage of maturity except for hybrid D in 2011 which had constant ($P>0.05$) DNDF with stage of maturity (Figure 3b).

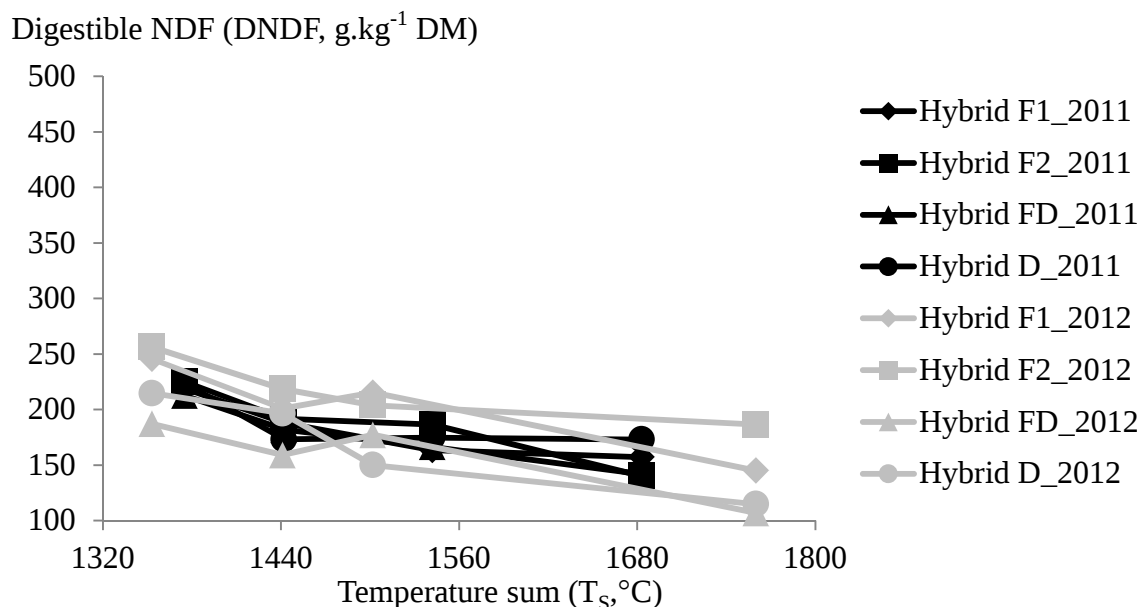


Figure 3b: Effect of stage of maturity and hybrid, over two years, on the content of digestible NDF (DNDF)

For each hybrid, increase of DST content with maturity was greater in 2012 than in 2011 (respectively +175 and +100 g.kg⁻¹ of DM, Figure 3c).

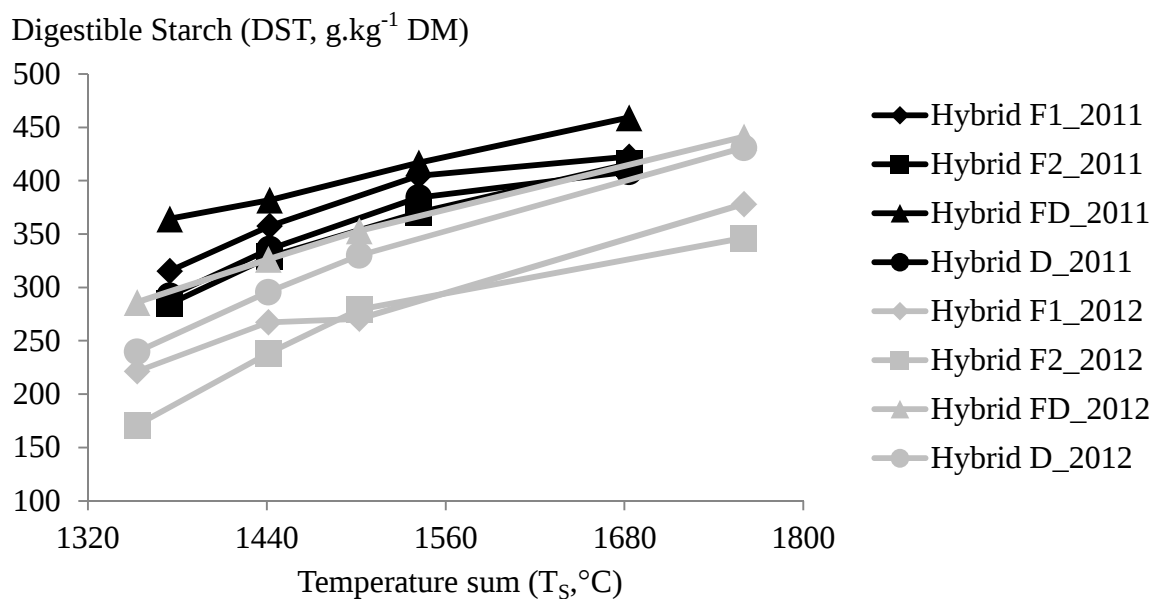


Figure 3c: Effect of stage of maturity and hybrid, over two years, on the content of digestible starch (DST)

Discussion

The effect of maturity was studied over a large range of variation as DM content varied from 283 to 407 g DM/ kg fresh matter (equivalent as 1394 to 1740 degree days between sowing and harvesting date) and starch content from 276 to 414 g.kg⁻¹ DM. Studies of maize silage with DM content higher than 350 g.kg⁻¹ are relatively rare in the literature (Andrieu *et al.*, 1993; Phipps *et al.*, 2000) although such harvesting condition may become more frequent in relation to climate change. The interest of this study lies also in simultaneous *in vivo* quantification of the different digestible maize constituents whereas recent available studies *in vivo* were limited to the whole plant DM or OM (Barrière *et al.*, 2004). Few studies have investigated cell wall digestibility (Di Marco *et al.*, 2002).

Chemical composition

There was an increase in starch content and a decrease in NDF and ADF contents from the first to the last stage of maturity in agreement with INRA (2007) and Khan *et al.* (2014). The large increase of starch was mainly due to the increase in the proportion of grain in the maize plants during whole plant maturation and especially at filling grain period. This change in starch and cell wall constituents was accompanied by a slight decrease in CP content, as also reported by Michalet-Doreau *et al.* (2004). The proportion of hemicellulose in the NDF fraction increase with advancing maturity stage as it showed by Andrieu *et al.* (1993). In our work, hybrids differed among starch and NDF content. This result is mainly due to the difference in earliness of hybrids. Indeed, at the same date of harvest, hybrid FD show early maturity indice (S_A) than that of hybrid F₂ (S_B), F₁ (S_B) and D (S_C), that explained the highest grain filling and highest starch content of hybrid FD.

431 *The starch fraction*

432 Although starch content varied considerably according stage of maturity, hybrids and year of
 433 harvest, *in vivo* starch digestibility (STd) was constantly very high (on average STd= 99.0 %)
 434 with a very low range of variation (from 96.9 % to 99.8 %). Thus, the variation in digestible
 435 starch content (DST) reflected mostly the variation in starch content of maize silage.

436 Indeed, with highest starch content but lowest STd, hybrid FD had the highest DST whereas
 437 hybrid F2, with lowest starch content and a high level of STd, had the lowest DST. Starch
 438 digestibility was the highest for hybrid D, that was characterized by dent grain and low starch
 439 content. One hypothesis to explain variations of STd is the type of endosperm. Indeed, Pereira
 440 et al. (2004) showed *in situ*, that flint grain, rich in vitreous endosperm, has higher starch 24h-
 441 degradation in the rumen than dent grain with low amount of vitreous endosperm. The
 442 increasing resistance to degradation with vitreous endosperm of grain was characterized by
 443 increasing hardness (physical barrier) and increasing concentration of insoluble zein protein
 444 (chemical barrier) in the protein matrix that encapsules starch granules in the endosperm,
 445 therefore limiting microbial access to starch (Philippeau et al., 2000).

446 The starch and the digestible starch content also varied with the year of harvest:, starch
 447 content was higher in 2011 than in 2012, especially due to a higher proportion of ears in the
 448 whole plant. Maize needs temperature and rainfall before and after flowering to grow and
 449 produce ears and store starch (Carpentier and Cabon 2011). Water deficit has also an
 450 important impact on starch accumulation. Randjelovic et al. (2011) showed that a cold and
 451 rainy season provided maize richer in starch than a hot season with a water deficit. Therefore,
 452 late rains during grain filling in 2012 could explain lower starch content compared to 2011..
 453 O'Neill et al. (2004) also reported that plant become very sensitive to hydric and nitrogen
 454 stress, three weeks after flowering, and this could explain lower starch and CP content in 2012.

Finally, although in vivo starch digestibility increased slightly with maturity, as shown also in vitro by Opsi et al. (2013), digestible starch content varied mainly with the accumulation of starch during grain filling and the maize maturation. Difference in DST content between first and last stage of maturity reached 142 g.kg⁻¹ of DM whereas differences between hybrids and year of harvest did not exceed 76 and 67 g.kg⁻¹ of DM, respectively. This highlights the fundamental role of stage of maturity at harvest on the nature of nutrients supplied to the ruminant animal by maize silage. Further evaluation of the site of starch digestion needs in vivo duodenal flow measurements, as well as measurements of ruminal degradability (Philippeau and Michalet-Doreau, 1997; Peyrat et al. 2014) and intestinal digestibility (Ali et al., 2012).

The cell-wall fraction

Cell-wall digestibility was much lower than starch (on average 50.0 and 50.3 % for NDF and ADF respectively) and was more variable (between 43.4 and 55.1%, and between 43.3 and 55.4% for NDF and ADF respectively). Thus, the content of digestible cell-wall (DNDF and DADF) reflected both variation in cell-wall content and digestibility.

As hybrid had no significant effect on NDF digestibility, the highest value of DNDF for hybrid F1 and F2, was only explained by high NDF content in these hybrids. Year effects were observed for all hybrids as reported by Andrieu et al. (1993). The variation in DNDF among year is especially explained by variability of NDF content, which is significantly influenced by temperature and sunlight. Indeed, the model established by Kruse et al. (2008) found a change in cell wall content with temperature and radiation, whereas water availability had negligible effects. As reported by Cox et al (1994) and Kruse et al (2008), high temperature increases degree of lignification, which was negatively correlated with in vitro digestibility of NDF. The higher sum of temperature from sowing to harvest in the year 2012

compared to the year 2011 could explain why growing season of 2012 provided lower NDF. According to Di Marco et al. (2002), climate may also affect the complex structure of the cell wall, which influences the magnitude of microbial attack and the rate of passage through the digestive tract. Therefore, higher temperature and late rains of the year 2012, may have induced physiological changes in stem-leaf structure and could explained lower NDFd. Maturity stage had the major effect on NDF content and cell wall digestibility. During the second phase of grain filling, photosynthesis becomes less active than during the first phase, and starch accumulation happens to the detriment of stem-leaf fraction. During this second phase, the plant becomes dry causing a decrease in CP content (Fabijanac et al., 2006) and lignification of fibre further decreases NDF digestibility (Cox et al., 1994). Lignin fraction could explain this decrease of NDF with stage of maturity, because lignin is undegradable in the anaerobic environment of the rumen and represents a large part of NDF at late stages of maturity (Kruse et al., 2008). Barrière and Emile (2000) also showed that spatial repartition of lignin in the stem-leaf fraction and link established between lignin and hemicellulose limited digestibility of NDF at late stage of maturity. In this study, the decrease in hemicellulose with advancing maturity could be therefore explained by close link between lignin and hemicellulose at last stage of maturity. Thus, interactions between chemical composition and digestibility of starch and NDF explain differences in content of digestible OM. Indeed, the relative stability of DOM content with stage of maturity was explained by the compensation between the increase in digestible starch content and the concomitant decrease in digestible NDF content in agreement with others studies (Bal et al., 1997; Phipps et al., 2000). The variability in OM digestibility was, in fact, mainly explained by the variations in the content of non-digestible NDF (NDFnd) in this study ($R^2=96.4$, $ETR=0.49$; Figure 4) as reported by Andrieu et al (1993).

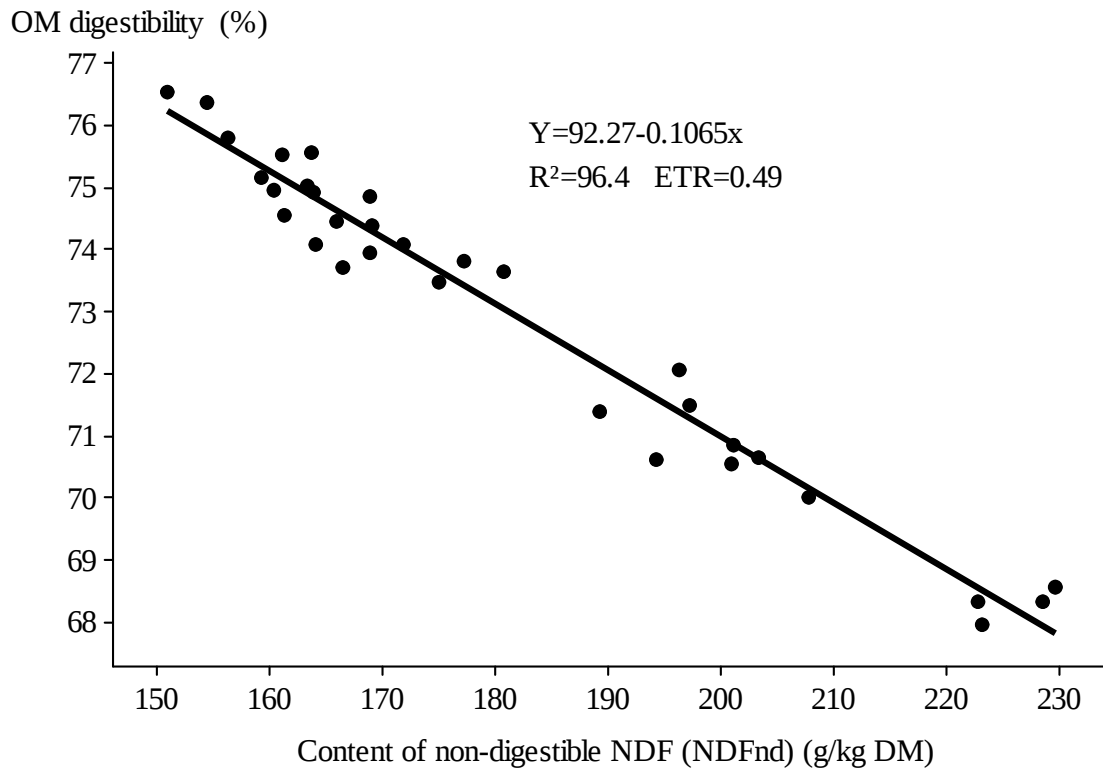


Figure 4: Relation between the digestibility of OM (OMd) and the content of non-digestible NDF (NDFnd)

The CP fraction

In agreement with INRA (2007) and Khan et al. (2014), the digestibility of CP decreased significantly and slightly from 49% to 46% with advancing maturity. This decrease could be related to the increase of insoluble protein (zein and glutelin) in the grain fraction of maize as maturity progresses (Michalet-Doreau et al, 2004). Low variations in CP content combined with the slight decrease in digestibility of CP with increasing maturity result in small variations in the content of digestible CP (from 38g.kg-1 to 34 g.kg-1 of DM). True digestibility of crude protein is altered by heat treatments (Weiss et al, 1992), therefore higher temperatures of the year 2012 during the growing cycle of maize could have led to lower digestibility of CP in 2012 than in 2011.

The whole plant OM

In agreement with previous studies (Kruse et al., 2002; Barrière et al., 2004), the effect of hybrid, growing conditions of plant (expressed in this study by the year of harvest) and their interactions have an important impact on chemical composition of maize plant but also on its digestibility and on the digestible OM content in the whole plant. On average, OM digestibility of hybrid FD was significantly higher than those of hybrids F1, F2 and D. The significantly higher OM digestibility of hybrid FD can be related to its higher starch content due to a higher proportion of ears in the whole plant. However, this effect was observed only in 2012 (in 2011 there was less variation between hybrids). The atypical conditions encountered in 2012 (late rain during maize growing) could explain high variability between hybrids compared to 2011, suggesting that some hybrids could be more climate-sensitive. According to Barrière and Emile (2000), higher water availability during grain filling (as in 2011 in this study) provided higher starch content, and higher OM digestibility of the whole plant. These results are also in agreement with O'Neill et al. (2004) and Kruse et al. (2008) who showed that, in extreme environmental conditions, maize may adapt their capacity to maintain photosynthesis efficiency in order to preserve regular growth and development of plant.

The advance in stage of maturity led to an important increase of starch content of maize silage (on average + 41 g of starch / 100 °C). The increase in starch content was accompanied by a decrease of NDF and CP content due to a dilution effect. Despite large variation in chemical composition with stage of maturity, the OMD varied in a relatively narrow range, from 722 g.kg⁻¹ of DM for stage of maturity 4 to 736 g.kg⁻¹ of DM for stage of maturity 2. The low variability of OMD with maturity has already been reported by Andrieu et al. (1993). Interestingly, in our study, the highest OMD were obtained for stages of maturity 2 and 3, whereas OMD was significantly lower for stage of maturity 1 and for stage of maturity 4. However, Arrigo and Stoll (2012) did not found a decrease of the digestibility of organic

matter in sheep for late stage of maturity. Because of the low variation of OMd with the stage of maturity, the content in digestible OM increased slightly (+ 20 g.kg⁻¹ of DM) from stage of maturity 1 to stage of maturity 4. However, the sum of digestible nutrients (starch + cell-walls + protein) increased more markedly (+110 g.kg⁻¹ of DM, Table 4) between stage of maturity 1 and 4. This expression should be closer to true digestible constituents as OMd and DOM represents apparent digestible constituents.

Conclusions

The relative stability of OMd with stage of maturity was explained by the compensation between the increase in highly digestible starch content (during grain filling) and the concomitant decrease in NDF content and digestibility. The insights reported here make it clear that the stage of maturity at harvesting leads to variations in digestibility of starch and cell wall fractions of maize silage, therefore changing the amount and source of energy available for ruminants. Harvesting from 300 g.kg⁻¹ of DM to 350 g.kg⁻¹ of DM (of from 580°C to 670°C after flowering) seems to be a good compromise to obtain a plant with a mature grain (rich in starch) and digestible stem-leaf fraction. The digestible content of starch is also affected by hybrid. The DST of flint-dent grain (hybrid FD) seems to be limited by a protein matrix whereas thin protein matrix of dent grain (Hybrid D) may allow high STD. This suggests that the effect of hybrid must be taken into account in the diet formulation. Climate, characterised in this study by the year effect, had also an important effect on chemical composition and digestibility of maize. With low temperatures during maturation and late rains at the end of grain filling, the year 2012 lead to maize lowest in starch and richest in NDF which were strongly lignified and so less digestible. Then, the interactions among hybrid and year must also be considered. Indeed, the significantly higher whole plant digestibility of hybrid FD was only observed in 2012, when growing conditions were atypical.

Thus, in order to provide digestible maize with mixed source of energy from starch and NDF, the stage of maturity at harvesting, for which maize is harvest, must be well-reasoned and balanced according to hybrid and local climatic conditions.

Acknowledgements

The authors thank B. Deroche (Masters degree student) for assistance with data analysis, the staff at the INRA's Experimental Unit on Ruminants from Theix (UERT) for technical assistance and animal care, F. Anglard, P. Capitan and J. Payet from the RAPA lab at UMRH (INRA) for handling chemical analyses and preparing the samples, and the French seed companies Union ('UFS') and National federation of sorghum and maize seed producers (FNPSMS) for their financial support. We also thank ARVALIS (and especially the technical team of La Jaillière experimental farm) for their work on growing, harvesting and ensiling the maize crop.

References

- Ali M, Weisbjerg MR, Cone JW, Van Duinkerken B, Block MC, Bruinenberg M and Hendricks W.H 2012. Postruminal degradation of crude protein, neutral detergent fibre and starch of maize and grass silages in dairy cows. *Animal Feed Science And Technology* 177, 172–79.
- Andrieu J, Demarquilly C, Dardenne P, Barrière Y, Lila M, Maupetit P, Rivière F and Femenias N 1993. Composition and nutritive value of whole plants fed fresh to sheep. I- Factors of variation. *Annales de Zootechnie* 42, 221-249.
- Arrigo Y and Stoll P 2012. Estimation de la valeur nutritive de l'ensilage de maïs. *Recherche Agronomique Suisse* 3, 442-449.

- 596 Bal MA, Coors JG and Shaver RD 1997. Impact of the maturity of corn for use as silage in
597 the diets of dairy cows on intake, digestion, and milk production. Journal of Dairy Science
598 80, 2497-2503.
- 599 Barrière Y, Demarquilly C, Hebert Y, Dardenne P, Andrieu J, Maupetit P, Lila M and Emile JC
600 1991. Influences de la variabilité génétique et environnementale sur la digestibilité *in vitro*
601 ou *in vivo* du maïs fourrage. Agronomie 11, 151-167.
- 602 Barrière Y and Emile JC 2000. Le Maïs fourrage. III-Evaluation et perspectives de progrès
603 génétiques sur les caractères de valeur alimentaire. Fourrages 163, 221-238.
- 604 Barrière Y, Emile JC, Traineau R, Surault F, Briand M, Gallais A 2004. Genetic variation for
605 organic matter and cell wall digestibility in silage maize. Lessons from a 34-year long
606 experiment with sheep in digestibility crates. Maydica 49, 115-126.
- 607 Carpentier B and Cabon G 2011. Le maïs fourrage: élaboration du rendement et de la qualité,
608 récolte et conservation. Fourrages 205, 11-23.
- 609 Conway EJ 1957. Microdiffusion analysis and volumetric error. Crosby Lockwood, London,
610 UK.
- 611 Cox W J, Cherney JH, Cherney DJR and Pardee WD 1994. Forage quality and harvest index
612 of corn hybrids under different growing conditions. Agronomy journal 86, 277-282.
- 613 Demarquilly C, Chenost M and Giger S 1995. Pertes fécales et digestibilité des aliments des
614 rations. In Nutrition des ruminants domestiques (eds Jarrige R, Ruckebusch Y, Demarquilly
615 C, Farce MH and Journet M), pp.602-647. INRA Edition, Paris, France.
- 616 Di Marco ON, Aello MS, Nomdedeu M and Van Houtte S 2002. Effect of maize crop maturity
617 on silage chemical composition and digestibility (in vivo, in situ and in vitro). Animal Feed
618 Science and Technology 99, 37-43.

- 619 Dulphy JP, Demarquilly C and Henry M 1975. Perte de composés volatils lors de la
620 détermination à l'étuve de la teneur en matière sèche des ensilages. Annales de Zootechnie
621 24, 743-756.
- 622 Dulphy JP, Demarquilly C 1981. Problèmes particuliers aux ensilages. In Prévision de la
623 valeur nutritive des aliments, pp 81-104. INRA Edition, Paris, France.
- 624 Fabijanac D, Varga B, Svecnjak Z and Grbesa D 2006. Grain yield and quality of semiflint
625 maize hybrids at two sowing dates. Agriculturae Conspectus Scientificus 71, 45-50.
- 626 Harrelson FW, Erickson GE, Klopfenstein TJ, Jackson DS, Fithian WA 2008. Influence of
627 corn hybrid, kernel traits and growing location on digestibility. Nebraska Beef Cattle
628 Reports (eds The Board of Regents of the University of Nebraska), pp52-53, Lincoln, USA.
- 629 INRA 2007. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux. Valeur des
630 aliments. In Tables INRA 2007, 307p. Editions Quæ, Paris, France.
- 631 ISO-15914 2004. Animal feeding stuffs-enzymatic determination of total starch content.
632 International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- 633 ISO-16634-1 2008. Food products - Determination of the total nitrogen content by
634 combustion according to the Dumas principle and calculation of the crude protein content -
635 Part 1: Oilseeds and animal feeding stuffs. International Organization for Standardization,
636 Geneva, Switzerland.
- 637 Khan NA., Yu P, Ali M, Cone JW, Hendriks WH 2014. Nutritive value of maize silage in
638 relation to dairy cow performance and milk quality. Journal of the Science of Food and
639 Agriculture (DOI: 10.1002/jsfa.6703)
- 640 Kruse S, Herrmann A, Kornher A and Taube F 2008. Evaluation of genotype and
641 environmental variation in fibre content of silage maize using a model-assisted approach.
642 European Journal of Agronomy 28, 210-223.

- 643 Michalet-Doreau B, Corneloup F, Aizac B, Andrieu J, Baumont R 2004. Variabilité et facteurs
644 de variation de la teneur en matières azotées des maïs récoltés en plantes entières. INRA
645 Production Animale 17, 3-10.
- 646 O'Neill PM, Shanahan JF, Schepers JS and Caldwell B 2004. Agronomic responses of corn
647 hybrids from different eras to deficit and adequate levels of water and nitrogen. Agronomy
648 Journal 96, 1660-1667.
- 649 Opsi F, Borreani G, Tabacco E, Lopez S 2013. Influence of cultivar, sowing date and maturity
650 at harvest on yield, digestibility, rumen fermentation kinetics and estimated feeding value
651 of maize silage. Journal of Agricultural Science 151, 740-753.
- 652 Pereira MN, Pinho RGV, Bruno RGS, Calestine GA 2004. Ruminant degradability of hard or
653 soft texture corn grain at three maturity stages. Scientia Agricola (Piracicaba, Brazil) 61,
654 358-363.
- 655 Peyrat J, Nozière P, Le Morvan A, Féraud A, Protin PV, Baumont R 2014. Effects of ensiling
656 maize and sample conditioning on *in situ* rumen degradation of dry matter, starch and fibre.
657 Animal Feed Science and Technology 196, 12-21
- 658 Philippeau C and Michalet-Doreau B 1997. Influence of genotype and stage of maturity of
659 maize on rate of ruminal starch degradation. Animal Feed Science and Technology 68, 25–
660 35.
- 661 Philippeau C, Landry J, Michalet-Doreau B 2000. Influence of the protein distribution of
662 maize endosperm on ruminal starch degradability. Journal of the Science of Food and
663 Agriculture 80, 404–408.
- 664 Phipps RH, Sutton JD, Beever DE and Jones AK 2000. The effect of crop maturity on the
665 nutritional value of maize silage for lactating dairy cows. 3 - Food intake and milk
666 production. Animal Science 71, 401-409.

- 667 Randjelovic V, Prodanovic S, Tomic Z, Bijelic Z and Simic A 2011. Genotype and year effect
668 on grain yield and nutritive values of maize (*Zea mays L.*). Journal of Animal and
669 Veterinary Advances 10, 835-840.
- 670 SAS Inc. 2003. SAS®User's Guide: Statistics. Version 9.3 Edition. SAS Inc., Cary, NC.
- 671 Van Soest PJ and Wine RH 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV
672 Determination of plant cell-wall constituents. Journal of Association of Official Analytical
673 Chemists 50, 50-55.
- 674 Weiss WP, Conrad HR, St Pierre NR 1992. A theoretically-based model for predicting total
675 digestible nutrient values of forages and concentrates. Animal Feed Science and
676 Technology 39, 95-110.

Chapitre 2

Influence de la conservation en ensilage et du conditionnement des échantillons sur la dégradation ruminale *in situ* de la matière sèche, de l'amidon et des parois végétales du maïs fourrage

***(Peyrat et al., 2014 dans “Animal Feed Science and
Technology”)***

Influence de la conservation en ensilage et du conditionnement des échantillons sur la dégradation ruminale *in situ* de la matière sèche, de l'amidon et des parois végétales du maïs fourrage

J. Peyrat^{a,b,c}, P. Nozière^{a,b}, A. Le Morvan^{a,b}, A. Férard^c, P.V. Protin^c, and R. Baumont^{a,b}

Résumé

Les ruminants à haut niveau de production sont généralement nourris avec des régimes à base d'ensilage de maïs. L'évaluation précise de la valeur nutritive de l'ensilage de maïs représente donc un enjeu économique important. Toutefois, la mesure du niveau et de la vitesse de dégradation des fractions amidon et parois végétales de l'ensilage de maïs dans le rumen est peu précise notamment en raison de l'absence de méthodologie standard de mesure.

Dans cette étude, l'effet de la conservation en ensilage et du conditionnement de l'échantillon sur la dégradation du maïs fourrage dans le rumen, a été étudiée *in situ*. Huit séries d'échantillons de maïs (2 variétés x 2 stades de maturité x 2 méthodes de conservation [non-ensilé ou frais et ensilé]) ont été introduits dans des sachets de nylon selon trois méthodes de conditionnement : séchage et broyage à 1 mm (D1), séchage et broyage à 4 mm (D4), congélation et broyage grossier (FG). La disparition de la matière sèche, de l'amidon et du NDF (noté aNDF) a été mesurée *in situ* chez la vache après différents temps d'incubation : 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h, 48 h et 96 h. Les effets de la conservation en ensilage, de la variété, du stade de maturité et leurs interactions sur la dégradation de la MS, de l'amidon et du NDF ont été analysés avec la procédure MIXED de SAS.

La dégradabilité théorique de la MS (ED4_{DM}) des ensilages de maïs a été significativement plus élevée ($P < 0,001$) que celle des maïs en vert en raison d'une fraction rapidement dégradable (a) plus importante ($P < 0,001$). La dégradabilité théorique de l'amidon (ED6_{Starch}) des ensilages de maïs est également plus élevée que celle des maïs en vert, en raison d'une vitesse de dégradation plus élevée ($P < 0,01$). A l'inverse, la dégradabilité théorique du NDF

(ED2_{aNDF}) de l'ensilage de maïs est plus faible que celle des maïs en vert en raison de leur plus faible proportion d'hémicellulose dans le NDF total et du temps de latence avant dégradation plus important pour les ensilages de maïs que pour les maïs en vert ($P < 0,001$).

La dégradabilité théorique de la MS était plus élevée ($P < 0,001$) pour les échantillons de type D1 que pour les échantillons D4 et FG ($P < 0,001$), notamment en raison d'une fraction rapidement dégradable plus importante pour les échantillons D1. En raison d'une vitesse de dégradation élevée, la dégradabilité de l'amidon a été plus élevée ($P < 0,001$) pour les échantillons FG que pour les échantillons D1 et D4 alors que la dégradabilité du NDF était la plus basse pour les échantillons FG.

La dégradabilité de l'amidon est plus élevée pour les ensilages de maïs que pour les maïs en vert alors que la dégradabilité du NDF est plus faible pour les ensilages de maïs comparés aux maïs en vert. Parallèlement au mode de conservation, le broyage fin (comme pour D1) conduit à des pertes particulières à travers les pores des sachets de nylon. Ces pertes liées à un broyage fin sont corrélées à des hauts niveaux de dégradabilité de l'amidon alors que le broyage plus grossier (comme pour FG) conduit à des dégradabilités du NDF faibles, probablement en raison d'une réduction insuffisante de la taille des particules.

En conclusion, l'utilisation des ensilages de maïs séchés et broyés à 4 mm (D4) apparaît comme la méthode appropriée pour l'étude *in situ* de la dégradabilité des fourrages riches en amidon.

Effects of ensiling maize and sample conditioning on *in situ* rumen degradation of dry matter, starch and fibre

J. Peyrat^{a,b,c}, P. Nozière^{a,b}, A. Le Morvan^{a,b}, A. Férard^c, P.V. Protin^c, and R. Baumont^{a,b}

^a INRA, UMR1213 Herbivores, Site de Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

^b Clermont Université, VetAgro Sup, UMR Herbivores, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^c ARVALIS–Institut du Végétal, Station expérimentale de la Jaillière, 44370 La Chapelle-Saint-Sauveur, France

Abstract

High-production ruminants are commonly fed maize silage, which makes accurate evaluation of its nutritive value a key economic issue. However, evaluations of the rate and extent of ruminal degradation of starch and cell wall fractions from maize silage carry uncertainty due to the lack of a standardized method. Here, we investigated the effects of ensiling and sample conditioning on *in situ*-measured degradation of maize forage. Eight series of maize samples (two hybrids × two maturity stages × two methods of conservation [non-ensiled or fresh and ensiled]) were nylon-bagged in three conditionings: dried and ground to 1 mm (D1), dried and ground to 4 mm (D4), frozen and coarse-ground (FG). Disappearance of dry matter (DM), starch and fibre (aNDF) was measured *in situ* in cow rumen after different incubation times (2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h, 48 h and 96 h). Effects of ensiling, sample conditioning, genotype, maturity and their interactions on DM, starch and aNDF degradation were analyzed using the SAS MIXED procedure. Effective dry matter degradability (ED4_{DM}) was significantly higher (P<0.001) in silage than in fresh maize due to a significantly higher rapidly degradable fraction (a) (P<0.001). Effective starch degradability (ED6_{Starch}) followed the same trend due to a higher silage degradation rate (P<0.01). Conversely, effective aNDF degradability (ED2_{aNDF}) was lower in silage (P<0.001) than fresh maize due to the longer lag-time to degradation (P<0.001) and lower hemicellulose ((aNDF – ADF)/aNDF) fraction in silage. Effective DM degradability was higher (P<0.001) for D1 samples than D4 and FG samples,

mainly due to the higher rapidly degradable fraction (a) ($P < 0.001$) in D1 than D4 or FG samples. In relation to high degradation rate, starch degradability was significantly higher ($P < 0.001$) in FG than D1 and D4 samples, whereas aNDF degradation was lowest in the FG samples. This study shows that ensiling maize increases starch degradability and decreases aNDF degradability compared to fresh plant. Alongside conservation method, fine-grinding samples (as D1) led to high losses through the pores of the nylon bags, and these losses were correlated with high starch degradability, whereas coarse grinding (as FG) led to low aNDF degradability, probably due to insufficiently reduced particle sizes. In conclusion, using ensiled samples dried and ground to 4 mm (D4) emerges as the appropriate method for *in situ* studies of starch-rich forages used as silages.

Keywords: Ruminal degradation / *in situ* / maize silage / forage conservation / sample conditioning

Abbreviations: ADF, acid detergent fibre; aNDF, neutral detergent fibre; D1, dried and ground to 1 mm; D4, dried and ground to 4 mm; DM, dry matter; ED2_{aNDF}, effective aNDF degradability; ED4_{DM}, effective dry matter degradability; ED6_{Starch}, effective starch degradability; F, flint grain; FD, flint-dent grain; FG, frozen and coarse-ground; N, nitrogen.

1. Introduction

Maize silage is currently used as forage in the diet of high-yielding ruminants (dairy cows and fattening animals) to ensure a high energy supply. Accurate evaluation of maize silage feed value is a key economic issue due to its impact on animal health and production. The rate and extent of ruminal degradation of maize silage can vary strongly with stage of maturity (Johnson et al., 2002; Jensen et al., 2005) and hybrid (Verbic et al., 1995; Philippeau and Michalet-Doreau, 1997; Ngonyamo-Majee et al., 2009), but these variations cannot be properly understood until there is a standardized method to evaluate rate and extent of ruminal

degradation of maize silage starch and fibre. *In situ* measurement of ruminal degradation is the reference method in many feed evaluation systems for assessing ruminal nitrogen (N) degradation (Vérité and Peyraud, 1989; NRC, 2001; NorFor, 2011). The forage samples used for *in situ* measurements are routinely oven- or freeze-dried then fine-ground, but it has been shown that using finely-ground samples overestimates the ruminal degradability of DM and N in grass samples (Dulphy et al., 1999) and starch in maize samples (Philippeau and Michalet-Doreau, 1997) due to the amount of insoluble particles that get lost through the bag pores and confounded with soluble and rapidly degradable fractions. Furthermore, although measuring degradability on samples collected from fresh forage before conservation makes it easy to form representative samples and screen large forage samples, there are issues over whether measurements on fresh forage can be reliably extrapolated to estimate the degradability of the corresponding conserved forage. Recent studies show that length of ensiling can modify maize degradation in the rumen (Hoffman et al., 2011; Der Bedrosain et al., 2012). Thus, it is important to evaluate these differences in ruminal degradability between fresh and conserved forage for the different nutrient fractions. The aim of this study was to assess the effect of ensiling and sample conditioning procedure on the ruminal degradability of whole-plant maize DM, starch and fibre fractions measured *in situ*.

2. Materials and methods

The experiment was conducted in compliance with national legislation on animal care (French Ministry of Agriculture-issued Certificates of Authorization to Experiment on Living Animals, Nos. 63-30 and 63-158). The experimental protocol was approved by the Auvergne-region institutional review board for animal experimentation, under No. CE12-09.

2.1 Maize hybrids and sample conditioning

Two maize hybrids chosen for this study were grown and harvested in 2011 at the ARVALIS–Institut du Végétal experimental farm in northwest France. These hybrids were selected for their contrasted grain texture determining rate of starch degradation, i.e. flint grain (F) (considered “low starch availability”) and flint-dent grain (FD) (considered “high starch availability”). The two hybrids were harvested at two stages of maturity — early and late. Maturity at harvest was characterized by whole-plant DM content, proportion of ears in the whole plant, and DM content of ear and stem-leaf fractions (Table 1).

Table 1

Characterization of fresh whole-plant maize according to hybrid variety and stage of maturity.

Hybrid (H)	Flint (F)	Flint-Dent (FD)	Flint (F)	Flint-Dent (FD)
Maturity (M)	1	1	2	2
Dry matter of whole plant (g/kg fresh matter)	275	304	417	435
Ear/whole plant ^A	0.58	0.61	0.67	0.69
Dry matter of ear fraction ^A	0.38	0.41	0.53	0.54
Dry matter of stem-leaf fraction ^A	0.19	0.22	0.27	0.30

^A Data expressed as proportion of dry matter.

At harvest, representative samples of the fresh non-ensiled material were snap-frozen and stored at –20°C, and the rest was ensiled in bags (closed under anaerobic conditions). After 17 weeks to ensure even fermentation, silage pH was measured as 3.66 for hybrid F stage 1, 3.81 for hybrid F stage 2, 3.71 for hybrid FD stage 1 and 3.86 for hybrid FD stage 2. Then, samples of silages and corresponding fresh material were conditioned in three ways ready for nylon-bagging: i) dried samples (72 h at 60°C) ground through a 4 mm screen (Retsch Mill, SM100) (D4); ii) dried samples (72 h at 60°C) ground through a 1 mm screen (Rotary Mill, Brabender GmbH, Duisburg, Germany) (D1); iii) frozen samples chopped through a coarse

screen (Mincer-Grinder-Law S3) and directly bagged without drying (FG). Around 50% of the DM of FG samples was retained on a 4 mm sieve by wet sieving. The FG bags were kept frozen before incubation in the rumen. The FG conditioning is designed to simulate chewed maize reaching the rumen.

For each of the 24 maize samples (2 hybrids $\times$ 2 stages of maturity $\times$ 2 types of forage conservation $\times$ 3 methods of sample conditioning), a series of 56 nitrogen-free polyester bags (5 $\times$ 10 cm, given porosity 50 μ m, R510 Ankom® Technology, Macedon, NY) was prepared with approximately 3 g DM of weighed samples placed into each bag. Small bags were used to enable simultaneous incubation of one variety, one stage of maturity, two types of conservation (fresh or silage) and three conditioning methods (D1, D4 and FG).

2.2 Ruminal incubations and experimental design

Three non-lactating rumen-cannulated Holstein cows were used for in situ incubations at the National Institute for Agricultural Research (INRA) experimental farm in Saint-Genès-Champanelle, France. The animals were fed twice daily (half the diet at 8 a.m. and the other half at 4 p.m.) with a limited quantity (78 g DM/kg W^{0.75} covering maintenance requirements) of a mixed diet composed of $\frac{2}{3}$ grass hay and $\frac{1}{3}$ concentrates (230 g/kg wheat, 200 g/kg barley, 11 g/kg molasses, 300 g/kg dried sugar beet pulp, 71 g/kg soybean meal, 150 g/kg rapeseed cake, 11 g/kg minerals, 6 g/kg salt). The cows were also supplemented with 200 g/day of a vitamins and minerals mixture. This supplement pellet was sprinkled daily on the ration. The in situ incubations were performed on three cows over two four-week periods. During one week, one cow received the bags of one of the four combinations of hybrids and stages of maturity. For that combination and that cow, samples of the two conservations (fresh and ensiled) and the three sample preparations were simultaneously incubated. At the end of the four weeks, each cow received the bags of the four combinations of hybrids and stages of

maturity (and thus all conservations and sample conditionings). This design was then repeated in full for another four-week period, reproducing the two repetitions or ‘runs’ according to Udén et al. (2012). The nylon bags were inserted into the rumen before the morning meal and removed after 2, 4, 8, 16, 24, 48 and 96 h of incubation. Once removed from the rumen, the bags were rinsed in cold water, washed for 10 min four times over in a washing machine, then dried at 60°C and weighed to determine DM content. After that, for each of the 24 treatment combinations and each incubation time, the 6 remaining bags (three cows × two replicates) were pooled, ground through a 1 mm sieve for aNDF analysis, and then through a 0.5 mm sieve for starch analysis.

2.3 Chemical analysis

The DM content of fresh maize and silages was determined by drying at 80°C for 48 h, and the DM content of silages was corrected for losses of volatile fermentation products (Dulphy et al., 1975). Samples used for fibre content determination were dried at only 60°C for 48 h. Starch content was determined by enzymatic method (ISO 15914:2004). aNDF and ADF content were determined according to Van Soest and Wine (1967) using an Ankom system (Ankom® Technology, Macedon, NY). aNDF determination used a heat-stable amylase without addition of sodium sulphite. ADF residues were obtained after boiling with ADF reagent and expressed inclusive of residual ash. For the 192 nylon bag residues, aNDF content was estimated using near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) according to the following procedure. All bag residues were scanned in a NIRsystems 6500 monochromator (Foss NIRSystems, Silver Spring, MD), and laboratory determinations were performed on a subset of 83 residues selected based on their spectra. These laboratory analyses were then used with the NIR spectra to expand the prediction equations for routine analysis. The statistical parameters of the prediction model (standard error of calibration, standard error of cross-

validation and coefficient of determination) were SEC=1.385 (g/kg DM), SECV=1.724 (g/kg DM) and $r^2=0.987$.

2.4 Data analyses

DM, starch and aNDF disappearance rate (in g/g) was calculated for each cow, each replicate per cow, each maize sample, and each incubation time. The disappearance kinetics of DM, starch and aNDF were fitted to an exponential model according to the method described by Dhanoa (1988):

$$D(t)=a + b*(1-e^{-c*(t-L)})$$

where $D(t)$ is proportion (g/g) disappeared at time t (h), a is proportion of rapidly degradable fraction (g/g), b is proportion of potentially degradable fraction (g/g), c is the digestion rate constant (h^{-1}) of the fraction b and L (h) is the lag time. The undegradable fraction was calculated as $1 - [(a) + (b)]$. Data were fitted using the non-linear least squares regression procedure (NLIN) of SAS (9.1 version, 2003) with the Marquardt parameter in order to obtain the smallest residual sum of squared deviations from the model. From adjustment results of this model, as the L of DM and starch was not significantly different to 0, it was assumed to equal 0 as per Jensen et al. (2005) and Van Duinkerken et al. (2011). For starch, data were fitted using the linear regression on log-transformed residues according to incubation time until 24 h (Mertens et al., 1993), and assuming $(a)+(b)=1$, since no residual starch was observed in 48 h residues. The effective degradability of DM (ED4DM), aNDF (ED2aNDF) and starch (ED6Starch) was calculated as:

$$ED=a + (b*c e^{-kp*L})/(c+kp)$$

where a , b , c and L are as described above, and kp (h^{-1}) is the ruminal outflow rate of particles. In accordance with Mertens et al. (1993), kp is assumed to be 0.04 for DM (moderate time delay during passage in the rumen and a slow degradation rate), 0.06 for

Table 2. Effect of conservation, hybrid variety and stage of maturity on chemical composition of the whole-plant maize (g/kg DM). (n= 24)

Conservation (C)	Fresh				Silage				SEM	P					
Hybrid (H)	F	F	FD	FD	F	F	FD	FD							
Maturity (M)	1	2	1	2	1	2	1	2		Hybrid	Maturity	Conservation	C*M	C*H	H*M
Starch	286 ^b	378 ^{ab}	348 ^{ab}	427 ^a	272 ^b	383 ^a	352 ^{ab}	399 ^a	17.33	<0.01	<0.01	0.50	0.79	0.75	0.22
aNDF ^A	436 ^a	397 ^{ab}	403 ^{ab}	355 ^b	400 ^{ab}	354 ^b	371 ^{ab}	354 ^b	13.06	<0.01	<0.01	<0.01	0.53	0.24	0.47
ADF ^B	205 ^a	180 ^{ab}	183 ^{ab}	155 ^b	205 ^a	172 ^b	187 ^a	173 ^b	7.01	<0.01	<0.01	0.48	0.81	0.17	0.28
Hemicellulose ^C (as a fraction of aNDF)	0.54 ^a	0.55 ^a	0.55 ^a	0.56 ^a	0.49 ^c	0.52 ^b	0.50 ^{bc}	0.51 ^{bc}	0.01	<0.05	<0.01	<0.01	0.52	0.11	0.40

^A Neutral Detergent Fibre assayed with a heat-stable amylase and expressed inclusive of residual ash.

^B Acid Detergent Fibre expressed inclusive of residual ash.

^C Hemicellulose = (aNDF – ADF) / aNDF.

For each line, means with different superscript letters are significantly different at P < 0.05.

starch (short time delay during passage in the rumen and a fast degradation rate), and 0.02 for aNDF (long time delay during passage in the rumen and a slow degradation rate).

2.5 Statistical analyses

Effects of conservation method (C), hybrid (H), maturity (M) and their interactions (C×H, C×M, H×M, C×H×M) on the chemical composition of maize samples were analyzed as fixed effects using the GLM procedure of SAS (9.1 version, 2003). After averaging repetitions, the 72 observations (two hybrids × two stages × two conservations × three sample preparations × three cows) were subjected to analysis of variance. Effects of conservation method (C), sample conditioning (S), hybrid (H), maturity (M) and their interactions (H×C, H×M, H×S, M×C, M×S, C×S, C×[H×M], S×[H×M×C]) on degradation parameters were analyzed as fixed effects and animal was analyzed as random effect using the MIXED procedure of SAS. The degradation rate (c) of aNDF was log-transformed to get a normal distribution of statistical residues. Significant differences were set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1 Chemical composition of the maize samples

There were no interactions between conservation and maturity effects (C×M), between conservation and hybrid effects (C×H) or between hybrid and maturity (H×M) effects on starch, aNDF, ADF contents or hemicellulose fraction (Table 2). Both maturity and hybrid had significant effects on starch, aNDF, ADF contents and hemicellulose fraction. Starch content increased with stage of maturity from 278 to 392 g/kg DM whereas aNDF content decreased from 406 to 369 g/kg DM and ADF content decreased from 210 to 175 g/kg DM. Hybrid FD was richer in starch ($P < 0.01$) than hybrid F (385 and 333 g/kg DM, respectively), probably due to the higher proportion of ears in the whole plant for hybrid FD than hybrid F, regardless

of DM content (see Table 1). Hybrid FD had lower aNDF, ADF contents and hemicellulose fraction than hybrid F ($P<0.05$, $P<0.01$ and $P<0.05$, respectively).

Total fibre content was lower in silage than fresh plant, i.e. aNDF content decreased from 398 to 377 g/kg DM. The conservation effect was even more significant ($P<0.01$) on hemicellulose content expressed as a fraction of aNDF ($P<0.01$). However, there was no significant conservation effect on starch and ADF content (see Table 2).

3.2 Disappearance of dry matter (DM)

Effective DM degradability ($ED4_{DM}$) was higher ($P<0.01$) for silage than for fresh maize (Table 3). This was mainly related to the differences in fraction (a) that was higher ($P<0.01$) in ensiled maize. Conversely, DM fraction (b) was lower ($P<0.01$) for ensiled than fresh maize and degradation rate (c) tended to be lower ($P=0.07$) for ensiled maize.

For fresh maize, $ED4_{DM}$ was higher for D1 than for FG samples ($P<0.01$) and for FG than D4 samples ($P<0.01$), largely due to differences between fractions (a). Fraction (b) of fresh maize was higher ($P<0.01$) for D4 samples than for the two other conditionings. The corresponding degradation rate (c) of fresh maize was higher ($P<0.01$) for FG samples than for the two other conditionings. For maize silage, the same effects of sample conditioning were observed on $ED4_{DM}$ and on parameters (a), (b) and (c), as there was no interaction between the effects of conservation and sample conditioning.

Hybrid and stage of maturity also had a significant ($P<0.01$) effect on ruminal DM degradation (Figure 1a).

Table 3 Effect of maize conservation and sample conditioning on the ruminal *in situ* degradation of dry matter (DM), starch and NDF (n=72)

Variable of the kinetic model	FRESH			SILAGE			SEM	P		
	Dried and ground to 4mm (D4)	Dried and ground to 1mm (D1)	Fresh-ground (FG)	Dried and groudn to 4mm (D4)	Dried and ground to 1mm (D1)	Fresh-ground (FG)		Conservation (C)	Sample Conditioning (S)	Conservation *Sample Conditioning (C*S)
DM degradation										
ED4 _{DM} ^A	0.55 ^d	0.60 ^b	0.57 ^c	0.58 ^c	0.64 ^a	0.63 ^a	0.006	<0.01	<0.01	<0.05
(a) ^B	0.25 ^f	0.37 ^c	0.28 ^e	0.33 ^d	0.46 ^a	0.41 ^b	0.007	<0.01	<0.01	<0.01
(b) ^C	0.67 ^a	0.58 ^b	0.59 ^b	0.59 ^b	0.49 ^c	0.46 ^d	0.014	<0.01	<0.01	<0.01
(c) ^D	0.033 ^b	0.026 ^c	0.040 ^a	0.030 ^c	0.026 ^c	0.037 ^a	0.002	0.07	<0.01	0.54
Starch degradation										
ED6 _{Starch} ^E	0.51 ^e	0.68 ^c	0.68 ^c	0.66 ^d	0.78 ^b	0.83 ^a	0.005	<0.01	<0.01	<0.01
(a)	0.09 ^d	0.36 ^b	0.33 ^b	0.29 ^c	0.56 ^a	0.59 ^a	0.012	<0.01	<0.01	<0.01
(b)	0.91 ^a	0.64 ^c	0.67 ^{bc}	0.71 ^b	0.44 ^d	0.41 ^d	0.012	<0.01	<0.01	<0.01
(c)	0.054 ^c	0.062 ^b	0.067 ^b	0.067 ^b	0.067 ^b	0.083 ^a	0.002	<0.01	<0.01	<0.01
aNDF ^F degradation										
ED2 _{aNDF} ^G	0.50 ^a	0.52 ^a	0.41 ^b	0.42 ^b	0.50 ^a	0.42 ^b	0.012	<0.01	<0.01	<0.01
(a)	0.09 ^b	0.22 ^a	0.02 ^c	0.09 ^b	0.19 ^a	0.10 ^b	0.009	<0.05	<0.01	<0.01
(b)	0.72 ^a	0.66 ^{ab}	0.69 ^{ab}	0.72 ^a	0.64 ^b	0.63 ^b	0.020	<0.05	<0.01	0.17
(c)	0.030	0.025	0.039	0.030	0.031	0.033	-	-	-	-
Log (c)	-1.52 ^{ab}	-1.63 ^b	-1.44 ^a	-1.57 ^b	-1.54 ^{ab}	-1.49 ^a	0.001	0.95	<0.01	<0.05
L ^H	3.01 ^b	9.24 ^a	7.08 ^{ab}	10.90 ^a	11.94 ^a	8.97 ^a	0.014	<0.01	<0.05	<0.05
1-[(a)+(b)] ^I	0.19 ^b	0.12 ^c	0.28 ^a	0.19 ^b	0.17 ^{bc}	0.27 ^a	0.020	0.26	<0.01	0.12

¹ Effective degradability of dry matter calculated by the model of Ørskov and McDonald, 1979 (assuming a particle outflow rate of 0.04 h⁻¹)^A Effective degradability of DM calculated by the model of Ørskov and McDonald, 1979 (assuming a particle outflow rate of 0.04 h⁻¹)^B a: rapidly degradable fraction calculated by the model of Ørskov and McDonald, 1979^C b: potentially degradable fraction calculated by the model of Ørskov and McDonald, 1979^D c: rate of degradation (per h) calculated by the model of Ørskov and McDonald, 1979^E Effective degradability of starch calculated by the model of Ørskov and McDonald, 1979 (assuming a particle outflow rate of 0.06 h⁻¹)^F Neutral Detergent Fibre assayed with a heat-stable amylase and expressed inclusive of residual ash.^G Effective degradability of aNDF calculated by the model of Dhanoa, 1988 (assuming a particle outflow rate of 0.02 h⁻¹)^H L: lag-phase time to degradation (h) calculated by the model of Dhanoa, 1988^I 100-(a+b): undegradable fraction calculated from parameters of the model of Dhanoa, 1988

For conservation effect (fresh and silage), means with different superscript letters in the same row are significantly different at P < 0.05 (Tukey Test)

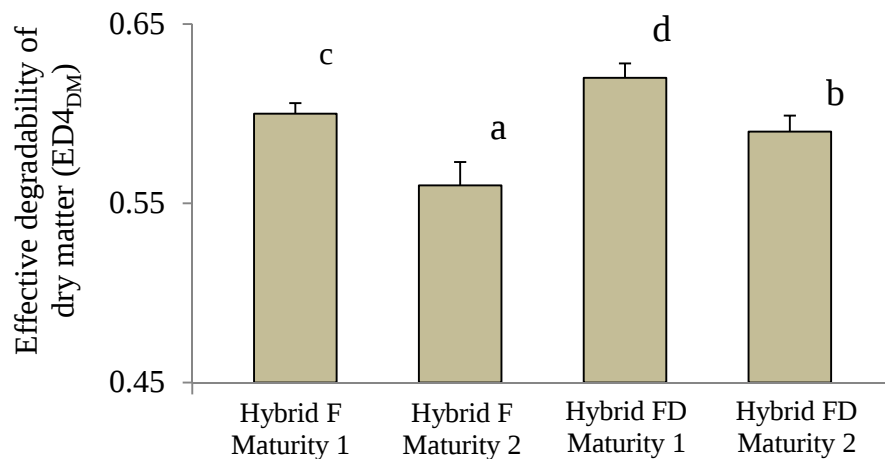


Figure 1a: Effect of hybrid and stage of maturity on the ruminal *in situ* degradability of dry matter. [Means±SEM values (figured by error bars) with different superscript letters are significantly different at $P < 0.05$] ($n=18$)

ED4_{DM} was higher ($P<0.01$) for hybrid FD than hybrid F, whatever the stage of maturity. This was mainly related to the potentially degradable fraction (b) which was higher ($P<0.01$) for hybrid FD than hybrid F. Conversely, fraction (a) was higher ($P<0.05$) for hybrid F than for hybrid FD. Hybrid had no effect ($P=0.33$) on DM degradation rate (c). Furthermore, ED4_{DM} decreased significantly with stage of maturity ($P<0.01$), mainly due to the fact that rapidly-degradable fraction (a) decreased significantly with stage of maturity ($P<0.01$). The opposite trend was observed for parameters b and c which increased ($P<0.01$) with stage of maturity.

3.3 Disappearance of starch

Like for DM, the effective degradability of starch (ED6_{Starch}) was higher ($P<0.01$) for ensiled than fresh maize (Table 3). This result was mainly related to rapidly-degradable fraction (a) and degradation rate (c) which were higher ($P<0.01$) for ensiled than fresh maize.

For fresh maize, ED6_{Starch} was not different ($P=0.99$) between D1 and FG samples but was higher ($P<0.05$) for both conditioning methods than for D4 samples. Fraction (a) and degradation rate followed the same trend as ED6_{Starch}: the highest values were observed for

FG and D1 samples ($P < 0.01$) without differences between these two conditionings. For maize silage, $ED6_{\text{Starch}}$ was highest for FG samples, followed by D1 samples, and was lowest for D4 samples ($P < 0.01$). This was mainly related to the higher degradation rate (c) ($P < 0.01$) for FG samples than for D1 and D4 which were similar. Fraction (a) was higher in D1 samples than FG samples ($P < 0.01$) and higher in FG samples than D4 samples ($P < 0.01$).

Contrary to DM, starch degradation ($ED6_{\text{Starch}}$) was lower for hybrid FD ($P < 0.01$) than hybrid F at maturity stage 1 but was higher for hybrid FD ($P < 0.01$) than hybrid F at maturity stage 2 (Figure 1b). This was mainly related to rapidly-degradable fraction (a) which was lower for hybrid FD ($P < 0.01$) than for hybrid F at maturity stage 1. Like for DM, $ED6_{\text{Starch}}$ decreased as maturity stage increased ($P < 0.01$), regardless of hybrid, due to the lower ($P < 0.01$) fraction (a) and degradation rate of maturity stage 2 than maturity stage 1.

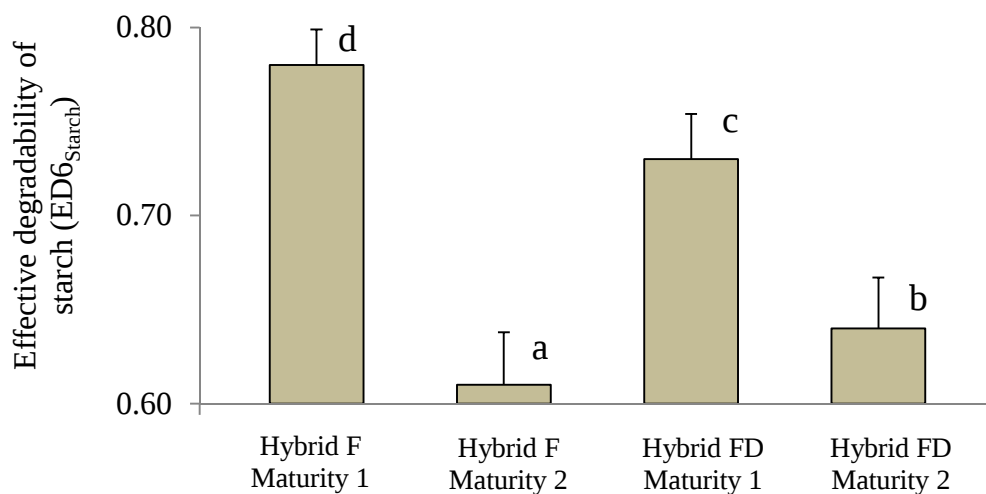


Figure 1b: Effect of hybrid and stage of maturity on the ruminal *in situ* degradability of starch. [Means $\pm$ SEM values (figured by error bars) with different superscript letters are significantly different at $P < 0.05$] ($n=18$)

3.4 Disappearance of fibre ($aNDF$)

Unlike DM and starch, the effective degradability of $aNDF$ ($ED2_{aNDF}$) was higher ($P < 0.01$) for fresh than ensiled maize, but only in D4 samples (Table 3). The opposite trend was observed for lag time (L) and fraction (a), which were higher for ensiled than fresh maize

($P < 0.01$ but only for D4 conditioning and $P < 0.01$ but only for FG samples, respectively). Potentially degradable fraction (b), degradation rate (c) or undegradable fraction ($1 - [(a) + (b)]$) did not significantly differ between fresh and ensiled maize whatever the conditioning.

For fresh maize, $ED2_{aNDF}$ was lower in FG samples than for D1 samples ($P < 0.01$) and D4 samples (both similar, $P = 0.43$). This was mainly related to fraction (a) which was lower for FG samples than D1 samples ($P < 0.01$) and lower for D1 samples than D4 samples ($P < 0.01$). Parameter (c) of fresh maize showed the opposite trend: (c) was higher ($P < 0.01$) for FG samples than for D1 samples (with no difference between FG and D4 samples). For fresh maize, the same effects of sample conditioning methods were observed on fraction (b) and on undegradable fraction, as there was no interaction between the effects of conservation and sample conditioning. For ensiled maize, $ED2_{aNDF}$ was lower ($P < 0.01$) in FG and D4 samples (both similar, $P = 1.00$) than D1 samples ($P < 0.01$). The same ranking between conditionings was observed for fraction (a). Fraction (c) was similar between D1 samples and D4 samples ($P = 0.99$) and between D1 samples and FG samples ($P = 0.98$). Ensiled maize showed the same effects of sample conditioning methods on parameters (b) and L and on fraction (a), as there was no interaction between the effects of conservation and sample conditioning.

Like with DM, aNDF degradation ($ED2_{aNDF}$) was lower ($P < 0.01$) for hybrid F (which had the highest average aNDF content) than hybrid FD regardless of maturity stage (Figure 1c). This was mainly related to fraction (b), which was lower ($P < 0.01$) for hybrid F than hybrid FD regardless of maturity stage. Degradation rate (c) followed the same trend (only for maturity stage 1) whereas undegradable fraction showed the opposite trend (only for maturity stage 2). Unlike DM and starch, maturity stage had no effect on aNDF degradation ($P = 0.26$).

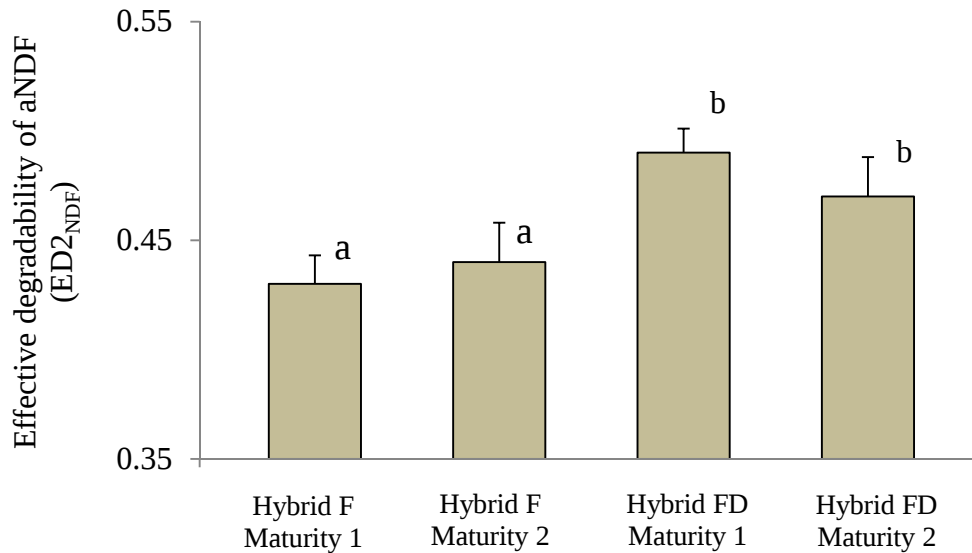


Figure 1c: Effect of hybrid and stage of maturity on the ruminal *in situ* degradability of aNDF. [Means±SEM values (figured by error bars) with different superscript letters are significantly different at $P < 0.05$] (n=18)

4. Discussion

The main objective of this work was to assess the effects of conservation and sample conditioning on the *in situ* degradability of DM, starch and aNDF in maize forage. The discussion of the results is therefore mainly focused on differences in degradation parameters between ensiled and fresh maize and between sample conditionings.

4.1 Effect of silage conservation on ruminal degradation

This study found strong differences in degradability between fresh and ensiled maize. Like DM degradation, starch degradability was higher for ensiled than fresh maize whereas DM and starch content were unaffected by ensiling. In agreement with other studies (Philippeau et al., 1998 on grain with an *in situ* method; Jurjanz and Monteils, 2005 on whole plant with an *in situ* method; Opsi et al., 2013 on whole plant with an *in vitro* method), the starch was degraded more rapidly (higher rapidly-degradable fraction (a) and higher degradation rate) in ensiled maize than fresh maize. The higher starch degradability with silage than fresh plant can be explained by partial hydrolysis of the protein matrix encapsulating starch granules (Gibbons et al., 2003) during the silage-induced fermentation

process (Rooney and Pflugfelder, 1986; Jurjanz and Monteils, 2005; Hoffman et al., 2011). Indeed, studies (Baron et al., 1986; McAllister et al., 1993) have reported a partial hydrolysis of endosperm proteins in ensiled corn grain that involved the protein matrix losing protective ability. Conversely, fibre degradability (aNDF) was lower in ensiled than fresh maize: ensiled maize led to a significantly longer lag to aNDF degradation than fresh maize. In vitro, Der Bedrosian et al. (2012) and Weinberg and Chen (2013) also found a lower ruminal degradability of fibre (aNDF) in ensiled than in fresh plant. In situ, Jurjanz and Monteils (2005) found the opposite trend. With the partial hydrolysis of hemicellulose in silage, the remaining aNDF in silage was probably less degradable than the aNDF in fresh plant, which could explain the longer lag time to degradation for silage. Moreover, bags have already been shown to be a micro-environment where pH and microbial activity depend more on the incubated feedstuffs than on ruminal conditions (Nozière et al., 1996; Nozière and Michalet-Doreau, 2000). It could thus be expected that pH would be lower in bags containing maize silage than bags containing fresh maize, which could further contribute to the lower aNDF degradation for silage than fresh plant.

4.2 Effect of the sample conditioning method on degradation in the rumen

The in situ method using undried and unground samples incubated in bigger (10 × 20 cm) bags has been employed by some teams (Prigge et al., 1984; Nocek, 1988; Andrae et al., 2001) but was not applied here as it limits the number of bags simultaneously present in the rumen. Conditioning method also had significant effects on ruminal degradation of fresh and maize silage measured in situ. Fine-grinding samples have been shown to increase the rapidly-degradable fraction, partly due to an increase in soluble and insoluble particle losses through the pores of the bags. Other studies (Cerneau and Michalet-Doreau, 1991; Philippeau and Michalet-Doreau, 1998; Whadwa et al., 1998) suggest that finely-grinding samples could

increase rapidly-degradable fraction (a), part of which is lost through the pores of the bags. This explains why DM, starch and aNDF degradability were significantly higher in dried samples ground to 1 mm than in the other two conditionings. Coarse-grinding (FG samples) also enhances starch degradability due to a higher subsequent degradation rate. One explanation for the faster degradation rate (c) of starch in FG samples was that the FG samples were not dried. Indeed, it cannot be ruled out that in dried samples (D1 and D4), a proportion of the protein from the matrix protecting the starch granule could have coagulated in response to heating at 60°C for 72 h. This protein matrix coagulation could have limited the accessibility of starch to microbial enzymes and thus explain the lower starch degradation of dried samples (D1 and D4).

In contrast, FG conditioning was associated with the lowest aNDF degradability. The FG conditioning simulated soaked chewed particles during ingestion (Fernandez and Michalet-Doreau, 2002) but failed to take into account the essential chewing during rumination that reduces particle size to facilitate aNDF degradability by microbial enzymes (Beauchemin and Yang, 2005). Contrary to D1 and D4, the coarse grinding of the FG conditioning is likely insufficient to make aNDF accessible to microbial enzymes, which would explain the lower aNDF degradation of FG samples. As highlighted by Andrae et al. (2001), particle size has a variable effect on aNDF degradation measured in situ. For example, Johnson et al. (2002) found that ruminal NDF disappearance tended to increase when corn silage was mechanically processed whereas Bal et al. (2000) showed that NDF disappearance was unaffected by processing.

4.3 Effect of hybrid and maturity stage on ruminal degradation

In line with previous reports, hybrid (Verbic et al., 1995; Ngonyamo-Majee et al., 2009) and maturity stage (Correa et al., 2002; Johnson et al., 2002; Ramos et al., 2009) both had

significant effects on the ruminal degradation of maize (especially starch). The significantly higher DM degradability of hybrid FD can be related to its higher starch content due to a higher proportion of ears in the whole plant. Hybrid FD, characterized by flint-dent grains and richest in starch, also showed significantly higher starch degradability than hybrid F (but only at maturity stage 2). One hypothesis is that grain structure (determining the starch degradation rate) has an effect on the ruminal starch degradability. At equal proportions of corn grain DM, flint dent-grain hybrid is more starch-degradable than flint-grain hybrid (according to Philippeau and Michalet-Doreau, 1997). Flint-grain starch granules are wrapped in protein aggregates and embedded in a dense matrix that limits the action of hydrolytic enzymes (Phillipeau and Michalet-Doreau, 1997). This could be the reason why flint corn showed lower degradability than flint-dent corn. aNDF showed the same trend, with hybrid FD (less rich in aNDF than hybrid F) posting the highest degradability.

This study clearly confirmed the decrease in whole-plant DM degradation with increasing maturity stage, regardless of hybrid, in agreement with Phillipeau and Michalet-Doreau (1997) and Jensen et al. (2005). Starch degradation reproduced this hybrid-independent decrease, whereas aNDF degradation showed no effect of maturity stage. The greater rapidly-degradable fraction means that the higher ruminal starch degradability of maize harvested at early stage could be explained by a low core grain vitreousness. Philippeau and Michalet-Doreau (1998) effectively showed that immature (stage 1) grain with lower vitreousness has higher starch degradability than mature (stage 2) grain. The vitreous endosperm characterizing flint corn grows with stage of maturity and will thus limit the action of hydrolytic enzymes as soon as the plant becomes relatively mature (Philippeau and Michalet-Doreau, 1997).

5. Conclusions

Ensiling increased the ruminal degradation of maize DM. This difference in favour of silage seemed to be due to a higher degradability and degradation rate of starch, since fibre degradation was lower in ensiled than fresh maize. This may be explained by proteolysis during the ensilage process that promotes the solubilization of starch granules, and by silage acidity that enhances the hydrolysis of hemicellulose in the aNDF fraction. The insights reported here make it clear that using fresh-plant samples to evaluate maize silage degradability will underestimate starch degradability, although fresh samples are far more convenient than silage samples for large screening trials on multiple varieties. This study confirms that sample conditioning method has a significant effect on starch and aNDF degradability measurements. Drying at 60°C and grinding samples at 4 mm (the ‘D4’ conditioning here) looks to be a good compromise for the in situ study of maize forage, as it limits early-degradation-process starch losses and ensures sufficient availability of cell walls for reliably measuring aNDF degradability. Furthermore, this method reproduces differences in degradability between hybrids and maturity stages that are consistent with the literature, and it could thus be proposed as a benchmark method for in situ studies of starch-rich forages.

Acknowledgements

The authors thank the staff at the INRA’s Les Cèdres experimental unit for technical assistance and animal care, the RAPA lab at UMRH (INRA) for handling chemical analyses and preparing the samples, Elodie Watremez (Masters degree student) for assistance with data analysis, and the French seed companies Union (‘UFS’) and the National federation of sorghum and maize seed producers (FNPSMS) for providing financial support. We also thank ARVALIS (and especially the technical team at La Jaillière experimental farm) for their work on growing, harvesting and ensiling the maize crop.

References

- Andrae, J.G., Hunt, C.W., Pritchard, G.T., Kennington, L.R., Harrison, J.H., Kezar, W., Mahanna, W., 2001. Effect of hybrid, maturity, and mechanical processing of corn silage on intake and digestibility by beef cattle. *J. Anim. Sci.* 79, 2268-2275.
- Bal, M.A., Shaver, R.D., Shinnors, K.J., Coors, J.G., Lauer, J.G., Straub, R.J., Koegel, R.G., 2000. Stage of maturity, processing, and hybrid effects on ruminal in situ disappearance of whole-plant corn silage. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 86, 83-94.
- Baron, V.S., Stevenson, K.R., Buchanan-Smith, J.G., 1986. Proteolysis and fermentation of corn-grain ensiled at several moisture levels and under several stimulated storage methods. *Can. J. Anim. Sci.* 66, 451-461.
- Beauchemin, K.A., Yang, W.Z., 2005. Effects of physically effective fibre on intake, chewing activity, and ruminal acidosis for dairy cows fed diets based on corn silage. *J. Dairy. Sci.* 88, 2117-2129.
- Benton, J.R., Klopfenstein, T.J., Erickson, G.E., 2005. Effects of corn moisture and length of ensiling on dry matter digestibility and rumen degradable protein. *Nebraska Beef Cattle Reports*: 31–33. University of Nebraska–Lincoln.
- Cerneau, P., Michalet-Doreau, B., 1991. In situ starch degradation of different feeds in the rumen. *Reprod. Nutr. Dev.* 31, 65-72.
- Correa, C.E., Shaver, R.D., Pereira, M.N., Lauer, J.G., Kohn, K., 2002. Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. *J. Dairy. Sci.* 85, 3008-3012.
- Dhanoa, M.S., 1988. On the analysis of dacron bag data for low degradability feeds. *Grass. Forage. Sci.* 43, 441-444.
- Der Bedrosian, M.C., Nestor Jr, K.E., Kung Jr, L., 2012. The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. *J. Dairy. Sci.* 95, 5115-5126.

- 457 Dulphy, J.P., Demarquilly, C., Henry, M., 1975. [Perte de composés volatils lors de la
458 détermination à l'étuve de la teneur en matière sèche des ensilages]. Ann. Zootech. 24, 743-
459 756.
- 460 Dulphy, J.P., Demarquilly, C., Baumont, R., Jailler, M., L'Hotelier, L., Dragomir, C., 1999.
461 Study of modes of preparation of fresh and conserved forage samples for measurement of
462 their dry matter and nitrogen degradations in the rumen. Ann. Zootech. 48, 275-288.
- 463 Fernandez, I., Michalet-Doreau, B., 2002. Effect of maturity stage and chopping length of
464 maize silage on particle size reduction in dairy cows. Anim. Res. 51, 445-454.
- 465 Gibbons, B.C., Wang, X., Larkins, B.A., 2003. Altered starch structure is associated with
466 endosperm modification in quality protein maize. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100,
467 15329-15334.
- 468 Hoffman, P.C., Esser, N.M., Shaver, R.D., Coblenz, W., Scott, M.P., Bodnar, A.L., Schmidt,
469 R., Charley, B., 2011. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-
470 protein matrix in high-moisture corn. J. Dairy. Sci. 94, 2465-2474.
- 471 ISO-15914, 2004. Animal feeding stuffs—Enzymatic determination of total starch content.
472 International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- 473 Jensen, C., Weisbjerg, M.R., Norgaard, P., Hvelpund, T., 2005. Effect of maize silage maturity
474 on site of starch and NDF digestion in lactating dairy cows. Anim. Feed. Sci. Tech. 118,
475 279-294.
- 476 Johnson, L.M., Harrison, J.H., Davidson, D., Swift, M., Mahanna, W.C., Shinnors, K., 2002.
477 Corn silage management II: effects of hybrid, maturity, and mechanical processing on
478 digestion and energy content. J. Dairy. Sci. 85, 2913-2927.
- 479 Jurjanz, S., Monteils, V., 2005. Ruminant degradability of corn forages depending on the
480 processing method employed. Anim. Res. 54, 3-15.
- 481 McAllister, T.A., Philippe, R.C., Rode, L.M., Cheng, K.J., 1993. Effect of the protein matrix

- 482 on the digestion of cereal grains by ruminal microorganisms. *J. Anim. Sci.* 71, 205-212.
- 483 Mertens, D.R., 1993. Kinetics of cell wall digestion and passage in ruminants, in: Jung, H.G.,
484 Buxton, D.R., Hatfield, R.D., Ralph, J. (Eds.), *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*.
485 American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and the Soil Science
486 Society of America, Madison, Wisconsin, pp. 535-570.
- 487 Nocek, J.E., 1988. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy
488 digestibility: a review. *J. Anim. Sci.* 71, 2051-2069.
- 489 NRC-National Research Council, 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*, seventh ed.
490 National Academic Science, Washington, DC, USA.
- 491 Ngonyamo-Majee, D., Shaver, R.D., Coors, J.G., Sapienza, D., Lauer, J.G., 2009. Influence of
492 single-gene mutations, harvest maturity and sample processing on ruminal in situ and post-
493 ruminal in vitro dry matter and starch degradability of corn grain by ruminants. *Anim. Feed.*
494 *Sci. Tech.* 151, 240-250.
- 495 NorFor–The Nordic Feed evaluation system, 2011, in: Volden, H. (Ed.), Wageningen
496 Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.
- 497 Nozière, P., Michalet-Doreau, B., 1996. Validation of in sacco method: influence of sampling
498 site, nylon bag or rumen contents on fibrolytic activity of solid-associated microorganisms.
499 *Anim. Feed. Sci. Tech.* 57, 203-210.
- 500 Nozière, P., Michalet-Doreau, B., 2000. In Sacco methods, in: D’Mello, J.P.F. (Ed.), *Farm*
501 *Animal Metabolism and Nutrition*. CAB International., Oxon, UK, pp. 233-253.
- 502 Opsi, F., Borreani, G., Tabacco, E., Lopez, S., 2013. Influence of cultivar, sowing date and
503 maturity at harvest on yield, digestibility, rumen fermentation kinetics and estimated
504 feeding value of maize silage. *J. Agric. Sci.* 151, 740-753.
- 505 Ørskov, E. R., Mc Donald, J., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from
506 incubation measurement weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.* 92, 499-503.

- 507 Philippeau, C., Michalet-Doreau, B., 1997. Influence of genotype and stage of maturity of
508 maize on rate of ruminal starch degradation. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 68, 25-35.
- 509 Philippeau, C., Michalet-Doreau, B., 1998. Influence of genotype and ensiling of corn grain
510 on in situ degradation of starch in the rumen. *J. Dairy. Sci.* 81, 2178-2184.
- 511 Prigge, E.C., Baker, M.J., Varga, G.A., 1984. Comparative digestion, rumen fermentation and
512 kinetics of forage diets by steers and wethers. *J. Anim. Sci.* 59, 237-245.
- 513 Ramos, B.M.O., Champion, M., Poncet, C., Mizubuti, I.Y., Nozière, P., 2009. Effects of
514 vitreousness and particle size of maize grain on ruminal and intestinal in sacco degradation
515 of dry matter, starch and nitrogen. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 148, 253-266.
- 516
- 517 Rooney, L.W., Pflugfelder, R. L., 1986. Factors affecting starch digestibility with special
518 emphasis on sorghum and corn. *J. Anim. Sci.* 63, 1607-1623.
- 519 SAS Inc., 2003. SAS ® User's Guide: Statistics, Version 9.1 Edition. SAS Inc., Cary, NC,
520 USA.
- 521 Staples, C.R., Fernando, R.L., Fahey, G.C., Berger, L.L., Jaster, E.H., 1984. Effects of intake
522 of a mixed diet by dairy steers on digestion events. *J. Dairy. Sci.* 67, 995-1006.
- 523 Udén, P., Robinson, P.H., Mateos, G.G., Blank, R., 2012. Use of replicates in statistical
524 analyses in papers submitted for publication in *Animal Feed Science and Technology*.
525 *Anim. Feed. Sci. Tech.* 171, 1-5.
- 526 Van Duinkerken, G., Blok, M.C., Bannink, A., Cone, J.W., Dijkstra, J., Van Vuuren, A.M.,
527 Tamminga, S., 2011. Update of the Dutch protein evaluation system for ruminants: the
528 DVE/OEB2010 system. *J. Agric. Sci.* 149, 351-367.
- 529 Van Soest, P.J., Wine, R.H., 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV
530 Determination of plant cell-wall constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 50, 50-55
- 531 Verbic, J., Stekar, J.M.A., Resnik-Cepon, M., 1995. Rumen degradation characteristics and

- 532 fibre composition of various morphological parts of different maize hybrids and possible
533 consequences for breeding. Anim. Feed. Sci. Tech. 54, 133-148.
- 534 Verité, R., Peyraud, J.L., 1989. Protein: The PDI system, in: Jarrige, R. (Ed.), Ruminant
535 Nutrition: recommended allowances and feed tables, John Libbey Eurotext, Paris-London-
536 Rome, pp. 33-47.
- 537 Wadhwa, M., Dharam, P., Kataria, P., Bakshi, M.P.S., 1998. Effect of particle size of corn
538 grains on the release of nutrients and in sacco degradability. Anim. Feed. Sci. Tech. 72, 11-
539 17.
- 540 Weinberg, Z.G., Chen, Y., 2013. Effects of storage period on the composition of whole crop
541 wheat and corn silages. Anim. Feed. Sci. Tech. 185, 196-200.

Chapitre 3

Influence de la conservation en ensilage, du stade de maturité et de la variété sur la dégradation ruminale *in situ* de la matière sèche, de l'amidon et des parois végétales du maïs fourrage

(Article en preparation pour Animal)

Influence de la conservation en ensilage, du stade de maturité et de la variété sur la dégradation ruminale *in situ* de la matière sèche, de l'amidon et des parois végétales du maïs fourrage

J. Peyrat^{a,b,c}, A. Férard^c, P. Nozière^{a,b}, E. Meslier^c, A. Le Morvan^{a,b}, P.V. Protin^c, and R. Baumont^{a,b}

^a INRA, UMR1213 Herbivores, Site de Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

^b Clermont Université, VetAgro Sup, UMR Herbivores, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^c ARVALIS–Institut du Végétal, Station expérimentale de la Jaillière, 44370 La Chapelle-Saint-Sauveur, France

Résumé

L'ensilage de maïs, principale source d'énergie dans les rations des ruminants à haut niveau de production, représente un enjeu économique important. La nature de l'énergie apportée aux animaux par l'ensilage de maïs dépend de la dégradabilité de l'amidon et des parois végétales dans le rumen. Ces paramètres de dégradation peuvent toutefois varier selon différents facteurs. Dans cette étude, l'effet de la conservation en ensilage, du stade de maturité et du type de variété sur la dégradabilité du maïs fourrage a été mesuré *in situ*.

Quatre variétés de maïs (F1, F2, FD, and D) ont été récoltées à quatre stades de maturité différents sur deux années consécutives. Les échantillons de maïs en vert ont été prélevés avant la mise en silo et les échantillons d'ensilages de maïs ont été collectés dans les silos après 6 semaines de fermentation. Tous les échantillons, séchés et broyés à 4 mm, ont été introduits dans des sachets de nylon puis ont été incubés dans le rumen de 3 vaches à différents temps d'incubation : 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h et 72 h. L'influence de la conservation en ensilage, du stade de maturité, de la variété et de l'année de récolte sur la dégradation de la matière sèche, de l'amidon et du NDF dans le rumen a été analysée avec la procédure MIXED de SAS.

La dégradabilité théorique de la MS (ED_{4DM}) était significativement plus élevée ($P < 0.01$) pour les ensilages de maïs que pour les maïs en vert en raison d'une fraction rapidement

dégradable plus importante (a) ($P < 0,01$). Alors que la dégradabilité théorique du NDF ($ED2_{NDF}$) était équivalente quel que soit le mode de conservation ($P = 0,25$), la dégradabilité de l'amidon ($ED6_{Starch}$), comme pour $ED4_{DM}$, était plus élevée ($P < 0,01$) pour les ensilages de maïs que pour les maïs en vert. La dégradabilité théorique de la MS a diminué avec l'avancement de la maturité en raison d'une fraction rapidement dégradable plus faible (a) ($P < 0,01$) aux stades tardifs. Les dégradabilités de l'amidon et du NDF ont également diminué avec l'augmentation de la maturité. La variété FD, riche en amidon, a eu une $ED4_{DM}$ significativement plus élevée ($P < 0,01$) que celles des autres variétés notamment en raison de sa fraction rapidement dégradable plus élevée. La dégradabilité du NDF de la variété FD a également été plus élevée ($P < 0,01$) pour la variété FD que pour les autres variétés. La variété D à grain denté est la variété qui a eu la dégradabilité de l'amidon la plus importante ($P < 0,01$). Cette étude montre que la dégradabilité de l'amidon est plus élevée pour les ensilages de maïs que pour les maïs en vert alors que la dégradabilité du NDF est équivalente quel que soit le mode de conservation. La plus faible dégradabilité de l'amidon aux stades tardifs peut être due à une augmentation de la vitrosité du grain, limitant l'attaque du grain par la population microbienne du rumen. La texture dentée du grain, caractérisée par une matrice protéique fine, favorise une meilleure dégradabilité de l'amidon. Les différences de DINAG entre les variétés ainsi que l'organisation et la structure des composés pariétaux propre à chaque variété, peut expliquer la variabilité de la dégradabilité du NDF selon le type variétal. En conclusion, le stade de maturité et le type de variété doivent être pris en compte afin d'estimer précisément la dégradabilité de la fraction énergétique de l'ensilage de maïs nécessaire à l'élaboration des rations alimentaires. Étant donné que le mode de conservation a une forte influence sur la dégradabilité de l'ensilage de maïs dans le rumen, il semble préférable d'évaluer la dégradabilité *in situ* du maïs fourrage à partir d'échantillons d'ensilage et non de maïs en vert.

Influence of silage conservation, maturity and hybrid on *in situ* rumen degradation of dry matter, starch and fibre in the whole plant of maize

J. Peyrat^{a,b,c}, A. Férard^c, P. Nozière^{a,b}, E. Meslier^c, A. Le Morvan^{a,b}, P.V. Protin^c, and R. Baumont^{a,b}

^a INRA, UMR1213 Herbivores, Site de Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

^b Clermont Université, VetAgro Sup, UMR Herbivores, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^c ARVALIS–Institut du Végétal, Station expérimentale de la Jaillière, 44370 La Chapelle-Saint-Sauveur, France

Running head: *In situ* degradability of maize silage constituents

Abstract

Maize silage often provides the main source of energy in the diet of high-yielding ruminants, which makes it a key economic element. The nature of available energy provided by maize silage to animal depends on the ruminal degradability of starch and cell-wall fractions. However, these degradation parameters could be affected by several factors. In this study, we investigated the effects of ensiling, maturity stage and type of hybrids on *in situ*-measured degradability of maize forage. Four maize hybrids (F₁, F₂, FD, and D) were harvested at four maturity stages over two years. Fresh material were sampled before ensiling and silage after 6 weeks of conservation. All samples were dried and ground at 4mm, nylon-bagged and incubated in the rumen of three cows at six incubation times (2, 4, 8, 24, 48 and 72h). Effects of silage conservation, maturity stage, hybrid and year of harvest were analyzed on DM, starch and NDF degradation parameters using MIXED procedure of SAS. Effective dry matter degradability (ED_{4DM}) increased significantly (P<0.01) with ensiling due to a higher proportion of rapidly degradable fraction (a) (P<0.01). While the NDF effective degradability (ED_{2NDF}) was not different regardless conservation method (P=0.25), the effective starch degradability (ED_{6Starch}) was higher (P<0.01) for maize silage than for fresh maize, as ED_{4DM}. The ED_{4DM} decreased with increasing maturity due to lower (P<0.01) proportion of rapidly degradable fraction (a) at late maturity stage; the ED_{2NDF} and the ED_{6Starch} followed the same

trend. The hybrid FD rich in starch had significantly higher ED_{4DM} (P<0.01) due to higher proportion of rapidly fraction (a), and the ED_{2NDF} was also the highest (P<0.01) for this hybrid. Hybrid D with dent grain was the hybrid with the highest (P<0.01) starch effective degradability. This study showed that ensiling increases starch effective degradability compared to fresh plant and does not modify NDF degradability. The lower degradability of starch at late stage of maturity could be mainly explained by the increase in vitreousness involving resistance of grain against microbial activity in the rumen. The grain dent texture is characterized by thin protein matrix and enables higher starch effective degradability. Differences in DINAG and in structure and organisation of cell-wall components could explain variability of NDF degradability among hybrids. In conclusion, maturity stage and the type of hybrid have to be taken into account to estimate the degradability of energy fractions of maize silage and their implications for diet formulation. As ensiling modifies degradation parameters in the rumen, measuring *in situ* degradation of ensiled samples is preferable to evaluate the degradability of maize silage.

Keywords: *in situ* degradation, maize silage, forage conservation, maturity stage, hybrids

Implications

Maize silage is widely used to feed high-yielding ruminants. Energy supplies represent an important economic issue due to their impact on animal health and meat or milk production. This study quantifies the influence of maturity stage and of type of hybrid on the degradation parameters in the rumen of maize silage starch and cell walls and emphasizes the importance of these factors in maize silage's diet formulation. The study also assessed the influence of ensiling process on degradation parameters.

Introduction

Maize silage is an important source of energy and is widely used in the diet formulation for high-yielding ruminants such as dairy cows and fattening animals. The rate and extent of degradation of maize silage fractions in the rumen determines largely the quantity, the site of digestion and the nature of energy (starch or fibre) available for animal. However, the degradation of the whole plant maize silage and its energy fractions in the rumen, can vary strongly with hybrid as showed by Tovar-Gomez *et al.* (1997) in stalk maize and Philippeau *et al.* (1998) in grain maize. Maturity stage can also induced variation in degradability of maize silage as reported by Philippeau and Michalet-Doreau (1997) in maize grain and by Khan *et al.* (2014) in the whole plant of maize. To authors knowledge's, no studies on the *in situ* degradation of maize forage focused on maturity over 40% of whole plant dry matter (DM) whereas with practices change and climatic warming, maize are sometimes harvested over 40% of DM. The analysis of *in situ* degradation in the rumen is needed to characterise OM truly digested in the rumen, which provide substrate for microbial protein synthesis (Sauvant and Nozière, 2013). Moreover, Beauchemin and Yang (2005) showed that high starch fermentation could reduce ruminal pH increasing the risk of digestive disorders, and so involve negative consequences for health and production of animals.

To evaluate digestibility of maize silage, actual equations predict digestibility of fresh maize using parameters measured on fresh samples. Indeed, the sampling of fresh maize allow estimation of energy value before silo-bags opening. Moreover, Andrieu and Demarquilly (1974) showed that organic matter digestibility of maize silage was equivalent to that of fresh maize. However, Peyrat *et al.* (2014) found that ensiling can modify *in situ* DM, starch and NDF degradability of maize silage. Thus, it is important to evaluate the impact of ensiling on the maize silage degradability in the rumen in order to control the nature of energy available

80 **Table 1**81 *Growing conditions and chemical composition of maize before ensiling*

	Stage of maturity (M)				Hybrid (H)				Year of harvest (Y)	
	1	2	3	4	F ₁	F ₂	FD	D	2011	2012
Climatic conditions										
Temperature sum from sowing (T _S , °C) ¹	1394	1471	1547	1740	1538	1538	1538	1538	1511	1565
Temperature sum from flowering (T _F , °C) ²	512	589	665	850	701	678	636	596	665	643
Average rainfall (sum of mm) throughout :										
-the entire growing cycle	-	-	-	-	-	-	-	-	268	566
-the last two months of growing cycle	-	-	-	-	-	-	-	-	47	231
Growing characteristics										
Ear/ whole plant (%)	55	59	62	67	60	60	63	59	63	58
Dry matter of ear fraction (%)	39	45	48	54	49	45	47	45	46	47
Dry matter of stem-leaf fraction (%)	20	23	23	26	22	23	25	22	22	24
Chemical composition										
Dry matter (g/kg fresh matter)	266	316	331	391	330	318	346	309	325	327
NDF (g.kg ⁻¹ DM)	436	403	399	404	406	423	396	417	397	424
ADF (g.kg ⁻¹ DM)										
Starch (g.kg ⁻¹ DM)	284	323	355	387	336	307	364	344	367	308
Crude Protein (g.kg ⁻¹ DM)	74	72	70	70	72	71	72	72	76	67

82 ¹ Temperature sum from sowing to harvest (T_S) = $\sum_{\text{Sowing}}^{\text{Harvest}} \left[\frac{\text{Max } T^{\circ} - \text{Min } T^{\circ}}{2} - 6^{\circ}\text{C} \right]$ (the temperature equal to 6°C represents the vegetation zero for maize)83 ² Temperature sum from flowering to harvest (T_F) = $\sum_{\text{Flowering}}^{\text{Harvest}} \left[\frac{\text{Max } T^{\circ} - \text{Min } T^{\circ}}{2} - 6^{\circ}\text{C} \right]$ (the temperature equal to 6°C represents the vegetation zero for maize)

for animals and accurately estimation of maize silage feed value. This study performed *in situ* degradation of DM whole plant, starch and cell walls (NDF) of maize silage and their corresponding fresh material over two contrasted climatic years,. The aim of this study was to assess, from a large database, the effect of conservation, maturity at harvest and hybrids on the degradability parameters measured *in situ*.

Material and methods

The experiment was conducted in compliance with national legislation on animal care (French Ministry of Agriculture-issued Certificates of Authorization to Experiment on Living Animals, Nos. 63-30 and 63-158). The experimental protocol was approved by the Pays de Loire regional institutional review board for animal experimentation, under No. CE-146.

Growing conditions of maize hybrid and sample conditioning

Four maize hybrids were grown and harvested at the ARVALIS–Institut du Végétal, experimental farm in north-western France (47° 27' 6.25N; 0° 57' 58.37W). These hybrids were chosen for their different grain texture i.e. flint to flint-dent grain (F₁ and F₂), flint-dent grain (FD) and dent (D) but also among differences in DINAG defined by Argilier et Barrière (1996): DINAG + for F₁ and FD and DINAG – for F₂ and D. The hybrids were harvested at four stages of maturity from milk-dough stage below 300 g.kg⁻¹ of DM to vitreous stage over 400 g.kg⁻¹ of DM (Table 1). The experiment was repeated over two years, in 2011 and 2012. Late massive rains, cold temperature and light deficit characterized the year 2012 during grain maturation whereas 2011 recorded constant water provision from sowing to harvest and warm temperature around flowering (Table 1). Irrigation was applied in 2011 and 2012 to avoid excessive water deficit⁵, especially in 2012 where the water summer (July-august) deficit was

⁵ Water deficit (mm)= Rainfall + Irrigation - Potential Evapotranspiration (PET)

equal to 74mm whereas in 2011, an excess of 13mm was recorded. In order to characterize growth and maturity of maize, some criteria were noted before harvest as temperature sum from sowing or from flowering, percentage of ear in the whole plant, dry matter of ear and stem-leaf fraction (Table 1). Maize was harvested using a precision-chop silage harvester [Class Jaguar 680 with a 4-row maize header and maize-corn cracker (3mm roll clearance); Class, Bury St., Edmonds, UK] at a stubble height of 15 to 20 cm. The day of harvest, representative samples of the fresh non-ensiled material were snap-frozen and stored at -20°C, and the rest was ensiled in bags (under anaerobic conditions). In each bags, representative sample of maize silage was taken after 6 week of fermentation. Then, samples of silages and corresponding fresh material were dried (72h at 60°C) and grounds through a 4mm sieve (Retsch Mill, SM100) as recommended by Peyrat *et al.* (2014). For each of 64 maize samples (4 hybrids x 4 stages of maturity x 2 types of conservation x 2 year of harvest), 3g DM were introduced in nylon bags (5x10 cm, measured porosity 42µm, R510 Ankom ® Technology, Macedon, NY).

Ruminal incubation and experimental design

Three non-lactating rumen fistulated Holstein cow, in individual metabolic crates, were used for *in situ* incubations. The animals were fed with daily diets composed of 45% maize silage, 23% hay and 32% concentrates. Diet was offered to animals to supply their basal needs (50% at 8 a.m. and 50% at 4 p.m. after bags). Cows were also supplemented with 100g/ day of a vitamins and minerals mixture.

The *in situ* incubations were performed on the three cows over eight trials containing a control sample. Each trial contained 8 modalities: 1 hybrid, 1 year of harvest with the four maturity stages and the two types of conservation. During one week, one cow received the bags with previous modalities, repeated following week. Finally, for each sample (1 hybrid, 1

year of harvest, 1 maturity stage and 1 type of conservation), 6 repetitions were available (3 cow x 2 weeks of measure considerate as “runs” according to Udén *et al.*, 2012).

The nylon bags were inserted into the rumen before the morning meal and removed after 2, 4, 8, 24, 48 and 72h of incubation. After removal from the rumen, bags were rinsed in cold water, washed three times for 5 min over in a washing machine, then dried at 60°C during 72h and weighed in order to determine dry matter disappearance. Before to determine chemical composition of dry matter residuals, the 6 repeated bags (3 cows x 2 runs) were pooled, ground through a 1mm sieve for NDF analysis and through a 0.5 mm sieve for starch analysis.

Chemical analysis

After 6 weeks to ensure even fermentation, liquor from silages were sampled from mixture of each bags in order to analyse pH and fermentation products: Volatile Fatty Acid (VFA), alcohol, Lactic acid and ammonia nitrogen (N-NH₃). According to Dulphy and Demarquilly (1981), alcohol and VFA were analysed by gas chromatography, NH₃-N was determined by Conway method and Lactic acid was analysed by Noll method.

The DM content of fresh and maize silages was determined by drying at 80°C for 48 h, and DM content of silages was corrected from losses of volatile fermentation products (Dulphy *et al.*, 1975). Starch content was determined by enzymatic method (ISO 15914:2004). NDF and ADF content were determined according to Van Soest and Wine (1967) using an Ankom system (Ankom® Tech. Co., Fairport, NY). For NDF determination a heat-stable amylase was used without addition of sodium sulphite. ADF residues were obtained after boiling with ADF reagent and were expressed with residual ash. For the 384 nylon bags residues (64 samples x 6 times incubation), starch and NDF content was estimated using near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS). For that, all residues were scanned in a NIRsystems 6500 monochromator (Foss NIRSystems, Silver Spring, MD) and laboratory determinations were

performed on a subset of 233 residues for starch and 247 residues for NDF, all selected from their spectra. The statistical parameters of the prediction model (standard error of calibration, standard error of cross-validation and coefficient of determination) were $SE_C = 2.72$ (g/kg DM), $SE_{cv} = 2.94$ (g/kg DM) and $r^2 = 0.92$ for starch and $SE_C = 2.53$ (g/kg DM), $SE_{cv} = 2.73$ (g/kg DM) and $r^2 = 0.96$ for NDF.

Data analysis

For each of the 64 samples, the kinetics of DM, starch and NDF disappearance was calculated for each cow, each repetition and each incubation times. The DM degradation was fitted to an exponential model according to the method described below by Ørskov and Mc Donald (1979):

$$D(t) = a + b(1 - e^{-ct})$$

where $D(t)$ is proportion (%) disappeared at time t (h), a is proportion of rapidly degradable fraction (%), b is a proportion of potentially degradable fraction (%) and c is the degradation rate (h^{-1}).

The effective degradability of DM ($ED4_{DM}$) was then calculated as:

$$DT = a + \frac{(b \times c \ e^{(-kp)})}{(c + kp)}$$

where a , b and c are as described above and kp is the particle outflow assumed to equal $0.04 \ h^{-1}$ (DM has effectively moderate time delay and slow degradation during its passage in the rumen, in accordance with Mertens, 1993).

The same method was applied to calculate the effective degradability of starch and NDF. However, sum of fraction a and fraction b , from adjustments of starch and NDF, was often higher than 100%, underlining difficulty to adjust kinetic of starch and NDF ruminal degradation. Therefore, the effective starch and NDF degradation were calculated with the step by step method (Kristensen *et al.*, 1982), assuming a particle outflow rate of $0.06 \ h^{-1}$ for starch (with short time delay during its passage in the rumen and fast degradation rate,

181 **Table 2**

182 Effect of maturity, hybrid, year of harvest and theirs interactions on chemical composition of maize silage (g.kg⁻¹ DM, except for DM expressed in g.kg⁻¹ of fresh
 183 matter; N=32)

	Stage of maturity (M)				Hybrid (H)				Year of harvest (Y)		RSD	Significance					
	1	2	3	4	F ₁	F ₂	FD	D	2011	2012		M	H	Y	M*H	M*Y	H*Y
Dry matter	283 ^a	328 ^b	337 ^b	407 ^c	339 ^b	330 ^{ab}	362 ^c	324 ^a	333 ^a	345 ^b	13.4	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05
NDF	405 ^c	366 ^b	357 ^b	336 ^a	375 ^b	393 ^c	331 ^a	364 ^b	335 ^a	397 ^b	19.9	<0.01	<0.01	<0.01	0.68	0.84	<0.01
ADF	214 ^c	192 ^b	188 ^b	174 ^a	197 ^b	210 ^c	169 ^a	194 ^b	170 ^a	215 ^b	11.3	<0.01	<0.01	<0.01	0.72	0.45	<0.01
Starch	276 ^a	320 ^b	355 ^c	414 ^d	334 ^b	307 ^a	382 ^c	341 ^b	376 ^b	305 ^a	24.9	<0.01	<0.01	<0.01	0.72	<0.01	<0.01

184

185 For each effect (M, H, or Y) values, means with different superscript letters in the same row are significantly different at P < 0.05 (Tukey Test)

Mertens, 1993) and 0.02 h^{-1} for NDF (with long time delay during its passage in the rumen and slow degradation rate, Mertens, 1993).

Statistical analysis

Effects of maturity stage (M), hybrid (H), year of harvest (Y) and their interactions (MxH, MxY, HxY) on the chemical composition of maize samples were analyzed as fixed effects with the GLM procedure of SAS (9.1 version, 2003). The two repetitions of each sample were averaged. A total of 192 observations (4 hybrids x 4 maturity stage x 2 types of conservation x 2 year of harvest x 3 cows) were used for analysis of variance on *in situ* degradation parameters. Effects of conservation method (C), maturity stage (M), hybrid (H), year of harvest (Y) and their interactions (CxM, CxH, CxY, MxY, MxH, HxY) on degradation parameters were analyzed as fixed effects and animal as random effect using the MIXED procedure of SAS. Normality of all data distribution was verified using the UNIVARIATE procedure of SAS. Significant differences were set at $P < 0.05$ from Tukey-Kramer test.

Results

Fermentation characteristics and chemical composition of the maize samples

Fermentation characteristics of ensiled samples were consistent with current references (INRA, 2007): pH ranged between 3.7 ± 0.1 for the second stage of maturity to 3.9 ± 0.2 for the fourth stage of maturity. The content in N-NH_3 did not exceed $5.3 \pm 1.8 \%$ of N total measured for the third stage of maturity. The content in alcohols, VFA and lactic acid decreased from 17.2 ± 9.9 , 13.2 ± 2.4 and $42.8 \pm 9.4 \text{ g/kg DM}$ respectively for the first stage of maturity to 8.5 ± 6.4 , 7.1 ± 1.9 and $31.6 \pm 8.9 \text{ g/kg DM}$ respectively for the fourth stage of maturity. Maturity, hybrid and year of harvest had significant effects on DM, NDF, ADF and starch contents (Table 2). There were also interactions between maturity and hybrid on DM content, interactions between maturity and year effect on DM and starch content and

Table 3Effect of conservation, maturity, hybrid, year of harvest and theirs interactions on *in situ* degradability of the maize silage (N=192)

	Conservation (C)		Stage of maturity (M)				Hybrid (H)				Year of harvest (Y)		RSD	P value			
	Fresh	Silage	1	2	3	4	F ₁	F ₂	FD	D	2011	2012		C	M	H	Y
ED4 _{DM} ^A	0.58 ^a	0.62 ^b	0.63 ^c	0.62 ^c	0.60 ^b	0.56 ^a	0.56 ^a	0.58 ^b	0.65 ^d	0.62 ^c	0.60	0.60	0.015	<0.01	<0.01	<0.01	0.06
(a) _{DM} ^B	0.22 ^a	0.30 ^b	0.32 ^d	0.29 ^c	0.25 ^b	0.19 ^a	0.18 ^a	0.24 ^b	0.34 ^d	0.29 ^c	0.25 ^a	0.28 ^b	0.014	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
(b) _{DM} ^C	0.66 ^b	0.58 ^a	0.55 ^a	0.59 ^b	0.64 ^c	0.71 ^d	0.72 ^c	0.63 ^b	0.57 ^a	0.57 ^a	0.67 ^b	0.57 ^a	0.020	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
(c) _{DM} ^D	0.051	0.050	0.055 ^c	0.052 ^{bc}	0.051 ^b	0.044 ^a	0.048 ^a	0.047 ^a	0.050 ^a	0.056 ^b	0.047 ^a	0.054 ^b	0.006	0.13	<0.01	<0.01	<0.01
ED6 _{Starch} ^E	0.65 ^a	0.67 ^b	0.74 ^d	0.66 ^c	0.64 ^b	0.58 ^a	0.59 ^a	0.62 ^b	0.69 ^c	0.72 ^d	0.64 ^a	0.67 ^b	0.018	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Deg4h _{Starch} ^F	0.44 ^a	0.45 ^b	0.55 ^c	0.45 ^b	0.45 ^b	0.32 ^a	0.34 ^a	0.40 ^b	0.51 ^c	0.53 ^d	0.46 ^b	0.45 ^a	0.024	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Deg24h _{Starch} ^G	0.84 ^a	0.89 ^b	0.94 ^c	0.86 ^b	0.85 ^b	0.80 ^a	0.84 ^b	0.82 ^a	0.86 ^c	0.93 ^d	0.83 ^a	0.90 ^b	0.019	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
ED2 _{NDF} ^H	0.56	0.56	0.57 ^b	0.57 ^b	0.56 ^b	0.53 ^a	0.53 ^a	0.55 ^b	0.60 ^d	0.56 ^c	0.56 ^a	0.56 ^b	0.021	0.25	<0.01	<0.01	<0.05
Deg4h _{NDF} ^I	0.13 ^a	0.15 ^b	0.14 ^b	0.15 ^b	0.12 ^a	0.14 ^b	0.07 ^a	0.12 ^b	0.22 ^d	0.14 ^c	0.12 ^a	0.16 ^b	0.021	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Deg48h _{NDF} ^J	0.65 ^b	0.63 ^a	0.66 ^b	0.65 ^b	0.64 ^b	0.61 ^a	0.62 ^a	0.62 ^a	0.68 ^b	0.63 ^a	0.66 ^b	0.62 ^a	0.021	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Deg72h _{NDF} ^K	0.72 ^b	0.70 ^a	0.72 ^b	0.71 ^{ab}	0.71 ^{ab}	0.71 ^a	0.69 ^a	0.69 ^a	0.76 ^c	0.71 ^b	0.74 ^b	0.68 ^a	0.014	<0.01	<0.05	<0.01	<0.01

^A Effective degradability of DM (%) calculated by the model of Ørskov and McDonald, 1979 (assuming a particle outflow rate of 0.04 h⁻¹)^B (a): rapidly degradable fraction (%) calculated by the model of Ørskov and McDonald, 1979^C (b): potentially degradable fraction (%) calculated by the model of Ørskov and McDonald, 1979^D (c): rate of degradation (per h) calculated by the model of Ørskov and McDonald, 1979^E Effective degradability of starch (%) calculated with step by step method of Kristensen et al, 1982 (assuming a particle outflow rate of 0.06 h⁻¹)^{F,G} Starch degradability (%) at respectively 4h and 24h of incubation^H Effective degradability of NDF (%) calculated with step by step method of Kristensen et al, 1982 (assuming a particle outflow rate of 0.02 h⁻¹)^{I,J,K} NDF degradability (%) at respectively 4h, 48h and 72h of incubation

For each effect (C, M, H, or Y) values, means with different superscript letters in the same row are significantly different at P < 0.05 (Tukey Test)

interactions between hybrid and year effects on DM, NDF, ADF and starch contents. Starch content increased with stage of maturity from 276 to 414 g/kg DM whereas NDF content decreased from 405 to 336 g/kg DM and ADF content decreased from 214 to 174 g/kg DM. Hybrid FD was richer in starch ($P<0.01$) than hybrid F_1 and hybrid D (both equivalent, $P=0.79$) and starch content was the lowest for hybrid F_2 , as it was observed in the fresh plant sampled before ensiling (see Table 1). NDF content showed the opposite trend: hybrid FD had lower ($P<0.01$) NDF and ADF contents than hybrid F_1 and hybrid D (both equivalents, $P=0.26$ for NDF and $P=0.32$ for ADF) and was the lowest ($P<0.01$) for hybrid FD (Table 2). Regular rainfall, warm temperature and high light around growing (see table 1) during the year 2011 favoured higher starch content in maize silage than the year 2012 (Table 2). The DM and NDF content were higher in 2012.

Rumen degradation of dry matter

Effective DM degradability (ED_{4DM}) was higher for maize silage than for fresh maize ($P<0.01$) regardless maturity, hybrid and year of harvest (Table 3, Figure 1a). This was mainly related to the higher ($P<0.01$) proportion of rapidly-degradable fraction (a) for silage than for fresh maize. Conversely, the fraction (b) was lower ($P<0.01$) for maize silage. No significant differences ($P=0.13$) were found in the degradation rate (c) between silage and fresh maize.

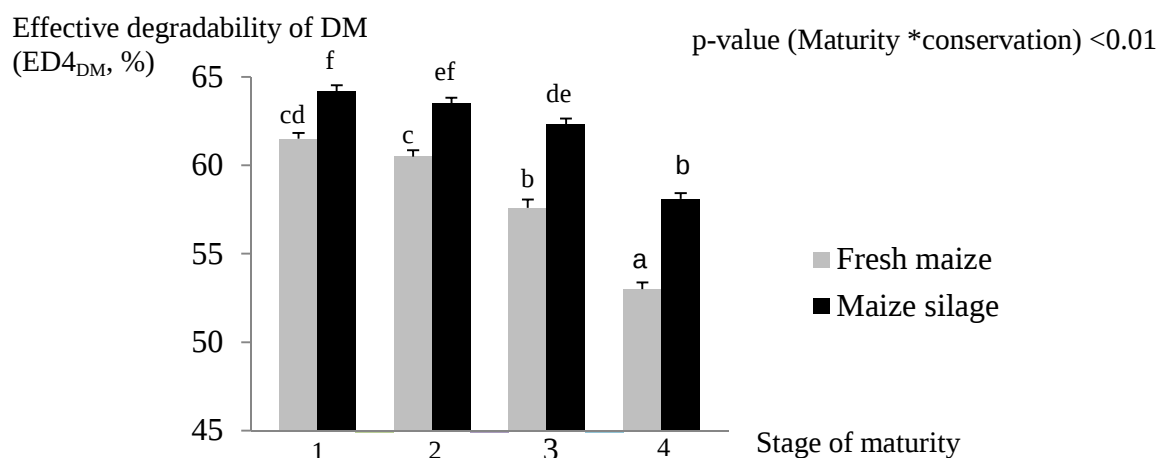


Figure 1a: Effect of conservation and stage of maturity on dry matter degradability

The ED_{4DM} decreased with maturity from 0.63 to 0.56 especially from second to the last maturity stage, regardless hybrid, conservation and year of harvest (Table 3, Figure 2a). The fraction (a) and the degradation rate (c) followed the same trend with decrease by respectively 0.13 and 0.01h⁻¹ between first and last stage of maturity. Inversely correlated to (a), the fraction (b) showed an increase of 0.16 with stage of maturity.

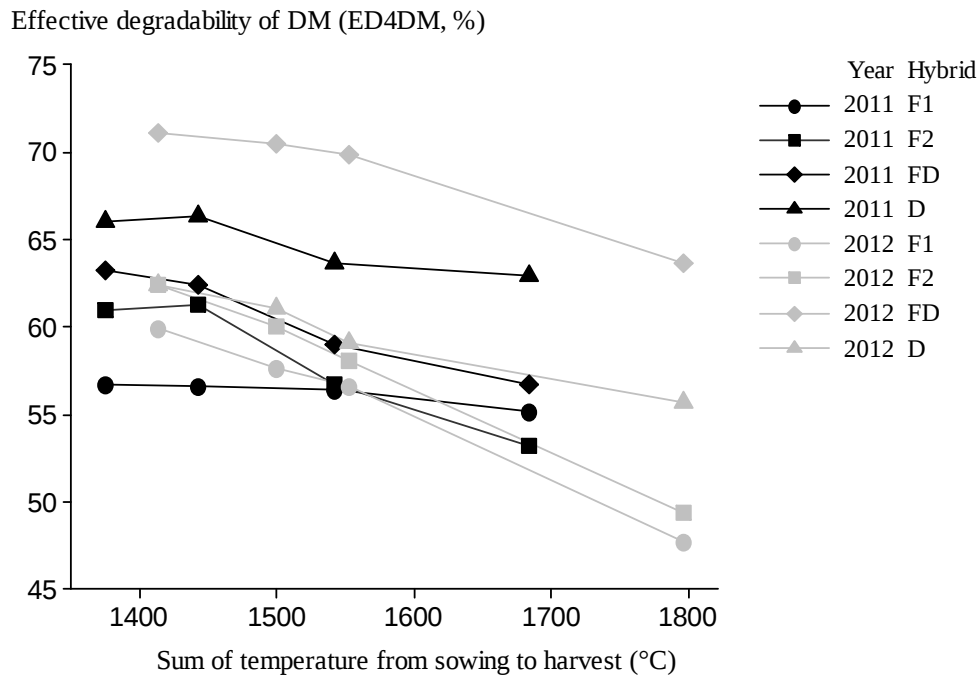


Figure 2a: Effect of stage of maturity (represented by sum of temperature) and hybrid, over two years, on dry matter degradability

In 2011, for all maturity stages and type of conservation, hybrid FD had higher ED_{4DM} than hybrid D (P<0.01), followed by hybrid F₂ (P<0.05), and hybrid F₁ had the lowest (P<0.01) (Table 3, Figure 2a). This result was mainly related with higher proportion of fraction (a) for hybrid FD than for the others hybrids of 2011(P<0.01). Fraction (b) showed the opposite trend whereas (c) was not significantly different between hybrids in 2012 (P>0.10). However, in 2012, it was hybrid D that had the highest ED_{4DM}, followed by hybrid FD (P<0.01), hybrid F₂ (P<0.01) and then hybrid F₁ (P<0.01). It was also mainly related to fraction (a) that showed

the same result whereas (b) found the opposite trend for hybrids compared to 2012. No difference ($P>0.10$) was observed on the degradation rate (c) between hybrid of 2012.

For fresh maize, the $ED4_{DM}$ tended to be higher in 2012 than in 2011 ($p=0.06$) whereas no differences was found for maize silage ($p=0.99$). The fraction (a) and the degradation rate (c) of fresh maize were also higher ($P<0.01$) in 2012 than in 2011. Conversely, the fraction (b) of fresh maize had higher ($P<0.01$) $ED4_{DM}$ in 2011 than in 2012.

Rumen degradation of starch

For DM, the effective degradability of starch ($ED6_{Starch}$) was higher ($P<0.01$) for ensiled than fresh maize (Table 3). However, the difference was significant only in 2011. This result was mainly related to degradation of starch at 24h, which was higher ($P<0.01$) for silage than fresh maize in 2011. A modest but significant increase was also observed with ensiling for degradation at 4h. Moreover, the average $ED6_{Starch}$ was higher ($P<0.01$) for ensiled than fresh maize for all maturity stages except for second stage of maturity ($P=0.54$, Figure 1b).

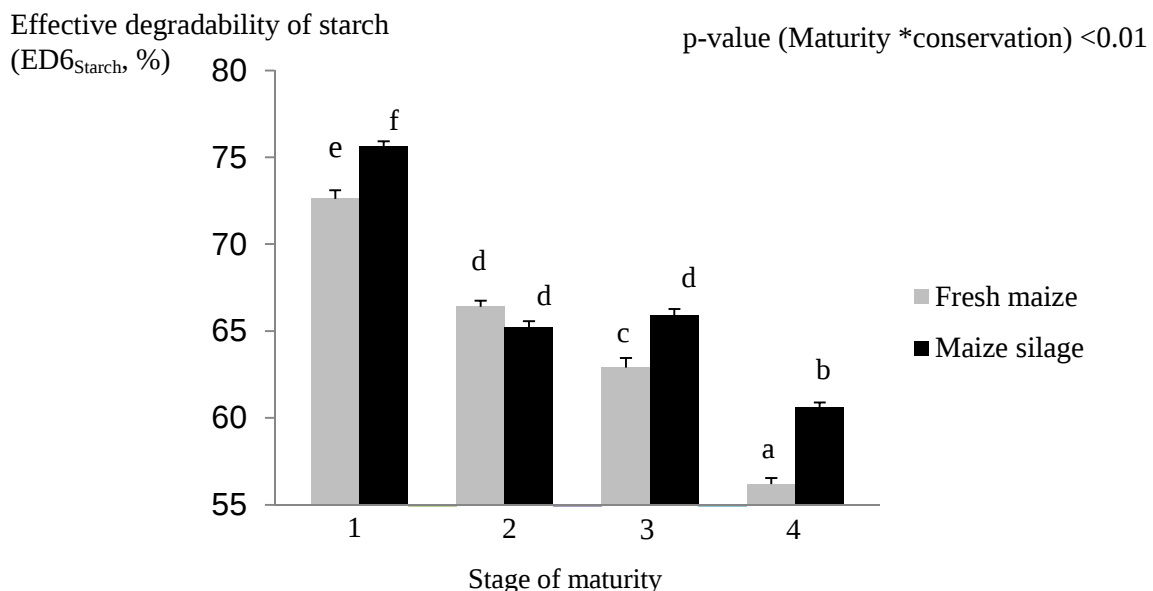


Figure 1b: Effect of conservation and stage of maturity on starch degradability

The ED6_{Starch} decreased by 0.16 among the first and the last maturity stage, regardless hybrid, year of harvest or type of conservation (Table 3, Figure 2b). The degradation at 4h and at 24h also decreased with advancing maturity.

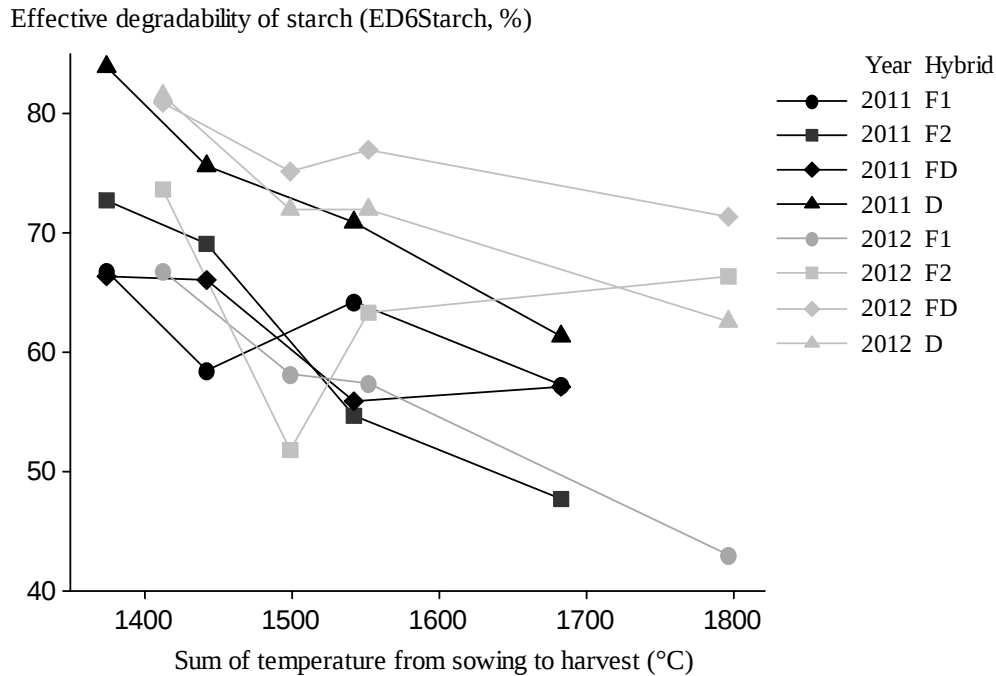


Figure 2b: Effect of stage of maturity (represented by sum of temperature) and hybrid, over two years, on starch degradability

Contrary to DM, average starch degradability was higher ($P<0.01$) for hybrid D than hybrid FD ($P<0.01$), followed by hybrid F₂ ($P<0.01$) and was the lowest for hybrid F₁ ($P<0.01$). Nevertheless, this trend was affected by the year of harvest. In 2011, the ED6_{Starch} was the highest for hybrid D ($P<0.01$), whereas in 2012, it was highest for hybrid FD, followed by hybrid D, hybrid F₂ and was lowest for hybrid F₁. For each year of harvest, the degradation of starch at 4h and at 24h followed the same trend than ED6_{Starch}; except in 2011, where the degradation at 4h for hybrid F₂ wasn't different than that of hybrid FD.

In average, the ED6_{Starch} in 2012 was higher ($p<0.01$) than in 2011 (Table 3). The starch degradation at 24h was the highest in 2012 whereas for short degradation at 4h, the starch degradation in 2012 was slightly lower ($p<0.01$) than in 2011.

Rumen degradation of NDF

Unlike DM and starch, the effect of conservation was no significant ($P>0.05$) on effective degradability of NDF (ED_{2NDF}) (Table 3, Figure 1c). Nevertheless, difference of ED_{2NDF} between silage and fresh maize was observed for some hybrids: ED_{2NDF} of maize silage was lower than that of fresh maize for hybrid F₂ ($P<0.01$). For hybrid D, the ED_{2NDF} was higher for silage ($P<0.05$). Contrary to ED_{2NDF} , the effect of conservation was significant on degradation at 4h, 48h and 72h. At 4h (short-time), degradation of NDF was higher for silage than for fresh maize whereas at 48h and 72h (long-time), degradation of NDF was the highest for fresh maize (Table 3).

Effective degradability of NDF
(ED_{2NDF} , %)

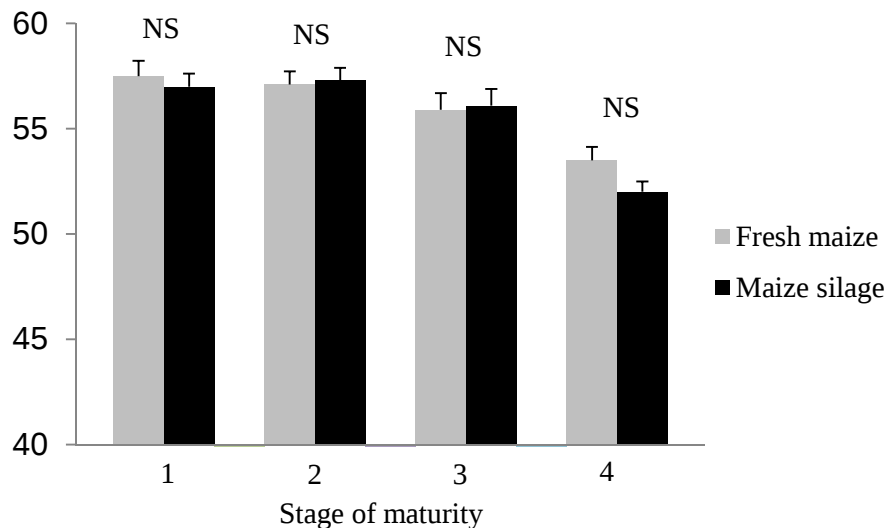


Figure 1c: Effect of conservation and stage of maturity on NDF degradability

As for DM and starch, the average ED_{2NDF} decrease with maturity but it was significant only between third and fourth stage of maturity ($P<0.01$) (Table 3). The degradation at 48h was also lower ($P<0.01$) compared to the first and the third maturity stage (all equivalent, $P>0.10$). At short incubation time (4h), the NDF degradation was rather constant whereas at very long-time degradation (72h), a significant decrease of NDF degradability was observed between

extreme maturity stages (1 and 4). However, this decrease of NDF degradation at 72h was not observed for all hybrids and harvesting year (Figure 2c).

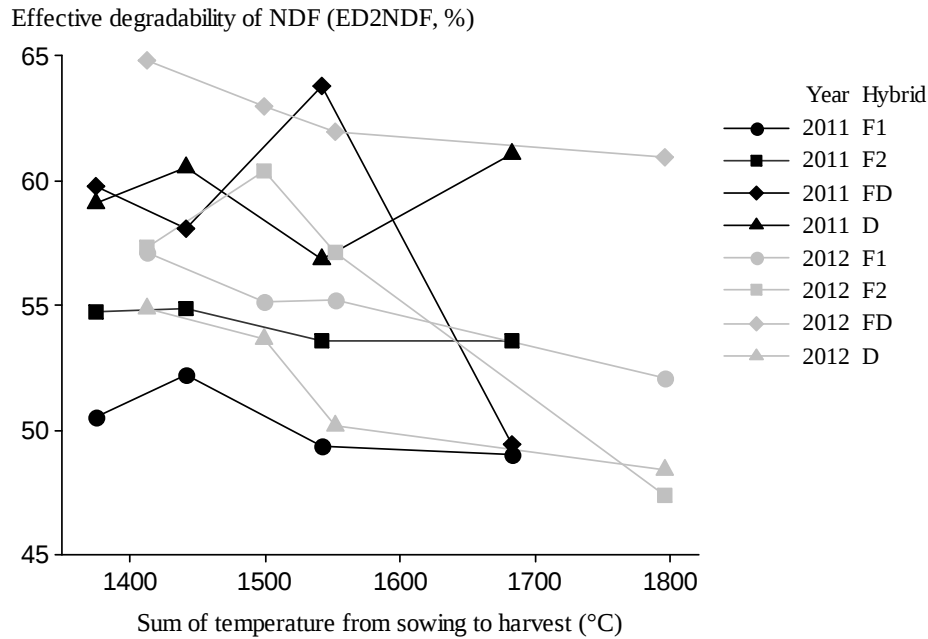


Figure 2c: Effect of stage of maturity (represented by sum of temperature) and hybrid, over two years, on NDF degradability

The $ED2_{NDF}$ was higher for hybrid FD ($P<0.01$), followed by hybrid D and F_2 (both equivalent, $P=0.18$), and it was the lowest ($P<0.01$) for hybrid F_1 (Table 3). The degradation at 4h followed the same trend except that hybrid D had higher starch degradation than hybrid F_2 . At 48h, hybrid FD had the highest NDF degradation ($P<0.01$) than that of hybrid D, F_1 and F_2 (all equivalents, $P>0.10$). At 72h, the degradation of NDF was the highest for hybrid FD ($P<0.01$), followed by hybrid D ($P<0.01$) and was the lowest ($P<0.01$) for hybrid F_1 and F_2 (both equivalent, $P=0.99$). The ranking of $ED2_{NDF}$ among hybrids also changed across years: in 2011, the hybrid D had the highest $ED2_{NDF}$.

As for starch and DM, the $ED2_{NDF}$ was higher in 2012 ($P<0.01$) than in 2011 due to higher NDF degradation at short-time (4h) in 2012 than in 2011. But from 48h, NDF degradation became higher for maize of year 2011 than that of 2012.

Discussion

The objective of this study was to assess the effects of silage conservation, maturity stage and hybrids on DM, starch and NDF degradability of maize. The discussion of the results is therefore mainly focused on the effect of these three factors and the interactions with the climatic conditions expressed by the year effect will be also considered.

Effect of conservation

The increase of dry matter degradability (ED_{4DM}) with ensiling is explained, in this study by higher rapidly degradable fraction (a) of maize silage compared to fresh maize. This result is also consistent, with higher degradation of starch and NDF at short incubation time (4h) for maize silage than for fresh maize. Indeed, a partial hydrolysis of the protein matrix encapsulating starch granules occurs during fermentation process of silage, involving higher microbial activity around starch granules of maize silage (Baron *et al.*, 1986). Others authors showed also that the starch is degraded more rapidly in silage than in the corresponding green material (Philippeau and Michalet-Doreau, 1998; Peyrat *et al.*, 2014). In agreement with Jurjanz and Monteils (2005), the higher degradation of NDF fraction at 4h for silage could be explained by the partial hydrolysis of hemicellulose in silage, which increases the ability of NDF fraction in silage, to be degraded.

Even though starch was more degraded for maize silage compared to fresh maize for long time incubation (especially in 2011 where climatic conditions were in favour of grain maturation), the degradation of NDF after 48h or 72h was higher for fresh maize than fresh plant. As suggested previously (Peyrat *et al.*, 2014), the remaining NDF in silage (after hydrolysis of hemicellulose) are probably less degradable than the NDF in fresh plant, explaining why maize silage was more degradable at short time but lower at long time compared to fresh plant. Finally, contrary to ED_{4DM} and $ED_{6Starch}$, the ED_{2NDF} was unaffected

by ensiling. Few studies have showed an effect of conservation on NDF effective degradability. Whereas Peyrat *et al* (2014) showed that *in situ* NDF degradability was higher for silage, Weinberg and Chen (*in vitro*, 2013) and Jurjanz and Monteils (*in situ*, 2005) found the opposite trend. In this study, opposite variation at short and long time of degradation, as explained above, could have caused absence of effect of conservation as silage on ED2_{NDF}.

Effect of maturity stage

The whole plant DM degradability decreased with increasing maturity stage, especially from second to the last stage of maturity which is in agreement with Philippeau and Michalet-Doreau (1997) and Jensen *et al.* (2005),. This decline was mainly associated to the decline of rapidly degradable fraction and degradation rate which were the lowest at late stage of maturity. The decrease of whole plant DM degradability was also associated to the fall of starch degradability (-16 points) between the first and the last stage of maturity. This significant drop of starch degradability was mainly observed after 4h of bags incubation. Philippeau and Michalet-Doreau (1998) and Philippeau *et al.* (1999) explained the lower level of starch degradation at late maturity stage by the increase of vitreousness during grain maturation. Indeed, Philippeau and Michalet-Doreau (1997) showed a negative correlation between grain vitreousness and starch degradability ($R^2=0.86$). Ngonyamo-Majee *et al.* (2009) showed negative correlation between grain vitreousness and DM degradability ($R^2=0.82$). With increasing maturity and higher vitreousness, grain moisture decreases and grain is getting more compact and harder (physical barrier) which results in increasing of protein matrix embedded starch granules (chemical barrier) (Philippeau *et al.*, 2000). These changes in grain structure with maturity and vitreousness affect microbial colonisation and so starch degradation in the rumen (Mc Allister *et al.*, 1990).

The NDF degradability ($ED2_{NDF}$) decreased also with increasing maturity but within a lower range compared to DM and starch. The significant decrease in NDF degradability for the last maturity stage was observed from 48h incubation time. Sutton *et al.* (2000) and Jensen *et al.* (2005) showed that lower NDF degradability of maize silage harvested at late maturity stage was due to a long lag time prior to degradation starts

Effect of hybrid

Due to higher proportion of rapidly degradable fraction, hybrid FD had significantly higher DM degradability, which was also related with its higher starch content in relation to higher proportions of ears in the whole plant. Hybrid D, characterized by dent grains and lower starch content than hybrid FD, had the highest starch degradability. Contrary to flint or flint-dent grain, the protein matrix of dent grain embedded starch granules is very thin and therefore allows higher degradability of starch in the rumen (Philippeau and Michalet-Doreau, 1997; Philippeau *et al.*, 2000). At each incubation times, NDF degradability was higher for hybrid FD (less rich in NDF than the others hybrids) as observed for DM. The structure and organisation of cell-wall components in maize silage could explain genetic variability of NDF digestibility in the total tract (Barrière *et al.*, 2005). Variations in NDF degradability in the rumen (the main site of NDF digestion) could also be affected by the structure of cell-wall components. The DINAG parameters by Argilier et Barrière (1996), which differs among hybrids, could explain variability of NDF degradability. The hybrid FD with the highest DINAG (58.3%) had effectively the higher NDF degradability than the hybrids F1, F2 and D that have low DINAG (respectively 54%, 52% and 54%). Cone and Engels (1993) found also that lignin content and strong linkage among lignin and other constituents of NDF were involved in decreased of NDF whole tract digestibility.

Climatic conditions, characterized in this study by the year of harvest, had an important impact on the degradability between hybrids. Indeed, regardless climatic conditions, the ranking of hybrids on DM and starch degradability changed. The year 2012, characterized by late rainfall and low temperature, led to highest DM and starch degradability for hybrid D, in agreement with Randjelovic *et al.* (2011).

Conclusions

The effective degradability of DM, starch and NDF varies among maturity stage, type of hybrid and silage conservation (except for NDF). The degradation of whole-maize DM and starch in the rumen increases with ensiling. These results confirm that evaluation methods for nutritional value of maize should be based on silage analysis to remain close as real feeding conditions of ruminants. This study makes it clear that the decrease of DM degradability with the stage of maturity is mainly related to the degradability of the starch fraction and to a lesser extent of the NDF fraction. The type of hybrid can also modify the degradability of starch and cell-wall. For hybrids of this study, the hybrid with dent grain (D) had the highest starch degradability. Moreover, the hybrid with the highest DINAG had also the highest NDF degradability. The significant interactions of harvest year with other factors (maturity, hybrid and conservation) on degradation parameters show that it is important to observe effect of climatic conditions in the nutritive value evaluation of maize silage. Maturity stage and type of starch must be therefore well-reasoned in order to ensure the efficiency of starch and NDF degradation in the rumen and therefore provide a balanced source of energy from maize silage.

Acknowledgements

The authors thank the staff at ARVALIS experimental farm (La Jaillière) for their work on growing, harvesting and ensiling the maize crops but also for technical assistance, animal

cares and preparation of samples. We also thank the RAPA lab at UMRH-INRA (F. Anglard, F. Picard, A. Quereuil) for handling chemical analyses and preparing the samples, Sonia Roger (Masters degree student) for assistance with chemical analyses and data analysis, and the French seed companies union ('UFS') and national federation of sorghum and maize seed producers (FNPSMS) for their financial support.

References

- Argillier O, Barrière Y 1996. Valeur alimentaire et inscription des variétés de maïs ensilage aux catalogues officiels en Europe. *Fourrages* 146, 131–140.
- Barrière Y, Alber D, Dolstra O, Lapierre C, Motto M, Ordas A, Van Waes J, Vlaswinkel L, Welcker C, Monod JP 2005. Past and prospects of forage maize breeding in Europe. 1. The grass cell wall as a basis of genetic variation and future improvements in feeding value. *Maydica* 50,259-274.
- Baron VS, Stevenson KR, Buchanan-Smith JG 1986. Proteolysis and fermentation of corn–grain ensiled at several moisture levels and under several stimulated storage methods. *Canadian Journal of Animal Science* 66, 451–461
- Cone JW, Engels FM 1993. The influence of ageing on cell wall composition and degradability of three maize genotypes. *Animal Feed Science and Technology* 40, 331-342.
- Der Bedrosian MC, Nestor Jr KE, Kung Jr L 2012. The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. *Journal of Dairy Science* 95, 5115-5126.
- Dulphy JP, Demarquilly C and Henry M 1975. Perte de composés volatils lors de la détermination à l'étuve de la teneur en matière sèche des ensilages. *Annales de Zootechnie* 24, 743-756.

- 488 Dulphy JP, Demarquilly C 1981. Problèmes particuliers aux ensilages. In Prévion de la
489 valeur nutritive des aliments, 81-104. INRA Edition, Paris, France.
- 490 INRA 2007. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux. Valeur des
491 aliments. In Tables INRA 2007, 307p. Editions Quæ, Paris, France.
- 492 ISO-15914 2004. Animal feeding stuffs-enzymatic determination of total starch content.
493 International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- 494 Jensen C, Weisbjerg MR, Norgaard P, Hvelplund T 2005. Effect of maize silage maturity on
495 site of starch and NDF digestion in lactating dairy cows. *Anim. Animal Feed Science and*
496 *Technology*. 118, 279–294.
- 497 Jurjanz S, Monteils V 2005. Ruminant degradability of corn forages depending on the
498 processing method employed. *Anim. Res.* 54, 3–15.
- 499 Khan NA., Yu P, Ali M, Cone JW, Hendriks WH 2014. Nutritive value of maize silage in
500 relation to dairy cow performance and milk quality. *Journal of the Science of Food and*
501 *Agriculture* (DOI 10.1002/jsfa.6703)
- 502 Kristensen ES, Moller PD, Hvelplund T 1982. Estimation of the effective protein
503 degradability in the rumen of cows using the nylon bag technique combined with the
504 outflow rate. *Acta Agriculturae Scandinavica* 32, 123-127
- 505 McAllister TA, Philippe RC, Rode LM, Cheng KJ 1993. Effect of the protein matrix on the
506 digestion of cereal grains by ruminal microorganisms. *Journal of Animal Science* 71, 205-
507 212.
- 508 Mertens DR 1993. Kinetics of cell wall digestion and passage in ruminants. In: ASA-CSSA-
509 SSSA. (Eds), Forage cell wall structure and digestibility Vol 21, Madison, USA, 535-570
- 510 Ngonyamo-Majee D, Shaver RD, Coors JG, Sapienza D, Lauer JG 2009. Influence of single-
511 gene mutations, harvest maturity and sample processing on ruminal in situ and post-

- 512 ruminal in vitro dry matter and starch degradability of corn grain by ruminants. *Animal*
513 *Feed Science and Technology* 151, 240-250.
- 514 Ørskov ER, Mc Donald J 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from
515 incubation measurement weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural*
516 *Science* 92, 499-503
- 517 Peyrat J, Nozière P, Le Morvan A, Férard A, Protin PV, Baumont R 2014. Effects of ensiling
518 maize and sample conditioning on in situ rumen degradation of dry matter, starch and
519 fibre. *Animal Feed Science and Technology* (DOI 10.1016/j.anifeedsci.2014.06.017)
- 520 Philippeau C and Michalet-Doreau B 1997. Influence of genotype and stage of maturity of
521 maize on rate of ruminal starch degradation. *Animal Feed Science and Technology* 68, 25–
522 35.
- 523 Philippeau C, Michalet-Doreau B 1998. Influence of genotype and ensiling of corn grain on in
524 situ degradation of starch in the rumen. *Journal of Dairy Science* 81, 2178-2184.
- 525 Philippeau C, Landry J, Michalet-Doreau B 1998. Influence of the biochemical and physical
526 characteristics of the maize grain on ruminal starch degradation. *Journal of Agricultural*
527 *and Food Chemistry* 46(10), 4287-4291.
- 528 Philippeau C, Le Deschault de Monredon F, Michalet-Doreau B 1999. Relationship between
529 ruminal starch degradation and the physical characteristics of corn grain. *Journal of*
530 *Animal Science* 77, 238-243.
- 531 Philippeau C, Landry J, Michalet-Doreau B 2000. Influence of the protein distribution of
532 maize endosperm on ruminal starch degradability. *Journal of the Science of Food and*
533 *Agriculture* 80, 404-408
- 534 Randjelovic V, Prodanovic S, Tomic Z, Bijelic Z and Simic A 2011. Genotype and year effect
535 on grain yield and nutritive values of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Animal and*
536 *Veterinary Advances* 10, 835-840.

- 537 SAS Inc 2003. SAS®User's Guide: Statistics, Version 9.1 Edition. SAS Inc., Cary, NC.
- 538 Sutton JD, Cammell SB, Phipps RH, Beever DE, Humphries DJ 2000. The effect of crop
539 maturity on the nutritional value of maize silage for lactating dairy cows: 2. Ruminant and
540 post-ruminal digestion. *Animal Science* 71, 391-400.
- 541 Tovar-Gomez MR., Emile JC., Michalet-Doreau B, Barrière Y 1997. *In situ* degradation
542 kinetics of maize hybrid stalks. *Animal Feed Science and Technology* 68(1-2), 77-88.
- 543 Udén P, Robinson PH, Mateos GG, Blank R 2012. Use of replicates in statistical analyses in
544 papers submitted for publication in *Animal Feed Science and Technology*. *Animal Feed*
545 *Science and Technology* 171, 1-5.
- 546 Van Soest PJ and Wine RH 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV
547 Determination of plant cell-wall constituents. *Journal of Association of Official Analytical*
548 *Chemists* 50, 50-55.
- 549 Weinberg ZG, Chen Y 2013. Effects of storage period on the composition of whole crop
550 wheat and corn silages. *Animal Feed Science and Technology* 185, 196-200.
- 551

Chapitre 4

**Effets du stade de maturité en interaction avec
la variété sur la digestion ruminale et intestinale
de l'ensilage de maïs chez la vache laitière tarie**

(Article soumis dans Journal of Dairy Science)

Effets du stade de maturité en interaction avec la variété sur la digestion ruminale et intestinale de l'ensilage de maïs chez la vache laitière tarie

J. Peyrat*, R. Baumont*, A. Le Morvan* and P. Nozière*

RÉSUMÉ

Les objectifs de cette étude étaient d'analyser l'effet de la maturité sur le niveau de digestion de l'amidon, du NDF et des protéines et sur la fermentation microbienne dans le rumen de vaches nourries avec différentes variétés d'ensilages de maïs. Quatre vaches Holstein taries, équipées de canules au niveau du rumen et du duodénum, ont reçu quatre ensilages de maïs différant selon le type de variété (variété à grain corné noté F vs variété à grain corné-denté noté FD) et selon le stade de maturité (précoce vs tardif). Les traitements ont été appliqués selon un dispositif expérimental en carré latin 4x4. Bien que les différences de digestibilité observées entre les variétés soient relativement faibles dans l'ensemble du tube digestif (entre 99,3 et 99,7%), la digestibilité de l'amidon dans le rumen a fortement diminué ($P<0,01$) de 91,3% à 86,5% entre le stade précoce et le stade tardif, doublant ainsi le flux d'amidon au duodénum. Le type de variété n'a pas modifié l'évolution de la digestibilité de l'amidon dans le rumen avec la maturité. Aucun effet du stade de maturité, de la variété et de leur interactions n'a été observé sur la digestion du NDF, sur la digestibilité de l'azote dans le rumen, sur la digestibilité réelle de la MO dans le rumen et sur la synthèse microbienne. Bien que le pH n'ait pas varié avec les traitements, la concentration en ammoniac et en AGV totaux dans le rumen ont augmenté significativement avec l'avancement du stade de maturité (respectivement $P<0,01$ et $P=0,07$). En conclusion, cette étude montre que le stade de maturité à la récolte modifie les proportions d'amidon et de NDF digestible disponible pour l'animal. Les maïs récoltés à des stades tardifs peuvent augmenter la proportion d'amidon digéré dans le rumen d'au moins 50% sans affecter le fonctionnement du rumen. Notre étude montre donc que la récolte de l'ensilage de maïs à des stades tardifs, modifiant la composition chimique et la vitesse de dégradation ruminale du maïs, représente un enjeu important pour améliorer les stratégies de récolte de l'ensilage et de rationnement des animaux.

Interpretive Summary

Advancing stage of maturity of corn silage at harvest strongly increases starch content and decreases starch digestibility in the rumen. The combination of increased rumen-digestible starch and incomplete intestinal digestion leads to more starch present in feces. Substitution between rumen-digestible starch vs NDF induces no significant variation in OM truly digested in the rumen and microbial synthesis but induces changes in the profile of nutrients from rumen fermentation. Harvest strategies should be devised to modulate the amount and nature of energy provided by corn silage to animals and thus to improve diet formulations.

DIGESTION OF MAIZE SILAGE AMONG HYBRIDS AND MATURITY

Effect of maturity and its interaction with hybrid on ruminal and intestinal digestion of corn silage in dry cows

J. Peyrat^{*†}, R. Baumont^{*}, A. Le Morvan^{*} and P. Nozière^{*}

^{*} INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle and Clermont Université, VetAgro Sup, UMR Herbivores, BP 10448, F-63000, Clermont-Ferrand, France

[†] ARVALIS–Institut du Végétal, Station Expérimentale de la Jaillière, 44370 La Chapelle-Saint-Sauveur, France

Corresponding author: Pierre Nozière, UMR 1213 Herbivores, INRA Theix, 63122 St Genès Champanelle, France, phone number: 33 (4) 73 62 46 86; email: pierre.noziere@clermont.inra.fr

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of stage of maturity at harvest on extent of starch, NDF and protein digestion and rumen fermentation in dry cows fed whole-plant corn silage differing among hybrids. Four non-lactating Holstein cows cannulated at rumen and proximal duodenum levels were fed four corn silages differing in corn type (flint hybrid ‘F’ vs flint-dent hybrid ‘FD’) and maturity stage (early vs late) in a 4x4 Latin-square design. Although total tract digestibility showed relatively small differences with increasing maturity

(ranging from 94.5 to 99.7%), rumen degradability of starch decreased significantly ($P < 0.01$) from 91.3 to 86.5% and therefore, with high increasing starch content, led to doubled starch duodenal flows between early and late-maturity silages. The decrease in starch rumen digestibility with increasing maturity was similar for both hybrids. There were no effects of maturity, hybrid and their interaction on NDF digestion. There was no significant maturity stage $\times$ hybrid interaction on N and OM true digestion in the rumen, or on microbial synthesis. Increasing stage of maturity significantly increased rumen ammonia, total volatile fatty acid concentrations and acetate/propionate ratio ($P < 0.01$, $P = 0.07$, and $P < 0.01$, respectively) but not pH. This study concludes that delaying date of harvest strongly modifies the respective proportions of digestible starch vs NDF supplied to cattle. Late-harvesting corn for silage can increase the amount of rumen-digested dietary starch by up to 50% without affecting rumen function. Our findings show that changing corn composition and degradation rates with increasing plant maturity is a key factor for better harvesting and animal rationing strategies.

Key words. Corn silage, ruminal digestion, starch, NDF

INTRODUCTION

The high ingestibility and energy density of corn silage makes it the main source of energy in the winter diets of high-yielding ruminants like lactating cows. Whole-plant proportions of the two energy fractions vary greatly with stage of maturity at harvest, type of hybrid, and climatic conditions (Opsit et al., 2013), ultimately changing the type of energy provided to the animal by corn silage. Rumen starch digestion plays a big role by providing energy for microbial growth and propionate as a glucose precursor for milk synthesis, but rumen NDF digestion also plays a role by helping reduce rumen fill and ensure good rumen function. Research shows that fast starch fermentation can reduce ruminal pH, inhibit fiber digestibility and thereby increase the risk of digestive disorders (Beauchemin and Yang, 2005). To gain

deeper insight into the variability of corn digestion in cattle, studies have investigated effects of genotype (Verbic et al., 2005; Taylor and Allen, 2005), nature of cereal (Huntington, 1997) and grain processing (Johnson et al., 2002; Fernandez et al., 2004) on rumen starch digestion, and these effects were recently quantified in sacco (Lopes et al., 2009; Ali et al., 2014) and in vitro (Tang et al., 2011; Opsi et al., 2013). Nevertheless, the majority of in vivo studies available have only focused on starch from experimental diets associating corn silage and concentrates. To our knowledge, the effect of stage of maturity has never been measured in diets where corn silage is the sole source of starch. Another issue is the lack of nutritive value references on corn silage with recent hybrids harvested at late maturity, which have become the mainstay of on-farm practices. In addition, further advances in feed unit systems hinge on acquiring more knowledge on the starch degradation of forages to gain a better grasp of OM truly digested in the rumen and microbial protein supply (Van Duinkerken et al., 2011; Volden, 2011; Sauvant and Nozière, 2013). Here we designed a study to quantify the effect of stage of maturity on amount of starch and plant cell-wall digested in the rumen and intestines and their impacts on microbial N flow and on OM truly digested in the rumen.

MATERIAL AND METHODS

The experiment was led at the INRA's (National Institute for Agricultural Research) 'Saint-Genès-Champanelle' experimental farm in full compliance with national legislation on animal care (French Ministry of Agriculture-issued authorization to experiment on living Animals, certificate Nos. 63-30 and 63-158). The experiment was given approval by the Auvergne-region IRB for experiments with animals (number CE 54-12).

Table 1. Chemical composition and nutritive values of the corn silage.

Item	Hybrid F		Hybrid FD	
	Early maturity	Late maturity	Early maturity	Late maturity
Growing characteristics of the plant at harvest				
Dry matter of fresh plant, g/kg DM	313	465	298	489
Yield (t DM/ha)	17.8	18.5	18.0	18.2
Ear/whole plant (%)	48.4	55.5	47.2	56.6
Dry matter of ear fraction (%)	35.7	54.0	38.8	57.7
Dry matter of stem-leaf fraction (%)	22.8	33.2	23.5	33.4
Chemical composition of the silage				
DM, g/kg FM	298	457	287	481
OM, g/kg DM	936	939	924	944
NDF, g/kg DM	398	386	374	321
ADF, g/kg DM	208	204	200	164
ADLo, g/kg DM	18.5	18.9	14.5	12.2
Starch, g/kg DM	205	312	264	385
CP, g/kg DM	75	73	83	75
Soluble carbohydrates, g/kg DM ¹	87	5	37	32
pH	3.62	3.79	3.69	3.77
Fermentation products, g/kg DM	62.9	50.8	65.6	50.2
Alcohol (g/kg DM)	7.6	4.7	3.9	8.3
VFA (g/kg DM)	11.9	8.6	10.6	10.0
Lactic acid (g/kg DM)	44.3	36.8	41.9	39.2
N-NH ₃ (% of total N)	3.3	4.0	4.0	3.3
Feed value, /kg DM ²				
NE _L , MJ	6.09	6.10	6.31	6.66
Digestible protein, g PDIE ³	65.4	62.2	66.8	63.2
Digestible protein, g PDIN ⁴	50.2	45.3	50.6	44.9

¹estimated by NIRS²calculated according to INRA (2007)³ PDIE = protein digested in the small intestine supplied by rumen undegraded dietary protein and by microbial protein from rumen-fermented OM (INRA, 2007)⁴ PDIN = protein digested in the small intestine supplied by rumen undegraded dietary protein and by microbial protein from rumen-degraded N (INRA, 2007)

Growing conditions and conditioning of the corn hybrids

Corn hybrids were grown and harvested at the INRA's 'Crouël' experimental farm in France (45°46'N; 03°09'E; 350 m a.s.l.). Two corn hybrids were selected for their contrasted grain texture (determining rate of starch degradation) and IVDNSC (in vitro digestibility of non-starch and non-soluble carbohydrate; Barrière et al., 1997). The hybrids, named hybrid F (flint grain) and hybrid FD (flint-dent grain), differed on earliness index (early, noted SA for hybrid FD; late, noted SB for hybrid F). These hybrids were harvested in 2012 at two dates of maturity from early stage below 300 g/kg of DM to late stage over 400 g/kg of DM (Table 1). The growth cycle of the hybrids was characterized by a rainfall deficit (2 mm of average rainfall for all cycles) and hot temperature during grain maturation (sum of 785°C between flowering and late harvest for hybrid F and 813°C for FD). Yield, percentage of ear in the whole plant, and DM content of ear and stem-leaf fractions were recorded the day before harvest to characterize maturity. The corn was harvested using a precision-chop silage harvester [John Deere 7400 with a 6-row corn header and corn cracker (3 mm roll clearance); John Deere, Moline, IL] at a stubble height of 15 to 20 cm. Harvested corn was then stored in bag silos (15 m × 1.8 m) under anaerobic conditions. After 12 weeks of fermentation, silages were sampled to assess quality of conservation by analyzing their fermentation products according to Dulphy and Demarquilly (1981).

Animals, Diets and Experimental Design

Four non-lactating Holstein cows weighing 676 ± 26 kg (mean $\pm$ SD) were used. The cows had been fitted 3 years earlier with ruminal cannulae (external/internal diameter = 123/106 mm) made of polyamide-polyvinyl chloride, and T-shaped cannulae (external/internal diameter = 30/19 mm) made of plastisol with a gutter-type flange placed at the proximal duodenum, before the bile duct entrance. All cannulae were manufactured in the INRA's

workshop. Surgery was performed under general gas anesthesia using isoflurane. For this study, the cows were penned in individual stalls and given a non-experimental corn silage ad libitum during a pre-experimental period of 3 weeks. Treatments were conducted in a 4 x 4 Latin square design. The 4 experimental treatments consisted in corn silage and differed according to hybrid (F or FD) and stage of maturity (early or late). Each period lasted 4 weeks. Cows were fed at an intake level of 2% of their body weight, i.e. 95% of voluntary intake during the pre-experimental period. For practical reasons, the animals were fed twice daily (60% of the diet at 8.30 a.m. and 40% at 4.30 p.m.) during w1 and w2 and at 8.30 a.m. and 8.30 p.m. (in two equal meals) during w3 and w4. To ensure rumen nitrogen balance in each dietary treatment, the corn silages were supplemented daily with 15 g urea per kg DM (sprinkled on the silage). Cows also received 250 g/d of a mineral and vitamin mix (Galaphos midi duo 4.5% P, 20% Ca, Mg 4.5%, 5% Na; CCPA, Janzé, France) and had free access to water and mineral salts.

Measurements and sampling

Intake and Weight Cows were weighed at the start of w1 of each experimental period and at the end of the trial. Water consumption was measured once a week. For each period, intake was recorded on 4 consecutive days in w1 and daily in w2 to w4. The DM content of offered corn silage and refusals was measured daily by drying at 103°C for 24 h in a forced-air oven and corrected for lost volatile fermentation products (ethanol, NH₃-N, and acetic and lactic acids; Dulphy et al., 1975). For chemical composition analysis, 100 g of each offered silage and 10% of refusals were sampled daily during w3, pooled per animal x period, and stored at -20°C.

Total Tract Digestibility and Nitrogen Balance. Total tract digestibility and nitrogen balance were determined on w4 by 6-day collection of total feces and urine. In order to collect

urine separately from feces, a flexible pipe connected to a 30 L container with 500 mL of 30% sulphuric acid was fixed to the cows. Every day at 9 a.m., fresh feces were weighed, a 1% aliquot of total daily fecal excretion of each cow was dried at 103°C for 24 h to determine DM content, and another 0.5% aliquot was pooled per animal and per period and stored at -20°C for subsequent determination of chemical composition. Likewise, total urine excretion of each cow was weighed daily at 9 a.m., a 1% aliquot was pooled per animal and per period and stored at -20°C for subsequent N content determination, and another 0.25% aliquot was diluted in water (urine/H₂O, 1 v/3 v), pooled per animal and per period, and stored at -20°C for subsequent purine derivatives determination.

Nutrient Duodenal Flow and Microbial Synthesis Duodenal nutrient flow was determined using both external and internal indigestible markers, as recommended by Rotta et al. (2014). Ytterbium (III) chloride (YbCl₃) was used as external marker (Siddons et al., 1985) and ADL content (expressed without residual ash) as internal marker (Kozloski et al., 2014). A 1 g.L⁻¹ solution of Yb was continuously infused in the rumen at a rate of 1.2 L/d through the rumen cannula for 10 consecutive days (i.e. 6 d before the first duodenal sampling) using a peristaltic pump to ensure steady state before duodenal sampling (Owens and Hanson, 1992). Twelve 250 mL duodenal samples were collected over 3 consecutive days on w3 at 4 samples per day at 3 h intervals, to obtain representative samples at 1 h interval between the morning and evening meal. Samples were pooled per animal and per period, and stored at -20°C for subsequent determination of Yb and chemical composition. In order to calculate bacterial N flow and microbial protein synthesis, 700 g of rumen content were sampled at each period on the first day of w3, before and 2.5 h after the morning feed. The solid and liquid phases of the ruminal content were separated by filtration through a polyester monofilament fabric (250 µm pore size). Liquid-associated bacteria (LAB) were isolated by washing and differential centrifugation as described in Bauchart et al. (1990). Bacterial samples were then stored at –

20°C and freeze-dried before subsequent analysis of OM, N, and nucleic bases.

Rumen fermentation characteristics. Rumen fluid (100 mL) was sampled by suction through a pipe inserted in the ventral sac just before and at 1, 2.5, 5 and 8 h after the morning feeding on 2 days on w3 of each period. The pH was determined using a digital pH-meter (SevenGo SG2 connected to InLab® Expert Pro electrode with a temperature probe, Mettler Todelo SAS, Viroflay, France), and samples were immediately strained through a 250 µm-pore nylon filter. An aliquot of rumen filtrate (0.8 ml) was added to 0.5 mL of a deproteinizing solution (2% metaphosphoric acid and 0.4% crotonic acid in a 0.5 N HCl), cooled at 4 °C for 4 h then preserved at 20°C until volatile fatty acid content (VFA) determination. Another aliquot of rumen filtrate (1 mL) was mixed with 0.1 mL of 5% orthophosphoric acid in a microcentrifuge tube, then stored at -20 °C until analysis of ammonia-N (NH₃-N). The supernatant collected after centrifugation was stored at -20 °C before subsequent analysis.

Chemical Analysis

Alcohol and VFA in corn silage juice samples were analyzed by gas chromatography, NH₃-N by the Conway method (1957) and lactic acid by enzymatic method with Enzyplus ® D/L-Lactic Acid kit (BioControl Systems, Inc., United States), as recommended by Dulphy and Demarquilly (1981). Silage offered, refusals, and duodenal and fecal samples (pooled per animal and period) were dried at 60°C for 72 h before determination of chemical composition. Crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and acid detergent lignin (ADL) were analyzed on samples ground through a 1 mm sieve. Starch was analyzed on samples ground through a 0.5 mm sieve. Starch content was determined by enzymatic method (ISO 15914:2004). NDF and ADF content were determined according to Van Soest and Wine (1967) on an Ankom system (Ankom® Tech, Fairport, NY). For NDF determination, a heat-stable amylase was used without added sodium sulphite. ADF residues

were obtained after boiling with ADF reagent, and ADL was determined after solubilization of cellulose with sulphuric acid. ADL was expressed without residual ash (ADLo). CP ($N \times 6.25$) content was determined using Dumas Method combustion with an Elementar Rapid N Cube (Elementar France, Lyon, France) based on the ISO 16634-1:2008 method. Yb concentrations in feces and duodenal contents were determined by atomic absorption spectrophotometry (Model AA400 spectrophotometer, Perkin-Elmer, Bois d'Arcy, France) at a 398.8 nm wavelength with an acetylene/N₂O flame after extraction of the marker (Ellis et al., 1982). After extraction from LAB (0.05 g) and duodenal contents (0.2 g) by hydrolysis with perchloric acid (70%) at 100°C followed by neutralization with sodium hydroxide (0.6 N), puric and pyrimidic bases were quantified by ultraperformance liquid chromatography (100 × 2.1 mm Acquity UPLC BEH, 1.7 µm column; Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) with an isocratic elution method, as described by Fanchone et al. (2013). Nitrogen (Dumas method) and ash (550°C for 6 h) were measured in freeze-dried LAB samples with the Elementar Rapid N Cube as described above. The two rumen samples were pooled per animal and sampling time for each period to analyze VFA and NH₃-N content. VFA content of rumen liquid was determined by gas chromatography using crotonic acid as internal standard (Morgavi et al., 2003). NH₃-N content of rumen liquid and duodenal samples was determined by colorimetry using the phenol-hypochlorite method (Weatherburn, 1967) on an Infinity M200 spectrophotometer (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria).

Calculations

For each dietary component *i* (DM, OM, NDF, ADF, starch and N), total tract flow apparently digested was calculated as the difference between ingested flow of *i* and fecal flow of *i*, and was expressed as apparent digestibility in % of ingested flow. Duodenal DM flow was determined as the mean of the duodenal DM flows calculated using fecal Yb and fecal ADLo

as markers. For each marker, duodenal DM flow was calculated as the ratio of fecal marker flow to duodenal marker concentration. Duodenal flows of each component *i* (OM, NDF, ADF, Starch, N, total N, ammonia N, microbial N) was calculated from duodenal flow of DM multiplied by concentration of *i* in duodenal contents. Rumen protein balance was calculated as the difference between N intake and duodenal non-ammonia N multiplied by 6.25, and expressed as g CP/kg DMI. Apparent ruminal digestion of chemical components *i* (OM, NDF, ADF, starch) was calculated as the difference between ingested flow of *i* and duodenal flow of *i*, expressed as apparent rumen digestibility in % of ingested flow. True ruminal digestion of organic matter (OM) was calculated as the sum of apparently rumen-digested flow and duodenal microbial OM flow, and expressed as true ruminal digestibility in % of OM intake. True ruminal digestion of N was calculated as the difference between ingested N from silage (excluding N from urea) and duodenal non-ammonia non-microbial non-endogeneous N flow (assuming endogeneous N = 2.27 g N/kg DM intake; Sauvant and Nozière, 2013), and expressed as true ruminal digestibility in % of N intake.

Statistical Analysis

Data were tested by ANOVA using the MIXED procedure of SAS (9.3 version, 2002; SAS Institute Inc., Cary, NC) with mean per animal and treatment as experimental unit. The model included animal as random effect and period, hybrid (F vs FD), maturity (early vs late), and hybrid*maturity interaction as fixed effects. For rumen kinetics, the model also included time and hybrid*time, maturity*time and hybrid*maturity*time interactions as fixed effects, using the REPEATED statement within the MIXED procedure of SAS. Threshold of significance was set at $P < 0.05$ using a Tukey-Kramer test, and probability values in the range 0.05–0.10 were considered trends. Normality of all data distributions was also verified using the UNIVARIATE procedure of SAS.

RESULTS

Chemical composition and conservation of corn silages

On average for both hybrids, DM content of corn silage ranged from 293 g/kg DM at early-stage maturity to 469 g/kg DM at late-stage maturity (Table 1). Starch content was much higher in late-stage corn (+114 g/kg DM on average) whereas the NDF, ADF, ADLo, soluble sugars, CP and digestible protein contents were lower in late-stage corn. This later-harvest decrease was stronger for soluble carbohydrates and weaker for NDF, ADF and CP in F hybrid than in FD hybrid (-82 vs -5, -12 vs -53, -4 vs -36 and -2 vs -8 g/kg DM, respectively). Analysis of fermentation products confirmed adequate silage conservation of silages according to INRA reference values (2007). However, the unexpected heterogeneity between plants in silos meant that silage chemical compositions also varied according to experimental period (Figure 1).

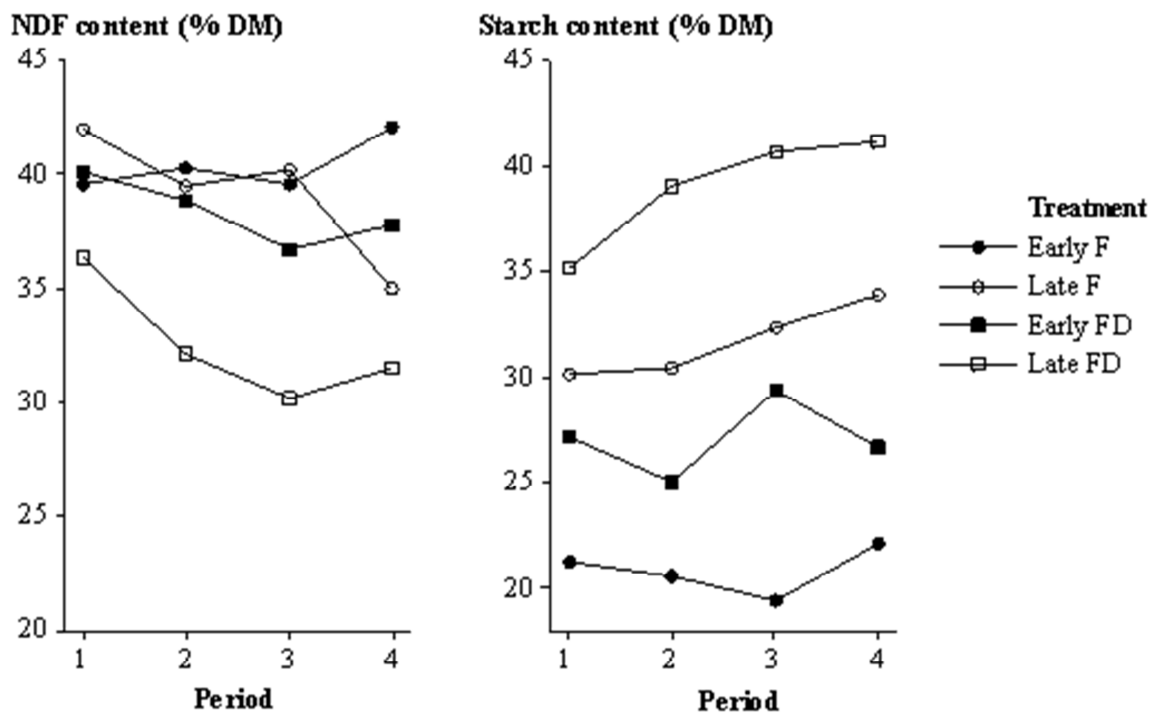


Figure 1. Evolution of NDF and starch content of corn silage during experimental periods.

Table 3. Effects of hybrid, maturity and their interaction on DM, OM, NDF, ADF, starch and N fecal flows, apparent total tract digestion, and urinary flows of N and purine derivatives¹.

	Hybrid F		Hybrid FD		SEM	P values		
	Early maturity	Late maturity	Early maturity	Late maturity		Hybrid (H)	Maturity (M)	HxM
Faecal flow								
DM kg/d	4.01	4.27	4.01	4.53	0.369	0.64	0.22	0.66
OM kg/d	3.52	3.78	3.50	4.02	0.336	0.69	0.18	0.63
NDF kg/d	2.54	2.46	2.44	2.53	0.266	0.93	0.98	0.69
ADF kg/d	1.49	1.34	1.44	1.38	0.157	0.96	0.40	0.72
Starch g/d	17.5	200.0	10.0	287.5	55.04	0.36	<0.01	0.29
N g/d	77.8	88.3	83.8	98.5	7.31	0.18	0.06	0.71
Apparent total tract digestion								
DM, kg/d	7.53	8.39	8.95	8.55	0.509	<0.05	0.49	0.09
DM, % intake	65.9	66.4	69.1	65.4	2.05	0.50	0.33	0.22
OM, kg/d	7.27	8.11	8.48	8.33	0.500	<0.05	0.31	0.16
OM, % intake	68.0	68.3	70.8	67.5	2.09	0.54	0.36	0.30
NDF, kg/d	2.03 ^{ab}	2.42 ^a	2.42 ^a	1.67 ^b	0.310	0.37	0.38	<0.05
NDF, % intake	45.5	49.1	49.9	39.2	5.20	0.49	0.39	0.11
ADF, kg/d	0.89 ^b	1.25 ^b	1.16 ^b	0.76 ^a	0.167	0.38	0.87	<0.05
ADF, % intake	38.6	47.8	44.7	35.3	5.82	0.48	0.99	0.07
Starch, g/d	2.33	3.76	3.42	4.75	0.241	<0.01	<0.01	0.79
Starch, % intake	99.3	95.1	99.7	94.5	1.28	0.91	<0.01	0.62
N from silage, g/d	60.2 ^a	58.7 ^a	88.6 ^b	59.0 ^a	7.97	<0.05	<0.05	<0.05
N from silage, % intake	44.4	39.9	51.4	37.4	4.84	0.51	<0.05	0.19
Urinary Flow								
N, g/d	130	122	117	125	7.5	0.42	0.98	0.20
Purine derivatives, mmol/d	169	144	226	180	33.0	0.08	0.17	0.65
Nitrogen balance ² , g/d	22.8 ^a	32.8 ^a	67.4 ^b	33.0 ^a	10.7	<0.05	0.12	<0.05

¹means of 4 dry cows

²N intake - faecal N – urinary N

Body weight and feed intake

The Body Weight (BW) of the animals was similar among treatments, averaging 676 kg (Table 2).

Table 2. Effects of hybrid, maturity stages and their interaction on body weight (BW), and intake of DM and dietary components of corn silage¹

	Hybrid F		Hybrid FD		SEM	P values		
	Early maturity	Late maturity	Early maturity	Late maturity		Hybrid (H)	Maturity (M)	HxM
BW, kg	678	671	673	681	4.4	0.50	0.73	0.07
Intake								
DM, kg/d	11.53	12.66	12.96	13.08	0.703	0.12	0.27	0.36
NDF, kg/d	4.57	4.88	4.86	4.20	0.338	0.40	0.47	0.08
ADF, kg/d	2.38	2.59	2.60	2.15	0.158	0.34	0.29	0.06
Starch, kg/d	2.35	3.96	3.42	5.04	0.264	<0.01	<0.01	0.99
Total N ² , g/d	234	243	268	256	7.51	<0.01	0.75	0.10
N from silage, g/d	138	147	172	157	9.45	<0.05	0.67	0.13

¹means of 4 dry cows

²Total N = N from silage + urea-N

As expected, DM intake was not significantly different among treatments, averaging 12.6 kg/d, i.e. 1.9 kg per 100 kg BW. Due to low differences in NDF and ADF contents between early and late-stage hybrid F plants and to heterogeneous silos, NDF intake with F hybrid unexpectedly failed to decrease with increasing maturity. Starch intake was higher (P<0.01) with FD than F hybrids, and increased (P<0.01) with increasing maturity, on average from 2.88 to 4.50 kg/d. Intake of N was higher for cows fed FD hybrid than F hybrid (P<0.01), and did not significantly differ between maturity stages.

Fecal flows, apparent total tract digestion and urinary flows

There were no significant effects of maturity, hybrid or maturity*hybrid interaction on fecal flows of DM, OM, NDF and ADF (Table 3). Fecal starch flow increased (P< 0.01) and fecal

Table 4. Effects of hybrid, maturity and their interaction on DM, OM, NDF, ADF, starch and N duodenal flows¹.

	Hybrid F		Hybrid FD		SEM	P values		
	Early maturity	Late maturity	Early maturity	Late maturity		Hybrid (H)	Maturity (M)	HxM
Duodenal flow								
DM, kg/d	7.72	8.03	9.23	8.41	0.820	0.18	0.69	0.39
OM, kg/d	6.21	6.44	7.26	6.79	0.650	0.21	0.82	0.51
NDF, kg/d	2.67	2.29	2.73	2.39	0.331	0.75	0.18	0.93
ADF, kg/d	1.47	1.24	1.46	1.27	0.185	0.96	0.18	0.90
Starch, g/d	174	525	343	695	43.8	<0.01	<0.01	0.99
Total N, g/d	271	265	320	277	30.2	0.23	0.32	0.45
NH3-N, g/d	9.22	8.72	9.11	9.10	1.582	0.91	0.83	0.83
Non-NH3-N, g/d	262	256	311	267	28.9	0.22	0.31	0.42
Microbial N, g/d	177	164	205	183	34.2	0.38	0.50	0.87
Non-NH3-Non microbial N, g/d	84	92	105	85	12.6	0.52	0.53	0.18
Rumen protein balance ² , g/kg DM intake	-10	-6	-20	-5	14.3	0.68	0.39	0.63

¹means of 4 dry cows

² rumen protein balance = 6.25 (total N intake – non-NH3-N duodenal flow)

N flow tended to increase ($P=0.06$) from early-stage to late-stage maturity, but with no effect of hybrid. There were no significant effects of maturity, hybrid or maturity*hybrid interaction on apparent total tract digestibility of DM, OM and NDF. ADF digestibility tended to decrease with maturity only with FD hybrid ($P=0.07$). Starch and N apparent digestibility were not significantly different between hybrids but both decreased significantly between early and late-stage maturity ($P<0.01$ and $P<0.05$, respectively). Urinary flow of N did not differ with maturity or hybrid. Urinary excretion of purine derivatives tended to be higher with FD hybrid than F hybrid ($P=0.08$) but with no significant maturity effect ($P=0.17$). N balance ranged from 22.8 to 67.4 g/day and was higher with early-stage FD hybrid ($P<0.05$).

Duodenal flows, ruminal digestion, intestinal digestion and microbial synthesis

There were no effects of maturity, hybrid and their interaction on duodenal flows of DM, OM, NDF, ADF, total N, $\text{NH}_3\text{-N}$, non- $\text{NH}_3\text{-N}$, microbial N, non- NH_3 non-microbial N, or rumen protein balance (Table 4). In contrast, starch duodenal flow increased significantly ($P<0.01$) from 286 at early maturity to 610 g/d at late maturity (on average for both hybrids), and was higher ($P<0.01$) for FD than F hybrid corn (519 vs 350 g/d, respectively, on average for both maturity stages).

The amounts of digested NDF, and truly digested OM and N in the rumen, as well as their respective ruminal digestibility, did not differ significantly among treatments (Table 5). There was a significant maturity*hybrid interaction effect on amount of ADF apparently digested in the rumen ($P<0.01$), which was lower for late-stage FD hybrid, whereas ruminal digestibility of ADF was not significantly different among treatments. Ruminal digestibility of starch decreased with increasing maturity ($P<0.01$), from 91.3 to 86.5% on average for both hybrids, but did not differ between hybrids. Amount of starch digested in the rumen increased by 1.26 kg/d on average between early and late maturity ($P<0.01$) for both hybrids, and was higher

Table 5. Effects of hybrid, maturity and their interaction on DM, OM, NDF, ADF, starch and N
 ruminal digestion and microbial synthesis¹

	Hybrid F		Hybrid FD		SEM	P values		
	Early	Late	Early	Late		Hybrid (H)	Maturity (M)	HxM
	maturity	maturity	maturity	maturity				
Apparent ruminal digestion								
NDF, kg/d	1.90	2.60	2.12	1.81	0.453	0.36	0.53	0.12
NDF, % intake	42.2	52.5	43.4	42.5	7.66	0.44	0.41	0.33
ADF, kg/d	0.98 ^b	1.34 ^b	1.14 ^b	0.88 ^a	0.168	0.38	0.87	<0.01
ADF, % intake	39.2	51.4	43.7	40.6	7.97	0.60	0.45	0.22
Starch, kg/d	2.18	3.43	3.08	4.34	0.316	<0.01	<0.01	0.99
Starch, % intake	92.8	86.7	89.8	86.2	2.20	0.26	<0.01	0.41
True ruminal digestion								
OM, kg/d	6.41	7.23	6.94	7.49	0.513	0.34	0.12	0.73
OM, % intake	60.0	60.9	57.8	60.8	2.60	0.59	0.37	0.64
N from silage ² , g/d	79.8	83.2	96.4	102.6	12.69	0.10	0.62	0.88
N from silage ² , % intake	57.4	58.0	56.0	65.6	8.07	0.63	0.43	0.49
Microbial efficiency, gN/kg OMtDR ³	26.9	23.1	30.3	24.8	5.88	0.55	0.29	0.84
Apparent intestinal digestion								
OM, kg/d	2.69	2.66	3.76	2.77	0.73	0.16	0.22	0.24
OM, % duodenal	42.9	41.0	51.5	40.1	5.16	0.19	<0.05	0.12
NDF, kg/d	0.13	-0.18	0.30	-0.14	0.27	0.48	<0.05	0.66
NDF, % duodenal	5.5	-8.7	9.3	-6.9	9.30	0.56	<0.05	0.83
Starch, kg/d	0.16	0.32	0.33	0.41	0.13	0.08	0.10	0.50
Starch, % duodenal	90.4	63.5	97.4	59.6	15.0	0.84	<0.01	0.49

¹ means of 4 dry cows

² assuming endogenous duodenal N = 2.27 g N / kg DM intake (Sauvant and Nozière, 2013)

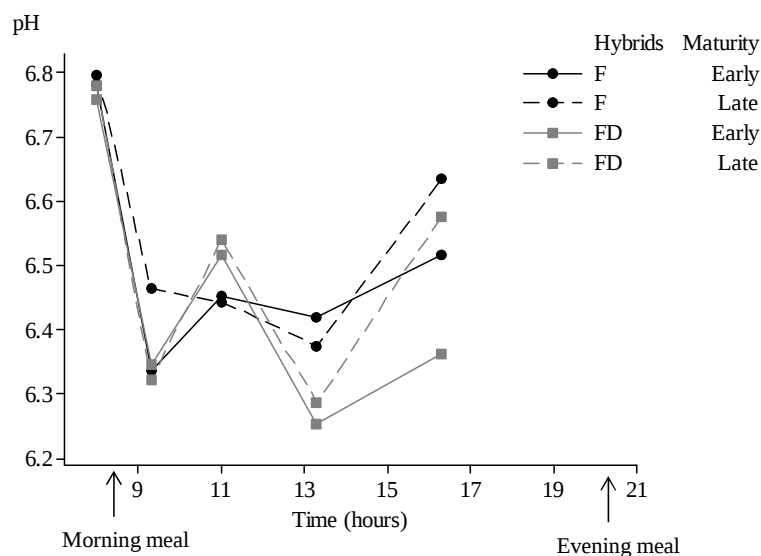
³ OMtDR = organic matter truly digested in the rumen

($P < 0.01$) with FD than F hybrid (3.71 vs 2.81 kg/d, respectively, on average for both maturity stages). Efficiency of microbial synthesis remained unaffected by hybrid or stage of maturity. Apparent intestinal digestibility of OM decreased ($P < 0.05$) with increasing maturity (47.2% to 41.0% on average for both hybrids), but with no hybrid effect. Intestinal digestibility and amounts of digested NDF decreased ($P < 0.05$) between early and late maturity, but did not significantly differ from zero for each treatment. Intestinal digestibility and amounts of ADF and ADL truly digested in the intestines did not differ from zero or among treatments (data not shown). Intestinal digestibility of starch decreased ($P < 0.01$) with increasing maturity from 93.9% to 61.6% on average for both hybrids, but with no hybrid effect. Combined with the changes in duodenal starch flow, the amount of starch digested in the intestines tended to increase with increasing maturity ($P = 0.10$) and tended to be higher for FD than for F hybrid ($P = 0.08$).

Ruminal fermentations

Mean rumen pH averaged 6.50 was did not differ among treatments. Diurnal pattern of rumen pH (Figure 2) was similar for all corn silages, decreasing significantly from peak pH (between 6.7 and 6.8) before the morning meal, down to a minimum of 6.25 in FD treatments and 6.40 in F treatments 5 h after the morning meal to reach.

Figure 2. Effects of hybrid and maturity of corn silage on the rumen pH of cows during the day.



376 **Table 6.** Effects of hybrid, maturity, sampling time and their interaction on rumen pH, N-NH₃ concentration, VFA concentrations and molar proportions¹.

	Hybrid F		Hybrid FD		SEM	P values					
	Early maturity	Late maturity	Early maturity	Late maturity		Hybrid (H)	Maturity (M)	HxM	Time ² (T)	TxH	TxM
Mean pH	6.50	6.55	6.45	6.50	0.120	0.14	0.13	0.86	<0.01	0.28	0.34
N-NH ₃ mg / l	83.2	88.7	74.0	113.3	37.85	0.44	<0.05	0.09	<0.01	0.24	0.50
Total VFA mM	89.1	95.0	92.6	98.4	12.19	0.28	0.07	0.97	<0.01	0.15	0.78
Acetate (%VFA)	62.3 ^a	69.5 ^b	66.2 ^c	70.0 ^b	2.19	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.87	0.60
Propionate (%VFA)	20.9	19.2	18.3	17.8	4.19	<0.05	<0.05	0.58	<0.01	0.54	0.66
Iso-butyrate (%VFA)	0.77 ^{ac}	1.16 ^b	0.85 ^{bc}	1.00 ^b	0.227	0.52	<0.01	<0.01	<0.05	0.62	0.27
Butyrate (%VFA)	16.4	12.2	16.1	11.8	3.59	0.71	<0.01	0.98	<0.01	0.88	0.08
Iso-valerate (%VFA)	1.02 ^a	1.99 ^b	1.15 ^a	1.66 ^b	0.368	0.29	<0.01	<0.05	0.06	0.94	0.20
Valerate (%VFA)	1.64	1.39	1.66	1.43	0.459	0.79	0.06	0.94	<0.01	0.89	0.12
Caproate (%VFA)	1.04 ^a	1.14 ^a	1.78 ^b	1.37 ^{ab}	0.005	<0.01	0.21	<0.05	<0.01	0.35	0.53
Acetate/propionate, mol/mol	2.87 ^a	3.73 ^b	3.53 ^{bc}	3.99 ^c	0.353	<0.01	<0.01	<0.05	<0.01	0.52	0.53

377 ¹means of 4 dry cows x 5 sampling times

378 ² sampling time = before, 1, 2.5, 5 and 8 h after the morning feeding

Mean ruminal NH₃-N increased from early to late maturity (+39 mg/L), and tended to be higher (P=0.09) for FD than F hybrid corn (+6 mg/L, Table 6). Total mean ruminal VFA concentration did not differ between hybrids but tended to increase (P=0.07) with maturity from 90.8 to 96.7 mM on average for both hybrids. VFA profile differed among hybrids (P<0.05 for acetate, propionate, caproate and the acetate/propionate ratio), maturity stages (P<0.05 except for valerate and caproate), and most VFAs except propionate, butyrate and valerate showed a significant maturity*hybrid effect (P<0.05). Molar proportion of acetate increased (P<0.01) with maturity for all hybrids, whereas molar proportion of propionate decreased (P<0.05), thus increasing acetate-to-propionate ratio (P<0.01). Molar proportions of butyrate and valerate decreased with maturity for all hybrids (P<0.01, P=0.06 respectively) whereas molar proportions of iso-butyrate (only for F hybrid, P<0.01) and iso-valerate increased (P<0.01). Acetate-to-propionate ratio was higher for FD than F hybrid (P<0.01) at all maturity stages. Like propionate, molar proportion of caproate was higher for FD than F hybrid, mainly at early maturity (P<0.05). Ruminal pH, NH₃-N, total VFA and molar VFA concentrations differed among sampling times (pH<0.01), but without significant sampling time*experimental factors (maturity and hybrid) interaction on rumen fermentation measurements and only a trend on butyrate (P=0.08).

DISCUSSION

To our knowledge, there are no published results on digestive flows in cows fed corn silage only. Most available in vivo studies have measured digestive flows of lactating cows fed diets containing corn silage and concentrate, which precludes a specific evaluation of corn silage per se. Here, as expected, DM intake was similar among treatments at close to 2 kg/100 kg BW. Given the variations in chemical composition between the 4 studied silages, this mainly led to big swings in starch intake between maturity stages and hybrids, from 2.35 kg/d with

early-stage F hybrid to 5.04 kg/d with late-stage FD hybrid. It also induced small variations in N intake, which was slightly higher with FD than F hybrid, regardless maturity stage. The unexpected lack of variation in NDF content between early and late-stage F hybrid implies that the observed effects of stage of maturity on NDF digestion with F hybrid corn may not be representative.

Whole plant maize silage characteristics

The F and FD hybrids studied here differed in starch and NDF contents, mainly due to the between-hybrid difference in earliness. Indeed, at the same date of harvest, FD hybrid shows earlier maturity indices (SA) than F hybrid (SB), involving higher grain fill and explaining why FD hybrid contained more starch and less NDF than F hybrid. The atypical climate conditions in year 2012 may have enhanced the earliness-related differences in chemical composition between hybrids. CP content of the silages ranged from 7.3 to 8.3% of DM, and was similar among hybrids (as reported by Verbic et al., 2005). In agreement with a review by Khan et al. (2015), and as already integrated in INRA (2007) feed tables, starch content increased and NDF and ADF contents decreased with increasing maturity. This change in starch and cell wall content was related to the increase in the proportion of grain in the corn plants during whole-plant maturation, especially at the grain fill stage, and was accompanied by a slight dip in CP content, also as already reported (Sutton et al., 2000; Andrae et al., 2001; Michalet-Doreau et al., 2004).

Digestion of starch

In comparison to previous research where whole-plant corn silage was the main source of starch fed to cows with similar DM intake levels (Fernandez et al., 2004), the total tract digestibility of starch found here was very high (> 94%) in each treatment. Total tract

digestibility of starch decreased slightly by an average 4.7 percentage-points between early and late maturity. A similar effect of whole-plant corn silage maturity on starch digestibility is widely reported (Sutton et al., 2000, Andrae et al., 2001, Fernandez et al., 2004, Jensen et al., 2005, Benefield et al., 2006) and is more pronounced at higher DM intake levels (Harrison et al., 1996; Bal et al., 1997). Similarly to total tract digestibility, ruminal digestibility of starch decreased with increasing maturity by 4.9 percentage points. This is in agreement with Sutton et al. (2000), Jochman et al. (1999), Jensen et al. (2005), Juniper et al. (2006) but lower than observed by Fernandez et al. (2004). Peyrat et al. (2014a) also reported for the same corn hybrids that increasing maturity of corn silage resulted in decreases in effective ruminal starch degradability measured in situ. These variations could be related to increased kernel vitreousness with advanced maturity. Indeed, Philippeau and Michalet-Doreau (1997) and Correa et al. (2002) showed in situ that an increase in corn vitreousness induced a decrease in corn starch degradability in the rumen. The increasing resistance to degradation with increasing kernel vitreousness can be related to increasing hardness (physical barrier) and increasing concentration of insoluble zein protein (chemical barrier) in the protein matrix encapsulating starch granules in the seed endosperm (Philippeau et al., 2000). Here, we found no significant effect of hybrid on ruminal starch digestibility. This contrasts with previous studies on corn grain (Philippeau and Michalet-Doreau, 1997). Pereira et al. (2004) showed that vitreous endosperm-rich flint grain has higher in situ starch ruminal degradation than vitreous endosperm-poor dent grain. The lack of significant effect of hybrid on ruminal starch digestibility here is likely partly due to the relative uncertainty of duodenal flows measurements. The slight changes in ruminal starch digestibility combined with the large variations in starch content with hybrid and maturity resulted in high variations in rumen-digested starch, from 19% to 33% of DM intake on early-F to late-FD, respectively. Although starch escaping ruminal digestion did not exceed 6% of DM intake, the intestinal digestibility

of starch remained incomplete at late maturity stages, averaging 60% for both hybrids (as also observed by Harrison et al., 1996, Fernandez et al., 2004). As underlined by Owens et al. (1986) the capacity of starch-hydrolyzing enzymes could be a limiting factor for starch digestion in the small intestine that contributes to incomplete starch digestibility. Starch accounted for 4.7 to 6.3% of fecal DM on late-F and late-FD hybrids, respectively. Fecal starch (FS, in % fecal DM) was significantly related to rumen degradable (RDS) or by-pass (BPS) starch (in % DM intake):

$$\text{RDS} = 22.0 (1.2) + 1.34 (0.28) \text{FS}; N = 16; R^2 = 0.61; \text{RSD} = 3.6$$

$$\text{BPS} = 1.9 (0.4) + 1.02 (0.29) \text{FS} - 0.075 (0.033) \text{FS}^2; N = 16; R^2 = 0.70; \text{RSD} = 0.99$$

This supports the hypothesis that fecal starch content could be used as an indicator of partition of starch digestion partitioning between rumen and intestines.

Digestion of plant cell walls

Total tract digestibility of NDF ranged from 39.2 to 49.9%, consistently with Fernandez et al. (2004). The expected decreases in total tract NDF and ADF digestibility were not observed here, contrary to many studies (Jochman et al., 1999; Sutton et al., 2000, Jensen et al., 2005). Peyrat et al. (2014b) also reported that for the same hybrids harvested as corn silage in other locations, the in vivo digestibility of NDF in the whole tract of sheep decreased with increasing maturity. The lack of maturity effect on NDF and ADF digestibility was mainly related to F hybrid (P-values for the maturity*hybrid interaction were 0.11 for NDF and 0.07 for ADF), as NDF and ADF digestibility decreased 11 and 9 points, respectively, for FD hybrid. This is largely explained by the atypical lack of variation in NDF content between early- and late-F hybrid and the variability of in-silo silage composition discussed earlier. In agreement with the results on total tract digestibility, rumen digestibility of NDF and ADF was not significantly affected by stage of maturity. Similarly, Peyrat et al. (2014a) found no

effect of maturity on the in situ degradability of NDF. In contrast, Fernandez et al. (2004) showed in vivo that maturity had a depressive effect on ruminal NDF digestibility, but only with long-chopped corn. The unexpected numerical but non-significant increase in ruminal NDF and ADF digestibility from early to late F hybrid growth is also attributable to both the unexpected stability of NDF with maturity and the heterogeneity of ensiled NDF content discussed earlier. In line with Taylor and Allen (2005) and Verbic et al. (2005), we found no hybrid effect on whole tract and rumen NDF digestibility. Compared to silage contents of rumen-degradable starch, rumen-degradable NDF content showed less variation, at from 14 to 21% of DM.

Ruminal nitrogen digestion

There were no maturity stage or hybrid-related effects on duodenal flows of ammonia N, microbial N, and non-ammonia non-microbial N, which accounted for 3.2%, 64.4% and 32.4% of total N, respectively. Assuming that endogenous duodenal N flow accounted for 2.27 g N/kg DM intake (Sauvant and Nozière, 2013), the average true ruminal digestibility of N found here was 59%, which is in the range of the values (54-80%) recently reviewed by Ali et al. (2014) based on in situ degradability measurements. Rumen protein balance (RPB) is the difference between N intake and duodenal non-urea-N. Assuming an endogeneous duodenal N of 14.2 g CP/kg DM intake (Sauvant and Nozière, 2013), a RPB close to -14 g/kg DMI is expected when an adequate net balance between energy and nitrogen is reached in the rumen. This was the case here, as RPB ranged from -20 to -5, averaging -10 g/kg DM intake. This adequate balance between energy and available nitrogen in the rumen is also reflected by the observed rumen NH₃-N concentrations, which ranged from 83 to 113 mg/L (average 90 mg/L), thus confirming the adequate urea supplementation of 15 g urea per kg DM intake.

OM fermentation and microbial growth

True digestibility of OM in the rumen (% OM intake) and microbial synthesis did not vary significantly among treatments. This is in line with the fact that rumen microbial growth is the main driver of OM truly digested in the rumen and that quantitative impact of type of rumen-fermented energy is only marginal or at least too low to be measurable. Note that measured efficiency of microbial synthesis, which averages 26.3 g microbial N/kg OMtDR, is close to values set under the current (INRA 2007) French PDI protein evaluation system (23.2 g microbial N/kg OMtDR) or recalculated with the revised version (24.7 g microbial N/kg OMtDR) according to Sauvant and Nozière (2013)).

Note too that OM truly digested in the rumen, calculated as measured OM apparently digested in the rumen plus microbial OM, is similar to the sum of its dietary fermented fractions (CP, starch, NDF, soluble carbohydrates) and the silage fermentation products (FP). Across the 16 individual measures, OM truly digested in the rumen ranged from 447 to 668 g/kg DM intake (mean=560, SD=66), and the relationship between the two approaches did not significantly differ from the first bisector ($Y=X$), which confirms the consistency of duodenal flow measurements:

$$\text{OMtDR} = -27(\pm 103) \text{ NS} + 1.03(\pm 0.18)^{***} [\text{fermented fractions} + \text{FP}]$$

$$(N = 16; S_{yx} = 37 \text{ g/kg DM}; R^2 = 0.70)$$

Ruminal ammonia concentrations increased with increasing maturity, as also reported by Fernandez et al. (2004), Jensen et al. (2005) and Juniper et al (2006). This increase may be related to both efficiency of microbial protein synthesis (EMPS, in g microbial N/kg OMtDR) and efficiency of N utilization in the rumen (ENU-R) i.e. the ratio between microbial N and rumen-available N (urea N plus N truly fermented from silage) as defined by Bach et al., (2005) and Calsamiglia et al., (2010). Although-non significant, both indexes tended to decrease between early and late maturity (from 29 to 24 gN/kg OMtDR for EMPS and from

1.0 to 0.9 g/g for ENU-R). The quantitative effect of energy source (NDF vs starch or sugars) in OMtDR on efficiency of N and energy utilization for microbial synthesis remains subject to debate (Calsamiglia et al., 2010; Fanchone et al., 2013) and is not homogeneously represented across the most recent feed system updates (Volden, 2011; Van Duinkerken et al., 2011; Sauvant and Nozière, 2013). Nevertheless, in changes observed here in rumen NH₃-N, EMPS and ENU-R were only moderate, and the ENU-R values close to 1 also reflect an adequate ratio between available N and energy in the rumen.

Ruminal fermentations

Rumen pH did not vary significantly between treatments, and total VFA concentrations were unaffected by hybrid and tended to increase slightly with maturity, consistently with the lack of variation in OMtDR and microbial flow among treatments. In contrast, we observed large variations in VFA profiles among treatments. Indeed, molar proportion of acetate increased significantly while molar proportions of propionate and butyrate decreased with increasing maturity. Although already observed by other teams (Jensen et al., 2005; Juniper et al., 2006), such variations differ from apparently accepted consensus i.e. a lower proportion of acetate to total VFA associated with a higher contribution of starch in rumen-digested total carbohydrate (Sutton et al., 2000). Note that the main digestive factors affecting molar proportions of VFA in the rumen, i.e. digested NDF-to-digested OM (dNDF/dOM) ratio, DM intake level and rumen starch digestibility (Nozière et al., 2011) changed only slightly among treatments (0.20 to 0.30, 17 to 19 g DM/kg BW, 86 to 93%, respectively), suggesting that changes in molar VFA proportions should be attributed to other factors. For F hybrid, the increase in molar proportion of acetate between early and late maturity may be related to the increased contribution of NDF in OMtDR (from 30 to 35%) while contributions of other carbohydrates (starch + sugars) remained constant (from 50 to 49%). For FD hybrid, the contribution of

NDF to OMtDR was low (<30%), which underlines the difficulty of accurately predicting molar VFA proportions in such low-fiber-content diet conditions.

Nitrogen balance

Apparent total tract digestibility of N from silage decreased from early to late maturity, on average from 47.9% to 38.6%, which is in line with Bal et al. (1997), INRA (2007) and Khan et al. (2015). This decrease could be related to the increase in insoluble protein (zein and glutelin) in the grain fraction of corn as it gains in maturity (Michalet-Doreau et al, 2004).

This led to increased fecal N flow while nitrogen excretion in urine did not vary among treatments, which was consistent with RPB which also did not differ among treatments. Whole-animal N balance, i.e. the difference between N intake and N excretion in feces and urines, remained positive whatever the dietary treatment and was highest on early-stage FD. This may reflect an N balance deficit rather than N retention by cows, since body weights did not vary. Spanghero and Kowalski (1997) reported that most classical N balance studies in cows have overestimated N balance. The main cause identified was the underestimation of fecal N, volatile N loss from urine containers, skin and scurf and, for dairy cows, inaccuracy in the determination of milk N content. Based on interpretations of a large European database built under the EU FP7 Rednex project, Cutullic et al. (2013) concluded that 26-36% and 56-68% of N balance deficit should be assigned to fecal N and urinary N, respectively. However, it is difficult here to know which fraction of N output was underestimated in the present work.

CONCLUSIONS

This study investigating two hybrids with contrasted endosperm type showed that delaying the date of harvest has no significant effect on amount on truly rumen-fermented OM, microbial N supply, or apparent total-tract OM digestibility. In contrast, it does result in a

large shift in the proportion of starch to NDF in truly rumen-fermented OM that in turn affects nutrient profile on rumen fermentation. Delaying date of harvest also leads to a decrease in ruminal starch digestibility and an increase in amount of starch escaping ruminal digestion between early and late-stage hybrid maturity, and these changes are only partly compensated by intestinal digestion, thus leading to a higher net amount of starch in feces. Date of harvest can be adjusted without risk of rumen disorders and could make an important strategy to modulate amount of rumen-digested starch as a way to control nutrient delivery to livestock.

Aknowledgements

This study was financed by the French Seed Companies Union ('UFS') and the French National Federation of Sorghum and Maize Seed Producers (FNPSMS). Julie Peyrat has a PhD grant funded by the ANRT [French national tech research agency] and Arvalis-Institut du Végétal. The authors thank their colleagues at the Unité Mixte de Recherches sur les Herbivores (UMRH) and the Unité Expérimentale sur les Ruminants de Theix (UERT), INRA, St-Genès-Champanelle, France: H. Albarello and S. Rudel for help with managing the experiment; D. Durand and P. Gaydier for animal surgery; B. Robert and the staff of "Les Cèdres" for animal care; F. Anglard for help with sampling; P. Amblard, L. Genestoux, S. Laverroux and A. Quereuil for their valuable technical support.

REFERENCES

- Andrae, J.G., C.W. Hunt, G.T. Pritchard, L.R. Kennington, J.H. Harrison, W. Kezar, and W.C. Mahanna. 2001. Effect of hybrid, maturity, and mechanical processing of corn silage on intake and digestibility by beef cattle. *J Anim. Sci.* 79: 2268–2275.
- Bach A., S. Calsamiglia, H.M.R. Greathead and C. Kamel. 2005. Effects of a combination of eugenol and cinnamaldehyde on ruminal protein and energy metabolism in lactating dairy cows. *Proceedings Rencontre Recherche Ruminants Paris, Francia* 12, 246
- Bal, M.A., J.G. Coors, and R.D. Shaver. 1997. Impact of the maturity of corn for use as silage in the diets of dairy cows on intake, digestion, and milk production. *J. Dairy Sci.* 80: 2497–2503.
- Barrière, Y., O. Argillier, M. Michalet-Doreau, Y. Hébert, E. Guingo, C. Giauffret, and J.C. Emile. 1997. Relevant traits, genetic variation and breeding strategies in early silage maize. *Agronomie. (Paris)* 17: 395–411.
- Bauchart, D., F. Legay-Carmier, M. Doreau, and B. Gaillard. 1990. Lipid metabolism of liquid-associated and solid-adherent bacteria in rumen contents of dairy cows offered lipid-supplemented diets. *Br. J. Nutr.* 63:563-578.
- Beauchemin, K. A., and W. Z. Yang. 2005. Effects of physically effective fiber on intake, chewing activity, and ruminal acidosis for dairy cows fed diets based on corn silage. *J. Dairy Sci.* 88: 2117–2129.
- Benefield, B. C., M. Liñeiro, I. R. Ipharraguerre, and J. H. Clark. 2006. NutriDense corn grain and corn silage for dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:1571–1579.
- Calsamiglia, S., A. Ferret, C.K. Reynolds, and N.B. Kristensen, A. M. van Vuuren, 2010. Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. *Animal.* 4: 1184-1196
- Conway, E.J. 1957. Microdiffusion analysis and volumetric error. Crosby Lockwood, London, UK.

- 622 Correa, C.E.S., R.D. Shaver, M.N. Pereira, J.G. Lauer, and K. Kohn. 2002. Relationship
623 between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. *J. Dairy Sci.* 85:3008-
624 3012.
- 625 Cutullic, E., P. Faverdin, N. Edouard, and J.L. Peyraud. 2013. Report of simulation to
626 quantify the effect of the main factors affecting N balance at cow level. Deliverable D7.3
627 of the Collaborative European Project FP7, Innovative and practical management
628 approaches to reduce nitrogen excretion by ruminants (Rednex).
- 629 Dombrink-Kurtzman M.A., and J.A. Bietz. 1993. Zein composition in hard and soft
630 endosperm of maize. *Cereal Chem.* 70: 105–108.
- 631 Dulphy, J.-P., C. Demarquilly, M. Henry, M. Jailler, J. Jamot, and L. L'hotelier. 1975. Perte
632 de composés volatils lors de la détermination à l'étuve de la teneur en matière sèche des
633 ensilages. *Ann. Zootech. (Paris)* 24:743-756.
- 634 Dulphy, J.P and C. Demarquilly. 1981. Problèmes particuliers aux ensilages. Pages 81-104 in
635 *Prévision de la valeur nutritive des aliments*. Ed. INRA, Paris, France.
- 636 Ellis, W.C., C. Lascano, R. Teeter, and F.N. Owens. 1982. Solute and particulate flow markers.
637 Pages.37-56 in: F.N.Owens (Editor), *Protein requirements for cattle*. Oklahoma State
638 University, Still-water, OK, USA.
- 639 Fanchone, A., P. Noziere, J. Portelli, B. Duriot, V. Largeau, and M. Doreau. 2013. Effects of
640 nitrogen underfeeding and energy source on nitrogen ruminal metabolism, digestion, and
641 nitrogen partitioning in dairy cows. *J. Anim. Sci.* 91:895-906.
- 642 Fernandez, I., P. Nozière, and B. Michalet-Doreau. 2004. Site and extent of starch digestion of
643 whole-plant maize silages differing in maturity stage and chop length in dairy cows. *Livest.*
644 *Prod. Sci.* 89: 147–157.
- 645 Harrison, J.H., L. Johnson, R. Riley, S. Xu, and K. Loney. 1996. Effect of harvest maturity of
646 whole plant corn silage on milk production and component yield, and passage of corn grain

- 647 and starch into feces. J. Dairy Sci. 79:149.
- 648 Huntington, J.A. 1997. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. J. Anim. Sci.
- 649 75: 852–867.
- 650 INRA. 2007. Nutrition of Cattle, Sheep and Goats: Animal Needs – Feed Values. Quae
- 651 Editions, Paris, France.
- 652 ISO-15914. 2004. Animal feeding stuffs-enzymatic determination of total starch content.
- 653 International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- 654 ISO-16634-1. 2008. Food products - Determination of the total nitrogen content by
- 655 combustion according to the Dumas principle and calculation of the crude protein content -
- 656 Part 1: Oilseeds and animal feeding stuffs. International Organization for Standardization,
- 657 Geneva, Switzerland.
- 658 Jensen, C., M.R. Weisbjerg, P. Norgaard, and T. Hvelplund. 2005. Effect of maize silage
- 659 maturity on site of starch and NDF digestion in lactating dairy cows. Anim. Feed Sci.
- 660 Technol. 118: 279–294.
- 661 Jochmann, K., P. Lebzien, R. Daenicke and G. Flachowsky. 1999. Influence of corn maturity
- 662 and lactic acid bacteria during ensilage on nutrient conversion in the dairy cow digestive
- 663 tract. J. Anim. Physio. Anim. Nutr. (Berlin). 82: 178–192.
- 664 Johnson, L.M., J.H. Harrison, D. Davidson, M. Swift, W.C. Mahanna, and K. Shinnors. 2002.
- 665 Corn silage management II: effects of hybrid, maturity, and mechanical processing on
- 666 digestion and energy content. J. Dairy Sci. 85: 2913–2927.
- 667 Juniper, D.T., EM Browne, M.J. Bryant, and D.E. Beever. 2006. Digestion, rumen
- 668 fermentation and circulating concentrations of insulin, growth hormone and igf-1 in steers
- 669 given maize silages harvested at three stages of maturity. Anim. Sci. 82: 41–48.
- 670 Khan N.A., P. Yu, M. Ali, J.W. Cone, and W.H. Hendriks. 2014. Nutritive value of maize
- 671 silage in relation to dairy cow performance and milk quality. J. Sci. Food Agric. 2014.

- 672 Kozloski, G.V., C.M. Stefanello, F.R. Mesquita, T.P. Alves, H.M.N. Ribeiro Fiho, J.G.R.
673 Almeida, and T.C. Moraes Genro. 2014. Technical note: evaluation of markers for
674 estimating duodenal digesta flow and ruminal digestibility: acid detergent fiber, sulfuric
675 acid detergent lignin, and n-alkanes. J. Dairy Sci. 97: 1730–1735.
- 676 Lopes, J.C., R.D. Shaver, Hoffman P.C., M.S. Akins, S.J. Bertics, H. Gencoglu, and J.G.
677 Coors. 2009. Type of corn endosperm influences nutrient digestibility in lactating dairy
678 cows. J. Dairy Sci. 92: 4541–4548.
- 679 Michalet-Doreau, B., F. Corneloup, B. Aizac, J. Andrieu, and R. Baumont. 2004. Variabilité et
680 facteurs de variation de la teneur en matières azotées des maïs récoltés en plantes entières.
681 INRA Prod. Anim. 17: 3-10.
- 682 Morgavi, D. P., H. Boudra, J. P. Jouany, and D. Graviou. 2003. Prevention of patulin toxicity
683 on rumen microbial fermentation by SH-containing reducing agents. J. Agric. Food Chem.
684 51:6906-6910.
- 685 Nozière, P., F. Glasser, and D. Sauvant. 2011. *In vivo* production and molar percentages of
686 volatile fatty acids in the rumen: a quantitative review by an empirical approach . Animal.
687 5:403-414
- 688 Opsi, F., G. Borreani, E. Tabacco, and S. Lopez. 2013. Influence of cultivar, sowing date and
689 maturity at harvest on yield, digestibility, rumen fermentation kinetics and estimated
690 feeding value of maize silage. J. Agric. Sci. 151: 740-753.
- 691 Owens, F.N., R.A. Zinn, and Y.K. Kim. 1986. Limits to starch digestion in the ruminant small
692 intestine. J. Anim Sci. 63: 1634–1648.
- 693 Owens, F. N. and C. F. Hanson. 1992. External and internal markers for appraising site and
694 extent of digestion in ruminants. J. Dairy Sci. 75:2605-2617.
- 695 Pereira, M.N., R.G.V Pinho, R.G.S Bruno, and G.A Calestine. 2004. Ruminal degradability of
696 hard or soft texture corn grain at three maturity stages. Sci. Agric. (Piracicaba, Brazil),

61:358-363.

Peyrat, J., P. Nozière, A. Le Morvan, A. Férard, P.V. Protin, and R. Baumont. 2014a. Effects of ensiling maize and sample conditioning on *in situ* rumen degradation of dry matter, starch and fibre. Anim. Feed Sci. Tech. 196: 12-21

Peyrat, J., P. Nozière, A. Le Morvan, A. Férard, P.V. Protin, and R. Baumont. 2014b. Digestibility of starch and cell wall of maize silage: consequences on the prediction of organic matter digestibility. Anim. Prod. Aust. 30, 30th Biennial Conference Proc., Canberra, Australia.

Philippeau C., and B. Michalet-Doreau. 1997. Influence of genotype and stage of maturity of maize on rate of ruminal starch degradation. Anim. Feed Sci. Tech. 68: 25–35.

Philippeau C., J. Landry, and B Michalet-Doreau. 2000. Influence of the protein distribution of maize endosperm on ruminal starch degradability. J. Sci. Food Agric. 80: 404–408.

Rotta, P.P., S.C. Valadares Filho, E. Detmann, L.F. Costa e Silva, M.F. Paulino, M.I. Marcondes, A.A.G. Lobo and F.A.C. Villadiego. 2014. Digesta sampling sites and marker methods for estimation of ruminal outflow in bulls fed different proportions of corn silage or sugar cane. J. Anim. Sci. 92: 2996–3006.

SAS Inc., 2003. SAS®User's Guide: Statistics, Version 9.3 Edition. SAS Inc., Cary, NC.

Sauvant D. and P. Nozière, 2013. La quantification des principaux phénomènes digestifs chez les ruminants: les relations utilisées pour rénover les systèmes d'unités d'alimentation énergétique et protéique. INRA Prod. Anim, 26 :327-346.

Siddons, R. C., J. Paradine, D. E. Beever, and P. R. Cornell. 1985. Ytterbium acetate as a particulate-phase digesta-flow marker. Br. J. Nutr. 54:509-519.

Spanghero, M., and Z. M. Kowalski. 1997. Critical analysis of N balance experiments with lactating cows. Livest. Prod. Sci. 52:113–122

Sutton, J.D., S.B. Cammell, R.H. Phipps, D.E. Beever, and D.J. Humphries. 2000. The effect

- 722 of crop maturity on the nutritional value of maize silage for lactating dairy cows 2.
723 Ruminal and post-ruminal digestion. Anim. Sci. 71: 391–400.
- 724 Tang, S.X., F.W. Li, J. Gan, M. Wang, C.S. Zhou, Z.H. Sun, X.F. Han, and Z.L. Tan. 2011.
725 Effects of sown season and maturity stage on in vitro fermentation and *in sacco*
726 degradation characteristics of new variety maize stover, Asian-australas. J. Anim. Sci. 24:
727 781–790.
- 728 Taylor, C. C., and M.S. Allen. 2005. Corn grain endosperm type and brown midrib 3 corn
729 silage: ruminal fermentation and n partitioning in lactating cows. J. Dairy Sci. 88:1434–
730 1442
- 731 Van Duinkerken, G., M.C. Blok, A. Bannink, J.W. Cone, J. Dijkstra, A.M. Van Vuuren, and
732 S.Tamminga, 2011. Update of the dutch protein evaluation system for ruminants: The
733 DVE/OEB2010 system. J. Agri. Sci. 149:351-367.
- 734 Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral
735 detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal production. J. Dairy
736 Sci. 74:3583-3597.
- 737 Verbic, J., D. Babnik, V. Znidarsic-Pongrac, M. Resnik, A. Gregorcic, and V. Kmecl. 2005.
738 The effect of dent versus flint maize genotype on site and the extent of starch and protein
739 digestion, ruminal fermentation and microbial protein synthesis in the rumen of sheep.
740 Anim. Res. 54: 443–458.
- 741 Volden, H. 2011. NorFor- The Nordic Feed system evaluation system. Ed Wageningen
742 Academic Publishers. The Netherlands.
- 743 Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Anal.
744 Chem. 39:971-974.

745

Discussion

Le dispositif expérimental mis en place dans cette thèse a permis 1) d'obtenir de nouvelles références de digestibilité *in vivo* de l'ensilage de maïs à partir de variétés cultivées actuellement et d'une large gamme de stades de maturité (Chapitre 1) , 2) de quantifier la partition de la digestion (rumen et intestin) de la MO, de l'amidon et du NDF par la méthode *in sacco* (Chapitres 2 et 3) et par la méthode *in vivo* (Chapitre 4). Ces résultats permettent de renforcer les connaissances sur la valeur nutritive de l'ensilage de maïs. Au-delà de cette connaissance, pour prévoir la valeur nutritive et donc prévoir les différents paramètres de la digestion de la MO, de l'amidon et du NDF, il est nécessaire de rechercher parmi les critères mesurables au laboratoire (critères chimiques et enzymatiques) ou directement sur le terrain (critères agronomiques) ceux qui sont le mieux corrélés avec les paramètres digestifs.

Avant de s'intéresser à la prévision des différents paramètres de la digestion, revenons tout d'abord sur la variabilité de la digestion de l'ensilage de maïs et de ses principaux constituants énergétiques (amidon et parois végétales) au niveau de l'ensemble du tube digestif ou dans chacun des différents compartiments digestifs (rumen et intestin).

1. Variabilité de la composition chimique, de la digestibilité dans l'ensemble du tube digestif et de la dégradabilité dans le rumen

1.1. Influence du stade de maturité

1.1.1 Composition chimique

Avec l'avancement du stade de maturité, la teneur en amidon des maïs en vert et des ensilages qui en sont issus augmente fortement au détriment de la teneur en NDF qui diminue par effet de dilution (Figure 22). Ces évolutions de la composition chimique avec le stade de maturité sont en accord avec les valeurs des Tables INRA (2007) qui rassemblent 254 données sur des maïs en vert. Les conditions climatiques atypiques sur le site de Crouël en 2012 ont conduit à récolter des maïs avec de fortes teneurs en MS mais de faibles teneurs en amidon.

Selon ARVALIS Institut du Végétal (2013), les récoltes sont de plus en plus tardives. Par exemple, en 2012, la teneur en MS de la plante entière à la récolte était de 34% MS (médiane dans la France entière) mais des teneurs en MS inférieures à 30% et supérieures à 40% MS ont également été observées.

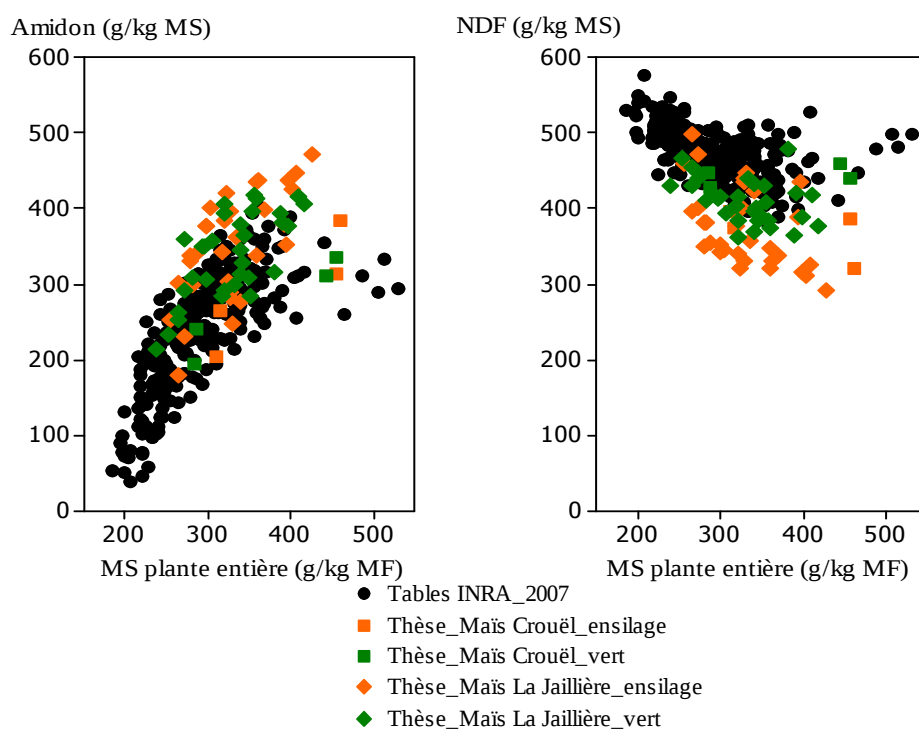


Figure 22 : Évolution de la teneur en amidon et en NDF des maïs (vert et ensilé) de la thèse et des maïs vert ayant servi à l'élaboration des Tables INRA (2007) selon la maturité

Dans la littérature, la plupart des variétés sont récoltées à des teneurs en MS majoritairement comprises entre 30 et 35 % MS (Andrieu *et al.*, 1993, Khan *et al.*, 2014). Dans les valeurs tables INRA (utilisées pour le rationnement des animaux), les valeurs moyennes de digestibilités (MO et NDF) des ensilages de maïs ont été établies pour des teneurs en MS comprises entre 25 et 40%.

La plus large gamme de stades de maturité disponible dans cette étude (médiane à 34% MS, valeur minimale à 24 % MS et valeur maximale à 46 % MS) à partir de 4 variétés, 2 années et 2 sites de récolte, a donc permis d'actualiser les références de digestibilités *in vivo* (MO et NDF) disponibles dans les tables INRA (2007).

1.1.2 Digestibilité dans l'ensemble du tube digestif (modèle mouton)

L'effet du stade de maturité sur la digestibilité totale de la MO et de l'amidon, mesuré *in vivo* sur moutons (Chapitre 1) à partir des maïs de La Jaillière et de Crouël, reste faible (2 à 3 points de variation de digestibilité au maximum) alors que la digestibilité de la fraction pariétale diminue fortement pour toutes les variétés utilisées dans cette étude (10 points en

moyenne) (Figure 23). La proportion d'ADL dans la fraction NDF est élevée aux stades tardifs. Elle est considérée comme non dégradable, et peut expliquer la diminution de la digestibilité du NDF avec l'augmentation de la maturité (Kruse *et al.*, 2008).

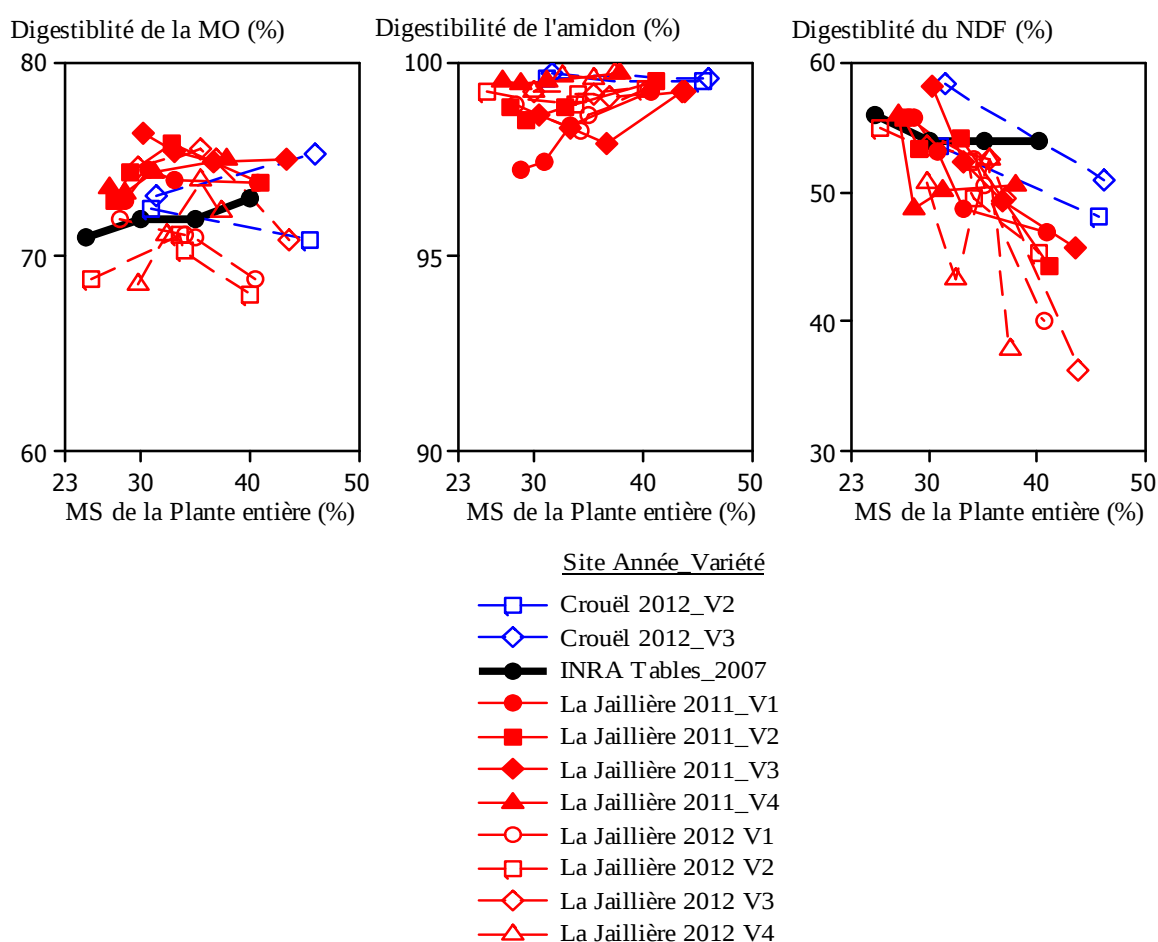


Figure 23 : Évolution de la digestibilité *in vivo* de la MO, de l'amidon et du NDF avec la maturité (mesures sur moutons)

Peu de références sont disponibles dans la bibliographie sur la digestibilité du maïs fourrage mesurée *in vivo* sur moutons. Il est toutefois possible de se référer aux valeurs Tables INRA (2007) qui présentent une moyenne des digestibilités de la MO et du NDF d'ensilages de maïs à partir de plusieurs essais *in vivo* sur moutons, essais référencés dans Andrieu *et al.* (1993). La dMO mesurée sur les ensilages de maïs de la thèse se situe dans la gamme de celles indiquées dans les valeurs Tables INRA (Figure 24). À contrario, la digestibilité du NDF, mesurée sur l'ensilage, est plus faible que celle estimée dans les données Tables INRA 2007 à partir des mesures réalisées sur le maïs en vert, avec un effet marqué du stade de maturité (entre les stades laiteux et vitreux du grain : +10 points en moyenne pour les maïs de la thèse contre seulement +2 points en moyenne dans les valeurs Tables INRA). La plus large

gamme de stades de maturité des maïs étudiés dans la thèse (dépasse le seuil maximum de 40% de MS plante entière des Tables INRA) peut expliquer en partie cette différence. Mais cette plus large diminution de la digestibilité du NDF par rapport aux valeurs Tables INRA peut aussi être due aux conditions climatiques et au type de variété. L'influence de la variété sur la digestibilité du NDF sera discutée par la suite.

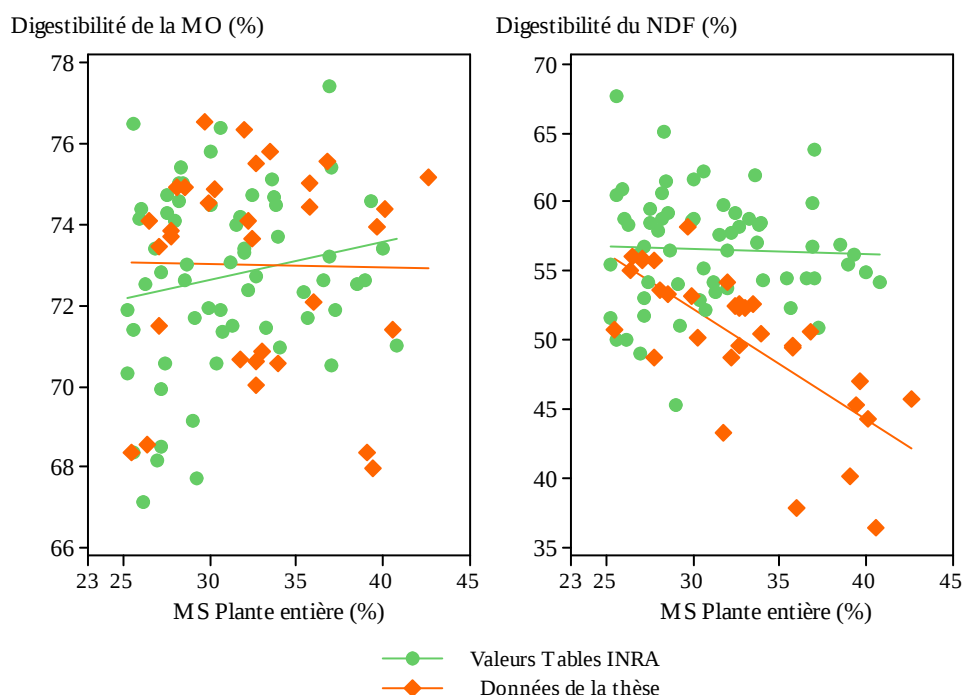


Figure 24 : Digestibilité *in vivo* de la MO et du NDF issues des données de la thèse et des valeurs mesurées en vert (Tables INRA, 2007) pour une teneur en MS supérieure à 25%

1.1.3 Digestibilité dans l'ensemble du tube digestif (modèle vache)

Les mesures *in vivo* sur vaches (Chapitre 4) à partir des maïs récoltés sur le site de Crouël (Figure 25) montrent les mêmes résultats que sur le modèle mouton : la digestibilité de la MO est stable et celle du NDF diminue (mais cela est moins net que sur le modèle mouton).

À la différence du modèle mouton, les mesures de la digestibilité de l'amidon *in vivo* sur le modèle vache ont permis d'observer une diminution de la digestibilité avec l'avancement du stade de maturité et une plus grande variabilité dans les mesures. C'est peut-être parce que les bovins ont une digestibilité de l'amidon plus faible que les moutons en raison de différences unitaires de mastication (Carles et Dulphy, 1980) que la variabilité de la digestibilité de l'amidon est plus importante sur le modèle bovin dans cette étude.

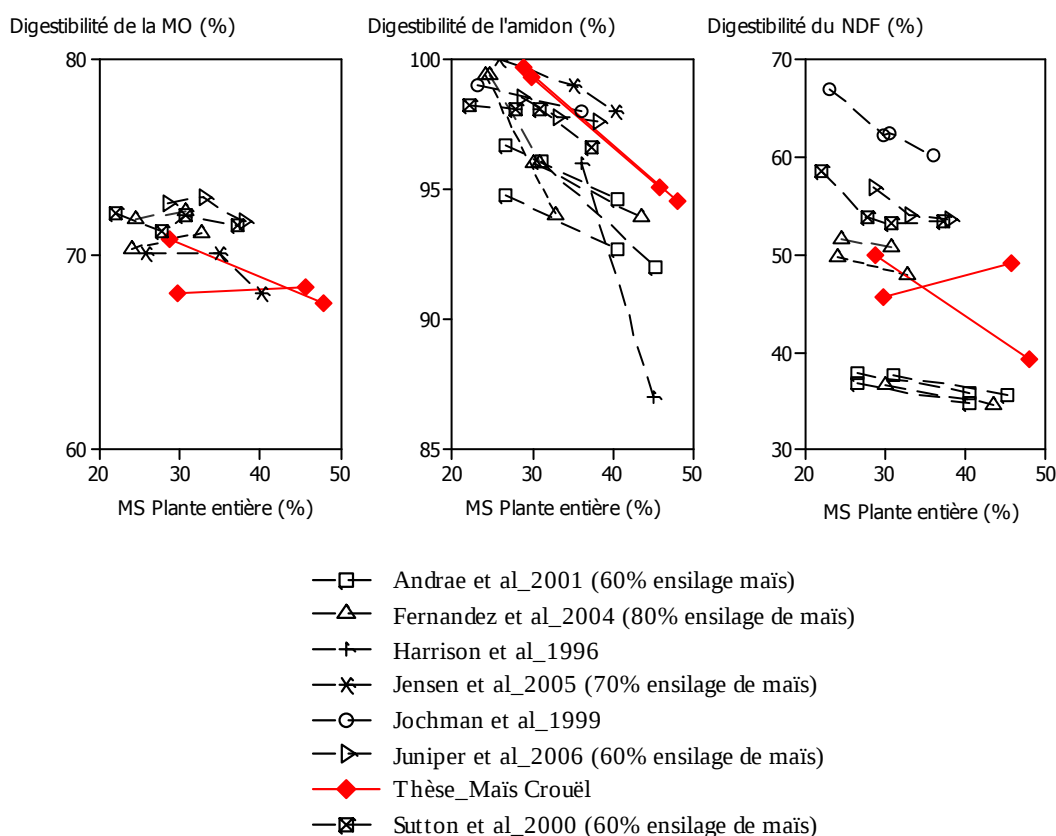


Figure 25 : Évolution de la digestibilité *in vivo* de la MO, de l'amidon et du NDF avec la maturité (mesures sur vaches)

Peu de données sont disponibles sur la digestibilité *in vivo* mesurée sur le modèle bovin à partir de l'ensilage de maïs distribué seul. Dans ce travail, les digestibilités de la MO, de l'amidon et du NDF évoluent avec la maturité de la même façon que dans d'autres études où l'ensilage de maïs représente la source majoritaire d'amidon. Le niveau d'ingestion plus faible des animaux, ainsi que l'absence d'autres sources d'amidon moins dégradables (ex : maïs grain mature) expliquent les digestibilités plus élevées de l'amidon dans notre étude. D'autres facteurs comme la variété utilisée, la hauteur de coupe des plantes au champ, la finesse de hachage de l'ensilage, et l'éclatement ou non des grains de maïs pendant la récolte (Andrae *et al.*, 2001 ; Fernandez *et al.*, 2004) peuvent également avoir un impact sur la digestibilité de l'amidon.

Dans nos études *in vivo*, la diminution de la digestibilité du NDF des maïs de Crouël sur vaches n'est pas si nette que sur le modèle mouton (Figure 26) car pour l'une des variétés (V2), elle augmente. L'évolution atypique de la teneur en NDF de cette variété V2 avec la maturité pour l'expérimentation *in vivo* « vaches » par rapport à l'expérimentation *in vivo* « moutons » pourrait être une explication.

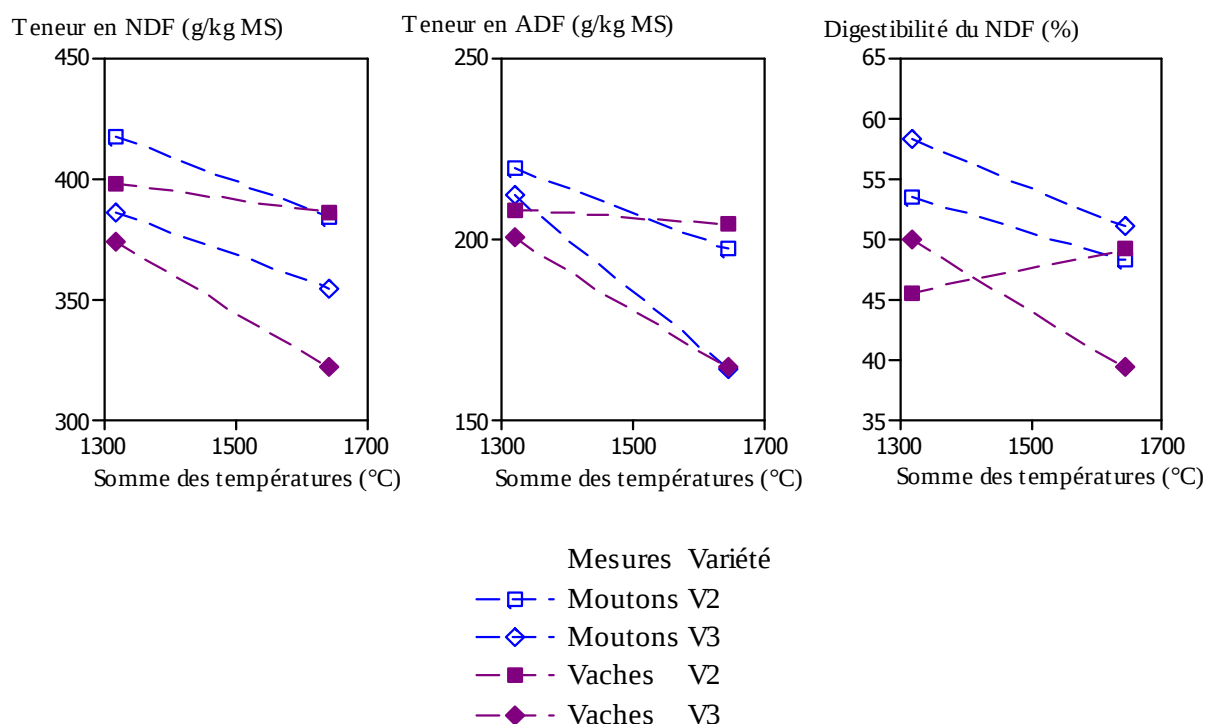


Figure 26 : Comparaison des teneurs en NDF et ADF et de la digestibilité in vivo du NDF des ensilages de maïs récoltés à Crouël entre les deux expérimentations in vivo « vaches » et « moutons »

En effet, la teneur en NDF de la variété V2 mesurée dans le cadre l'expérimentation « moutons » diminue avec la maturité alors que la teneur en NDF de la variété V2 mesurée dans l'expérimentation « vaches » est stable. Il en est de même pour la teneur en ADF. Une hétérogénéité de la culture au champ ayant pour conséquence une variabilité de qualité du fourrage lors du tassement en silo boudin pourrait expliquer ces différences d'évolution des teneurs en parois avec le stade de maturité. Les prélèvements dans le silo pour les deux expérimentations « vaches » et « moutons » ont en effet été réalisés à des niveaux d'avancement de silo différents.

1.1.4 Constituants digestibles

Le calcul de la teneur en MO digestible, amidon digestible et NDF digestible (qui représente le produit entre la teneur et la digestibilité d'un constituant donné) montre que l'augmentation de la teneur en amidon digestible, avec l'avancement du stade de maturité est essentiellement due à celle de la teneur en amidon étant donné la faible variabilité de la digestibilité de l'amidon (Figure 27). La relative stabilité de la teneur en MO digestible

s'explique par la compensation entre la diminution de la teneur en NDF digestible et l'augmentation de la teneur en amidon digestible.

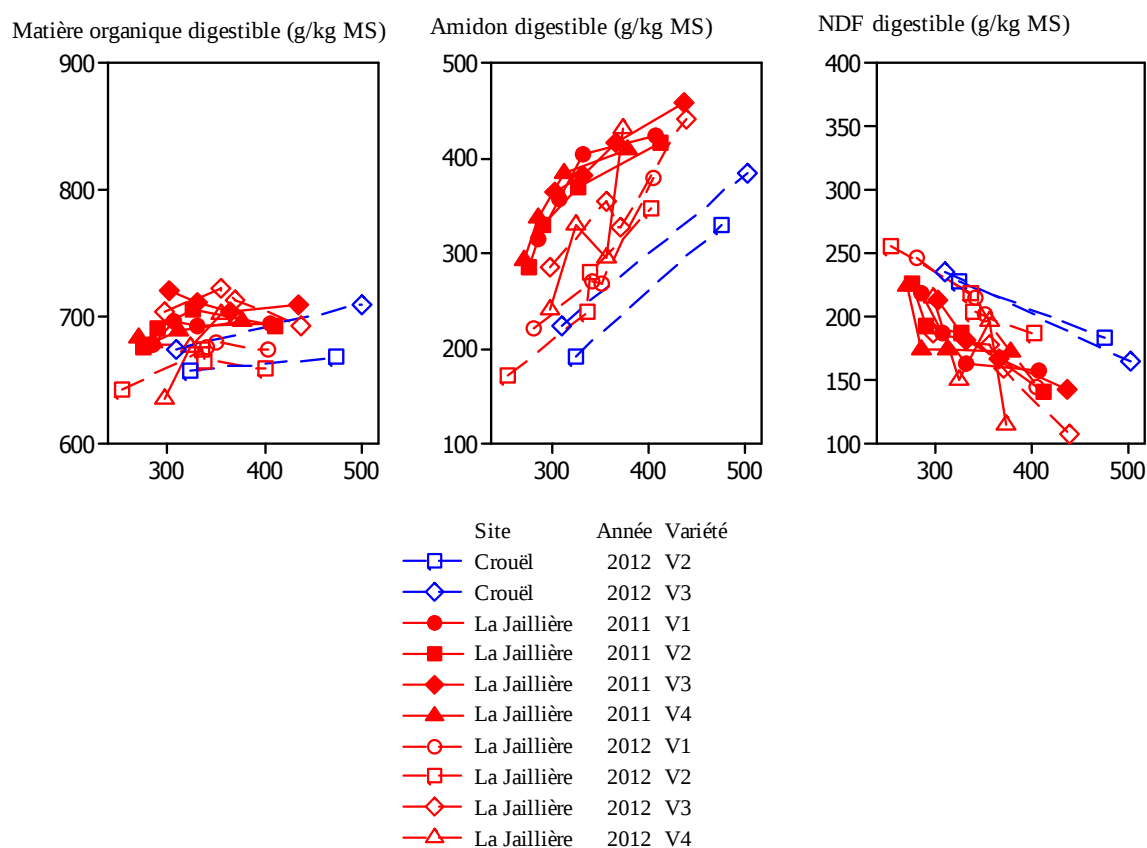


Figure 27 : Évolution de la teneur en MO digestible, en amidon digestible et en NDF digestible avec la maturité (mesures *in vivo* sur moutons)

1.1.5 Dégradabilité ruminale (mesures *in sacco*)

Alors que dans l'ensemble du tube digestif, la digestibilité de la MO et la digestibilité de l'amidon sont peu variables, la dégradabilité théorique de la MS et de l'amidon dans le rumen mesurée *in situ* ou *in sacco* (modèle bovin, Chapitre 3), varient fortement et diminuent avec le stade de maturité (Figure 28) défini ici par la somme des températures. La dégradabilité du NDF diminue aussi tout comme sa digestibilité, mais surtout au stade de maturité le plus tardif (somme des $T^{\circ}_{\text{semis-récolte}} > 1600^{\circ}\text{C}$). Cette diminution n'est cependant pas aussi nette que celle de la MS et de l'amidon. La diminution de la dégradabilité de l'amidon dans le rumen s'explique principalement par la vitrosité du grain de maïs qui augmente avec l'avancement de la maturité. La vitrosité des grains de maïs est effectivement corrélée de façon négative à la dégradabilité ruminale *in situ* de la MS ($R^2=0.82$, Ngonyamo-Majee *et al*, 2008) et de l'amidon ($R^2=0.86$, Philippeau and Michalet-Doreau, 1997). Khan *et*

al (2014), dans leur synthèse, expliquent que la vitrosité favoriserait la dureté du grain (barrière physique) et l'augmentation de la concentration en protéines insolubles dans la matrice protéique encapsulant les granules d'amidon (barrière chimique). Ces deux facteurs limiteraient alors l'accès des granules d'amidon aux microbes du rumen (Philippeau *et al*, 2000).

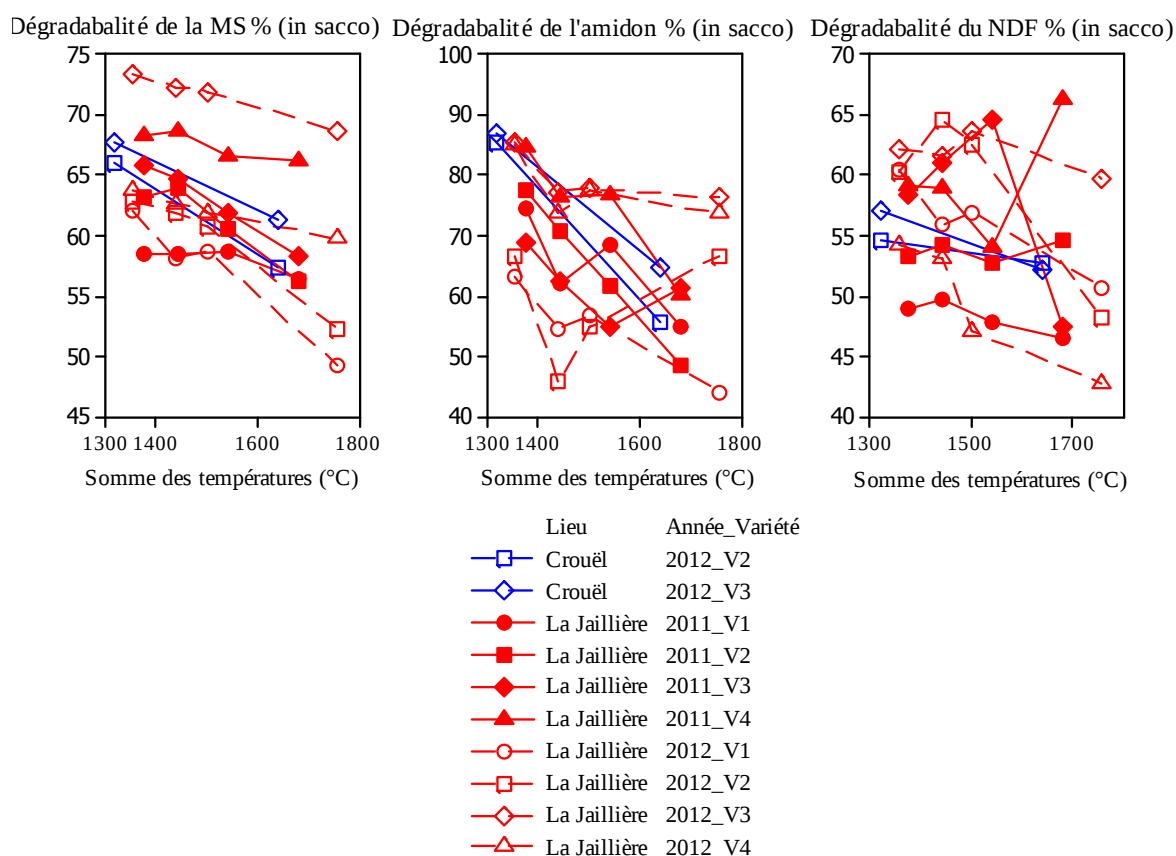


Figure 28 : Évolution de la dégradabilité de la MS, du NDF et de l'amidon dans le rumen avec la maturité (mesures in sacco sur vaches)

1.1.6 Dégradabilité ruminale (mesures in vivo)

La diminution de la digestibilité ruminale de l'amidon avec l'avancement de la maturité a été confirmée à partir des mesures *in vivo* sur le modèle vache (Figure 29). Aucun effet significatif de la maturité sur la digestibilité du NDF ou sur la digestibilité réelle de la MO dans le rumen n'a été observé *in vivo*. L'augmentation de la digestibilité du NDF mesurée *in vivo* pour la variété V2 est une évolution atypique. Mais elle n'explique pas à elle seule la non-significativité de l'effet de la maturité sur la digestibilité moyenne du NDF pour les deux variétés étudiées. Cette évolution atypique de la dégradabilité du NDF pour la variété V2 est très certainement liée aux raisons invoquées ci-dessus pour la digestibilité du NDF.

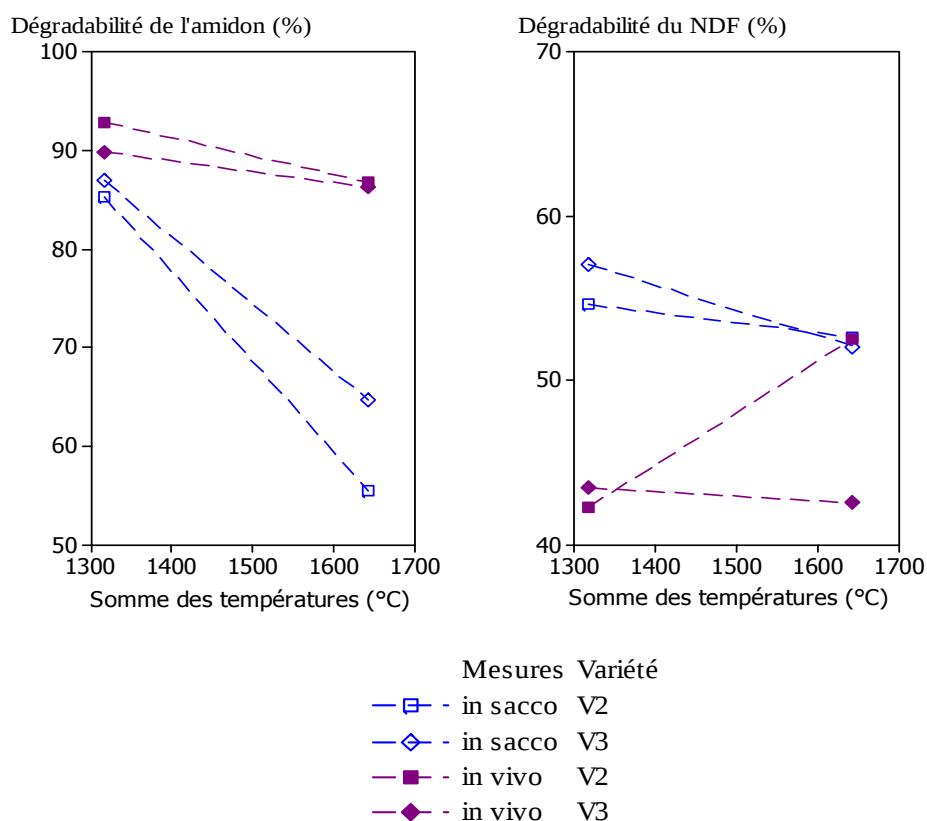


Figure 29 : Évolution de la dégradabilité de la MS, du NDF et de l'amidon dans le rumen avec la maturité (comparaison des mesures in sacco et in vivo sur vaches)

1.2. Influence de la variété

1.2.1 Composition chimique

Les variétés utilisées dans cette étude diffèrent selon leur fraction grain (corné à denté) et selon la digestibilité de leur fraction parois végétales (différences de DINAG, cf « *Matériel végétal de l'étude* »). Quel que soit le site, la date ou l'année de récolte, la variété V3 est la variété la plus riche en amidon (inversement la plus pauvre en NDF) et la variété V2 est la variété la plus riche en NDF (inversement la plus pauvre en amidon) (Figure 30). Les légères différences de précocité entre les variétés (précocité $V_3 > V_1 = V_2 > V_4$) pourraient expliquer ces observations. Les variétés les plus précoces, récoltées à même date que les autres ont alors un stade de maturité légèrement supérieur avec un niveau de remplissage du grain plus important. Le remplissage du grain influence en effet très fortement la teneur en amidon des plantes et indirectement la teneur en NDF.

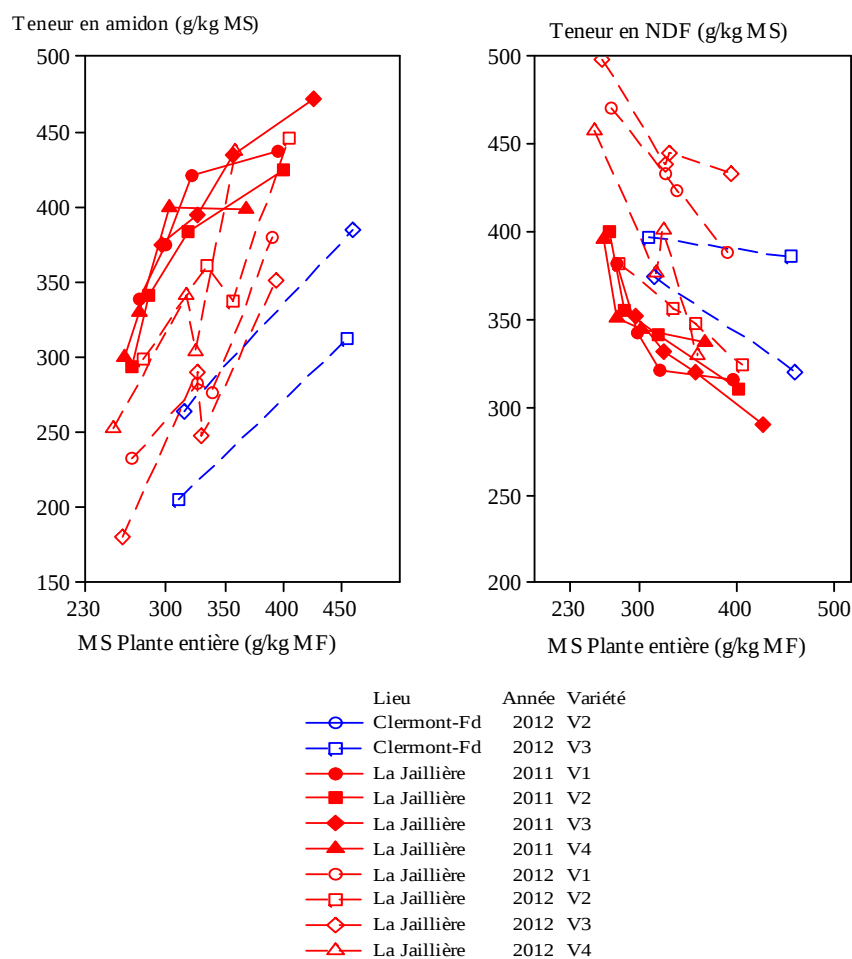


Figure 30 : Variabilité de la teneur en amidon et de la teneur en NDF des ensilages de maïs de l'étude selon la variété et l'année de récolte

Le matériel génétique des maïs étudiés dans la thèse est différent de celui des maïs utilisés pour établir les valeurs Tables INRA. A même teneur en MS de la plante entière, les variétés de maïs utilisées dans cette étude sont plus riches en amidon que celles utilisées pour les valeurs Tables (*cf* Figure 22). Si on fait l'hypothèse que les 4 variétés utilisées dans notre étude sont représentatives des variétés actuelles, cela suggère qu'entre les années 80/90 (relatives aux travaux du Club Digestibilité pour l'élaboration des Tables INRA) et aujourd'hui, la sélection variétale a été réalisée en faveur du rendement en épis, notamment pour une meilleure valeur énergétique du fourrage (Barrière et Emile, 2000c). Dans leur synthèse, Barrière *et al* (2004) faisaient déjà ce constat en montrant que les variétés du début des années 2000 ont un pourcentage de grains légèrement plus élevé que celles utilisées entre 1958 et 1998.

1.2.2 Digestibilité dans l'ensemble du tube digestif

Les différences entre variétés ont eu plus d'impact que le stade de maturité sur la dMO. Plus riche en amidon, la variété V3 se distingue effectivement des autres par une dMO nettement plus élevée en 2011 et en 2012, aussi bien sur le site de La Jaillière que sur le site de Crouël (*cf* Figure 23). Au niveau des fractions énergétiques, l'effet variété est plus limité pour la digestibilité de l'amidon et inexistant pour celles des parois végétales (sauf sur le site de Crouël où la variété V3 de type DINAG + a une digestibilité plus élevée que la variété V2 de type DINAG -). Les digestibilités du NDF mesurées dans cette étude sont globalement plus faibles que celles mesurées par Andrieu *et al* (1993). En effet, Barrière *et al* (2004) a montré qu'en 40 ans, la digestibilité du NDF a baissé de presque 5 points alors que la dMO n'a pratiquement pas évolué (2 points d'écart seulement). La recherche de plantes tolérantes à la verse et surtout résistantes à la casse à maturité du grain dans la période 1985-2000, a peut-être contribué à la diminution de la digestibilité de la fraction NDF des maïs (Barrière *et al.*, 2004). Cependant, la digestibilité du NDF des variétés pourrait être améliorée dans les années à venir avec les recherches menées actuellement sur la mise en évidence d'allèles d'intérêt pour la digestibilité des parois végétales et leur introduction par sélection assistée par marqueurs (Courtial *et al.*, 2013).

1.2.3 Dégradabilité et digestibilité ruminale (mesures *in sacco* et *in vivo*)

En cohérence avec sa dMO élevée, la variété V3 présente la dégradabilité *in sacco* de la MS dans le rumen la plus élevée. Alors que la digestibilité du NDF de la variété V3 dans l'ensemble du tube digestif n'est pas plus élevée, la dégradabilité du NDF dans le rumen est plus importante pour cette variété quelle que soit l'année de mesure (*cf* Chapitre 3). Ceci pourrait être relié au caractère DINAG (mesuré dans cette étude) qui est plus élevé pour la variété V3 (58%) que pour les autres variétés (54% pour V1 et V4 et 52% pour V2). Alors que l'influence de la variété sur la digestibilité *in vivo* de l'amidon dans l'ensemble du tube digestif est limité, l'effet de la variété sur la dégradabilité théorique *in sacco* (DT) de l'amidon dans le rumen est importante. La fraction amidon est effectivement dégradée plus rapidement ($P < 0.05$) pour la variété V4 qui a un grain de type denté entouré d'une fine matrice protéique, ce qui facilite sa dégradation par les microbes (Philippeau *et al.*, 2000). Les mesures *in vivo* n'ont, quant à elles, pas permis de déceler de différences significatives de digestibilité de la MS ou de ses fractions dans le rumen entre les variétés (*cf* Chapitre 4).

1.3. Variations liées aux conditions climatiques

1.3.1 Composition chimique

Les conditions climatiques relatives aux années de récoltes des maïs de la thèse ont conduit à des différences importantes entre ensilages, notamment en termes de composition chimique et de digestibilité dans l'ensemble du tube digestif.

Sur le site de la Jaillière, les maïs récoltés en 2011 sont plus riches en amidon et inversement moins riches en NDF. L'année 2011, caractérisée par des pluies régulières et des températures optimales pour le remplissage des grains pendant la maturation a donc conduit à des teneurs en amidon plus importantes. Les teneurs en amidon plus faibles en 2012 s'expliquent par un remplissage du grain plus limité du fait de conditions de culture moins favorables en fin de cycle (pluies abondantes, températures plutôt basses, cf Chapitre « Matériel végétal de l'étude »).

Sur le site de Crouël, l'année 2012 a été particulièrement chaude et sèche et les records de températures enregistrés (cf chapitre « Matériel végétal de l'étude ») ont conduit à un assèchement de la fraction tige-feuilles et à une déshydratation rapide des grains limitant alors leur remplissage et donc leur enrichissement en amidon.

1.3.2 Digestibilité dans l'ensemble du tube digestif

Les conditions climatiques, comme la variété, ont plus d'impact sur la dMO que le stade de maturité. En effet, les ensilages de maïs réalisés en 2012 à La Jaillière (remplissage du grain limité du fait de conditions climatiques peu favorables) ont présenté une digestibilité de la MO et du NDF plus faible que ceux réalisés en 2011 sur le site de La Jaillière et que ceux récoltés en 2012 sur le site de Crouël (cf Figure 23). Par contre, l'effet des conditions climatiques sur la digestibilité de l'amidon est limité.

1.3.3 Constituants digestibles

Les quantités digestibles de MO et de ses constituants sont influencées par les conditions climatiques ($P < 0.01$) (cf Figure 27). Par contre, les ensilages de maïs récoltés à Crouël se distinguent nettement de ceux réalisés à La Jaillière, avec des teneurs en amidon digestible plus faible (en raison notamment de teneurs en amidon plus faibles) et avec des teneurs en NDF digestibles plus élevées (surtout dues à une forte digestibilité du NDF). Entre les deux années de récolte du site de La Jaillière, des différences sont aussi observables,

notamment au niveau de la fraction amidon. Les conditions climatiques de l'année 2011 à La Jaillière, favorables aux fortes teneurs en amidon des maïs cultivés, ont conduit à des ensilages de maïs avec des teneurs en amidon digestible plus élevées qu'en 2012 (+14 g/kg MS).

1.3.4 Dégradabilité ruminale (mesures *in sacco*)

Les conditions climatiques ont eu moins d'influence sur la dégradabilité *in sacco* de la plante entière que sur sa digestibilité dans l'ensemble du tube digestif (cf Figure 28).

Les conditions climatiques relatives à l'année 2012 sur le site de Crouël ressemblent fortement aux types d'aléas climatiques auxquels nous devons nous attendre avec le réchauffement climatique (Jouzel *et al*, 2014). Malgré la maîtrise possible des facteurs comme le stade de maturité à la récolte ou le type de variété utilisée, les conditions climatiques non contrôlables ont un effet significatif sur la digestibilité des ensilages de maïs. Les récentes études menées sur l'influence des changements climatiques sur la croissance des maïs (Moreau *et al*, 2008 ; Farrell and Gilliland, 2011) permettront sans doute d'apporter des solutions pour mieux appréhender la digestibilité et donc la valeur énergétique des ensilages de maïs face au réchauffement climatique.

1.4. Influence de la conservation en ensilage

L'équation M4, établie par Andrieu (1995) pour prévoir la digestibilité de la matière organique de l'ensilage de maïs nécessaire au calcul de sa valeur énergétique, utilise des critères chimiques et enzymatiques mesurés sur le maïs en vert. En effet, le prélèvement à la mise en silo facilite un échantillonnage représentatif de l'ensemble du matériel mis dans le silo. Il permet également de prévoir la valeur nutritive de l'ensilage de maïs avant l'ouverture du silo, ce qui est essentiel pour préparer le rationnement des animaux. Andrieu et Demarquilly (1974) ayant émis l'hypothèse que la dMO du maïs ensilage était équivalente à celle du maïs en vert, la dMO prévue à partir d'un échantillon en vert est donc directement transposée à celle de l'ensilage correspondant. Peut-on extrapoler cette hypothèse aux paramètres de dégradabilité de l'ensilage de maïs, critères nécessaires à l'élaboration des nouvelles tables d'alimentation ?

Dans le chapitre 2 (mise au point méthodologique de la technique *in sacco*) et dans le chapitre 3 (mesures *in sacco* à partir de la méthodologie établie dans le chapitre 2), l'influence de la fermentation dans l'ensilage sur la dégradabilité *in sacco* des maïs a été étudiée et

quantifiée. Alors que la teneur en MS de la plante entière et la teneur en amidon n'est pas affectée par la fermentation dans l'ensilage, les dégradabilités dans le rumen de la MS et de l'amidon sont plus élevées pour les ensilages de maïs que pour les maïs en vert dont ils proviennent (Figure 31).

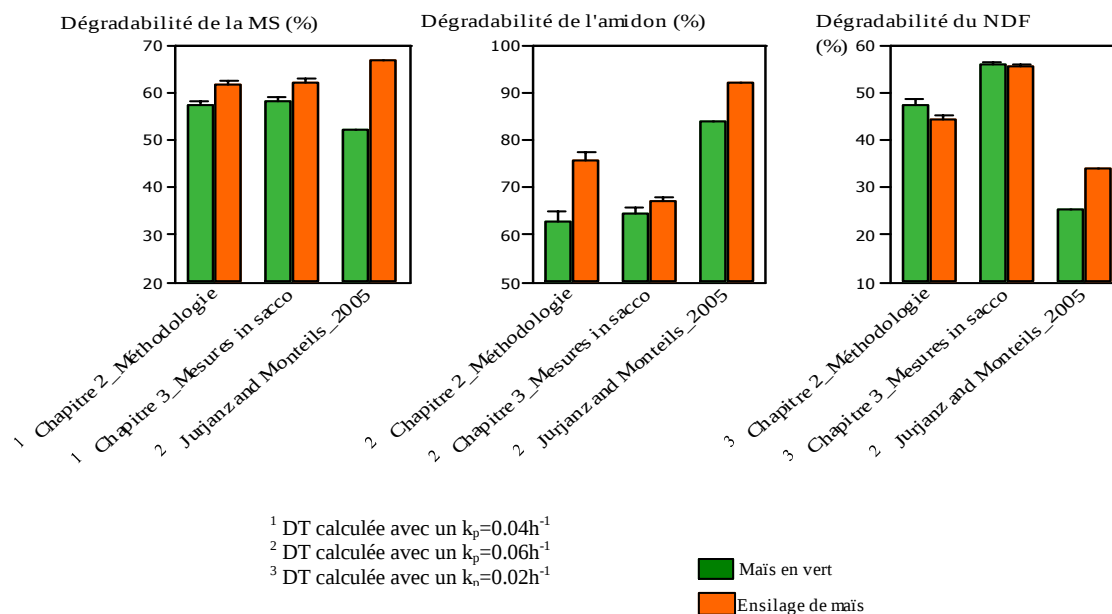


Figure 31 : Influence de la fermentation dans l'ensilage sur la dégradabilité in sacco (DT) de la MS, de l'amidon et du NDF

Dans l'expérimentation méthodologique (*cf* Chapitre 2), la dégradabilité du NDF est plus faible pour les maïs fermentés que pour les maïs en vert (constat sur deux variétés et deux stades de récoltes seulement) alors que dans l'étude *in sacco* sur l'ensemble des maïs, la dégradabilité du NDF n'est pas significativement différente ($P=0,25$) quel que soit le mode de conservation (vert ou fermenté).

Dans la littérature, la différence de dégradabilité *in sacco* entre l'ensilage de maïs et le maïs en vert a été rarement étudiée. Nos résultats sont tout de même en accord avec Jurjanz and Monteils (2005) qui montrent que la dégradabilité *in sacco* de la MS et de l'amidon sont plus élevées pour l'ensilage que pour le maïs en vert (Figure 31). Par contre, Jurjanz et Monteils (2005) rapportent une meilleure dégradabilité du NDF pour l'ensilage de maïs que pour le maïs en vert que nous n'avons pas observée ni dans notre étude méthodologique (*cf* Chapitre 2) ni dans l'étude *in sacco* de l'ensemble des maïs (*cf* Chapitre 3). Ces résultats controversés pourraient s'expliquer par des différences de conditionnement des échantillons entre l'étude *in sacco* de Jurjanz et Monteils (2005) (échantillons séchés et broyés à 1.5mm) et notre méthodologie (échantillons frais broyés à plus de 4mm, échantillons secs et broyés à

1mm et échantillons secs et broyés à 4mm). Les résultats de notre méthodologie *in sacco* (cf Chapitre 2) montrent effectivement que le séchage et le broyage à 4mm de l'échantillon est le seul conditionnement pour lequel il existe une différence significative de dégradabilité du NDF entre l'ensilage de maïs et le maïs en vert avec $ED2_{a\text{NDF fermenté}} < ED2_{a\text{NDF fermenté}}$ (Peyrat *et al*, 2014).

La dégradabilité de l'amidon des ensilages de maïs plus élevée par rapport à celle des maïs en vert s'explique principalement par l'hydrolyse partielle de la matrice protéique encapsulant les granules d'amidon au cours de la fermentation dans l'ensilage (Jurjan et Monteils, 2005).

Ces résultats suggèrent donc que l'utilisation d'échantillons de maïs en vert pour prévoir la dégradabilité de l'ensilage de maïs dans le rumen, sous-estimerait la dégradabilité de l'amidon. Comme énoncé précédemment, il est tout de même préférable, d'un point de vue pratique, de faire les prélèvements sur le maïs en vert. Afin de pouvoir utiliser la dégradabilité de l'amidon comme critère pour estimer l'énergie fermentescible pour les microbes dans les nouvelles tables d'alimentation (valeur PDIE), il serait donc nécessaire de pouvoir élaborer un facteur de correction entre la dégradabilité de l'amidon de l'ensilage de maïs et la dégradabilité de l'amidon de maïs en vert. Toutefois, le poids des différences de dégradabilité de l'amidon entre l'ensilage de maïs et les maïs en vert est faible : la teneur en amidon dégradable plus élevée de 38g par rapport à celle des maïs en vert ne représente qu'une différence de 1.9 g de PDIE.

Récemment, Der Bedrosian *et al* (2012) ont également montré que la digestibilité *in vitro* de l'amidon de l'ensilage de maïs augmente avec la durée de conservation notamment pour des stades de maturité tardifs (MS plante entière > 40%). Pour analyser plus précisément l'influence de la durée de conservation sur la dégradation de l'amidon et du NDF de l'ensilage de maïs dans le rumen, ARVALIS Institut du Végétal a récemment mené une étude *in sacco* à partir des maïs de la thèse (Férard *et al*, 2014). Les premiers résultats indiquent une hausse de la dégradabilité *in sacco* de l'amidon et de la MAT avec la durée de conservation. Ces premiers résultats montrent donc que la durée de conservation est également un facteur à prendre en compte dans la caractérisation de la valeur nutritive de l'ensilage de maïs.

2. Préviation des paramètres de la digestion

Aujourd'hui, la valeur énergétique de l'ensilage de maïs est estimée à partir de la prévision de la digestibilité de la matière organique (dMO) selon l'équation M4 établie par

Andrieu (1995). À partir de variétés actuelles et de stades de récoltes plus tardifs que ceux rencontrés il y'a quelques années, cette équation M4 prévoit-elle toujours bien la dMO *in vivo* des ensilages de maïs ? Cette équation M4 prévoit-elle, encore aujourd'hui, plus précisément la dMO de l'ensilage de maïs que les 3 autres équations (M1, M2 et M3) proposées par Andrieu (1995) ? A notre connaissance, aucune validation externe des équations M1, M2, M3 et M4, par rapport à des mesures de la dMO de l'ensilage de maïs sur moutons, n'a été réalisée jusqu'à présent. Après avoir répondu à ces questions, nous essaierons ensuite de progresser sur la caractérisation et la prévision de la dMO en proposant des critères complémentaires à la prévision actuelle et qui seraient liés à la nature et aux sites de digestion des substrats énergétiques (parois végétales et amidon) de l'ensilage de maïs.

2.1 Prévision de la digestibilité *in vivo* de la matière organique (dMO)

À partir de l'hypothèse d'équivalence entre la digestibilité de la MO de l'ensilage de maïs et celle du maïs en vert (Andrieu et Demarquilly, 1974b), Andrieu (1995) a proposé 4 équations de prévision de la dMO de l'ensilage de maïs à partir de critères mesurés sur le maïs en vert. Ces 4 équations ont été appliquées à la totalité des échantillons de maïs de la thèse (N=36) dont la dMO *in vivo* des ensilages correspondants a été mesurée. Les résultats montrent globalement qu'il y a une bonne liaison entre les valeurs prévues à partir des équations (M1, M2, M3 ou M4) et les valeurs mesurées (dMO *in vivo*) (Figure 32).

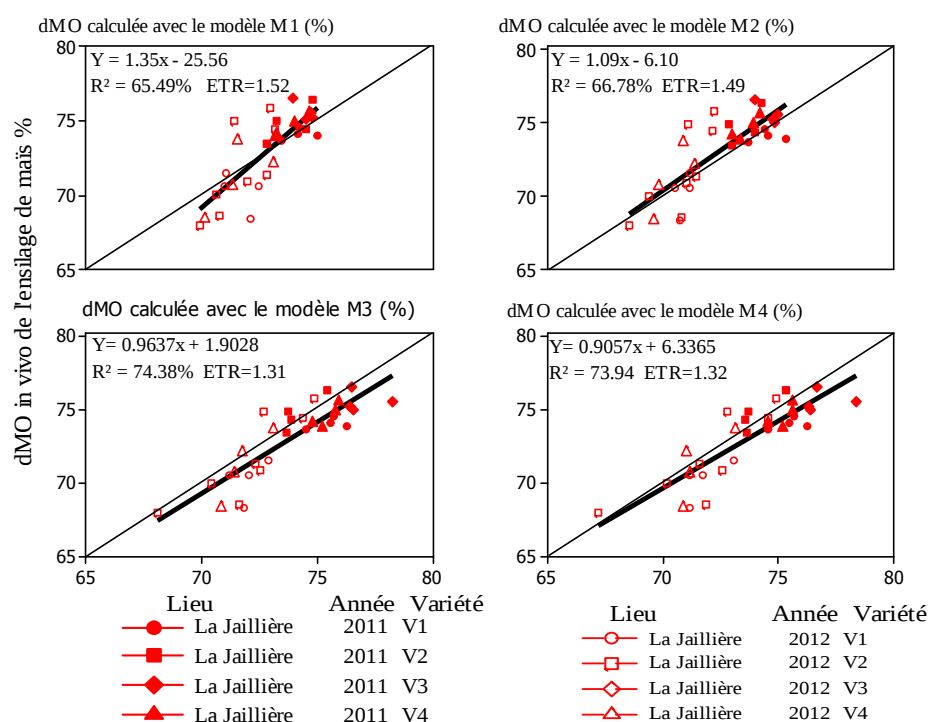


Figure 32 : Prévision de la dMO *in vivo* mesurée à partir des modèles M1, M2, M3 et M4 proposés par Andrieu (1995)

Les équations M3 et M4 sont celles qui expliquent le mieux la variabilité des dMO mesurées (respectivement $R^2=74,4\%$ et $ETR=1,31$; $R^2=73,9$ et $ETR=1,32$) et la relation entre valeurs prévues par M4 et mesurées *in vivo* est très proche de la bissectrice avec une pente de régression non significativement différente de 1. La prise en compte de la teneur en amidon pour prévoir la dMO *in vivo* dans le modèle M3 aurait pu être intéressante puisque le modèle M4 ne prend en compte que des critères liés à la plante entière (MAT et DCS) mais le coefficient affecté à la teneur en amidon dans le modèle M3 est très faible. Il pourra être envisagé de recalculer les coefficients de M3 avec le jeu de données de la thèse pour vérifier la relation entre la teneur en amidon et la dMO *in vivo*. Le critère le mieux corrélé à la dMO *in vivo* reste la digestibilité enzymatique sur plante entière (DCS) ($R^2=73,6\%$), ce qui explique pourquoi l'équation M3 mais surtout l'équation M4 expliquent bien la variabilité des dMO *in vivo*.

À notre connaissance, l'application de l'équation M4 aux 36 échantillons de maïs de la thèse constitue la première validation externe du modèle M4. Ces résultats sont encourageants et montrent qu'aujourd'hui, l'utilisation de cette équation sur des variétés actuelles et des stades tardifs reste pertinente. Cependant, il faut tout de même souligner que selon les variétés et l'année de récolte, la relation entre la dMO calculée par le modèle M4 et la dMO mesurée *in vivo*, n'est pas toujours aussi nette (*cf* Figure 32). Les faibles relations observées en 2011 s'expliquent surtout par la très faible variabilité des données. La plus grande variabilité des données, apportée notamment par les mesures en 2012, a donc contribué à la bonne relation entre la dMO *in vivo* et la dMO calculée par l'équation M4. Malgré tout, la plage de variation dMO *in vivo* dans cette étude est faible avec à peine 10 points d'écart entre les valeurs mesurées extrêmes. Comparativement à la dMO *in vivo* de graminées ou de légumineuses pour laquelle la plage de variation est plus importante (20 points d'écart intra-famille botanique), cette prévision de la dMO *in vivo* sur l'ensilage de maïs est donc relativement précise (écart-type résiduel inférieur à 2 alors qu'il est supérieur à 2 pour les graminées et les légumineuses).

L'application de l'équation M4 pour prévoir la dMO *in vivo*, au vu de la faible plage de variation, est donc pertinente dans cette étude et permet de valider l'hypothèse que l'analyse de l'échantillon en vert permet de prévoir la dMO de l'ensilage. Le modèle M4 permet également d'apprécier des écarts de digestibilité entre variétés et années.

Même si la prévision avec le modèle M4 fonctionne, cette équation ne prend pas en compte les critères liés à la partition de l'amidon et des parois végétales dans le rumen et le

compartiment intestinal. Il est donc nécessaire de rechercher des critères spécifiques pour prévoir ces paramètres digestifs complémentaires de la digestibilité dans le tube digestif total. Par ailleurs, les mesures *in vivo* de digestibilité sont lourdes à mettre en œuvre et des méthodes alternatives comme la dégradabilité *in sacco* dans le rumen sont intéressantes à évaluer

2.2 La dégradation *in sacco* permet-elle de prévoir la digestibilité *in vivo* ?

Les mesures *in sacco* pouvant être réalisées en plus grande série que les mesures de digestibilité *in vivo*, celles-ci pourraient constituer une alternative à la mesure *in vivo*. Mais la dégradation *in sacco* permet-elle vraiment de prévoir la digestibilité *in vivo* ?

L'étude des liaisons entre la digestibilité *in vivo* et dégradabilité théorique de la MS est très faible ($R^2=14,4\%$). La relation entre la dégradation *in sacco* de la MS et la dMO *in vivo* montre que la meilleure corrélation a été obtenue avec la dégradation *in sacco* de la MS après 48h ($R^2=74,2\%$, Figure 33).

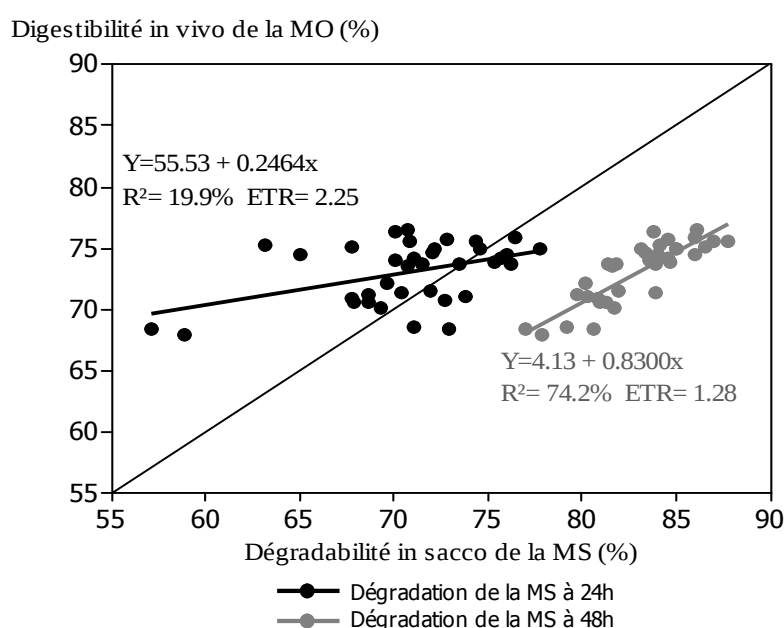


Figure 33 : Relation entre la dMO *in vivo* et la dégradation *in sacco* de la MS à 24h et à 48h

À 24h, la valeur moyenne de la dégradation *in sacco*, est plus proche de celle de la dMO *in vivo*, mais la liaison est moins étroite ($R^2=19,9\%$). Dans les conditions de mesure de la dMO sur le modèle mouton, le temps de séjour moyen des particules dans le rumen est effectivement de l'ordre de 25 à 30 h (Sauvant et Nozière, 2013). Cela peut expliquer pourquoi la dégradation *in sacco* à 48h surestime la dMO *in vivo* bien que ces deux variables soient très corrélées entre elles. La différence de méthode (*in sacco* vs *in vivo*) peut également

expliquer ce biais entre la dégradation *in sacco* à 48h et la dMO *in vivo*. Par ailleurs, compte tenu de la présence de sécrétions endogènes dans les fèces, la dMO mesurée *in vivo* est une digestibilité apparente qui concerne l'ensemble du tube digestif, et non une digestibilité réelle dans le rumen, ce qui peut aussi expliquer ce biais.

La relation entre la dNDF *in vivo* et la dégradabilité *in sacco* de la MS à 24h et à 48h est faible (respectivement $R^2=24,2\%$ et $R^2=5,8\%$, Figure 34). La relation entre la digestibilité *in vivo* du NDF et la dégradation *in sacco* du NDF à 48h et à 24h est faible également (respectivement $R^2=25,3$ et $R^2=26,2$). Ces différences entre la dNDF *in vivo* et la dégradabilité du NDF *in sacco* pourraient s'expliquer par la précision de la mesure *in sacco* (écart-type résiduel de l'ordre de 5 points).

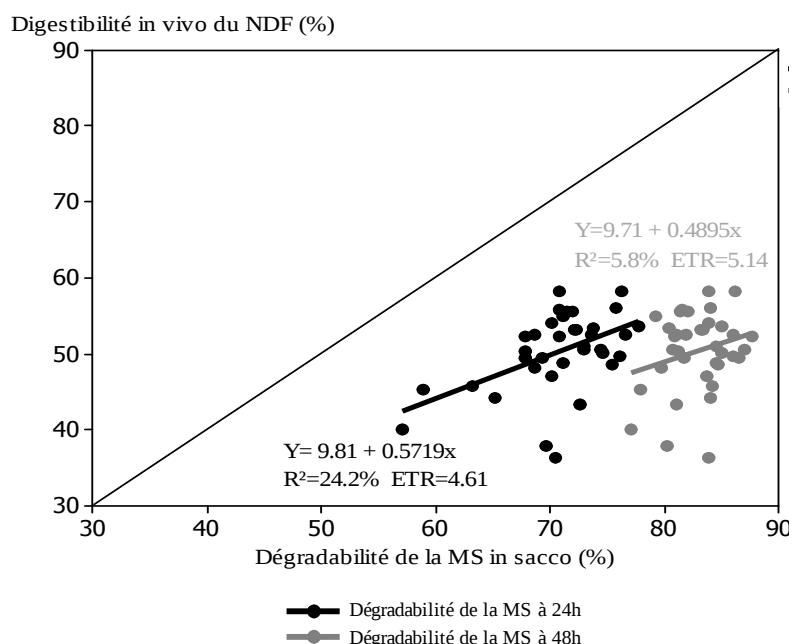


Figure 34 : Relation entre la digestibilité *in vivo* du NDF et la dégradation *in sacco* de la MS à 24h et à 48h

En considérant plutôt la fraction non digérée du NDF (NDFnd), évaluée à partir de la teneur en NDF de l'ensilage de maïs et de sa digestibilité *in vivo*, la relation entre *in vivo* et *in sacco* est plus étroite. La corrélation entre la teneur en NDF non digérée *in vivo* et la teneur en NDF non dégradée *in sacco* est meilleure à 48h ($R^2=65,4$, ETR=17,7) qu'à 24h ($R^2=41,7$, ETR=13,6 ; Figure 35).

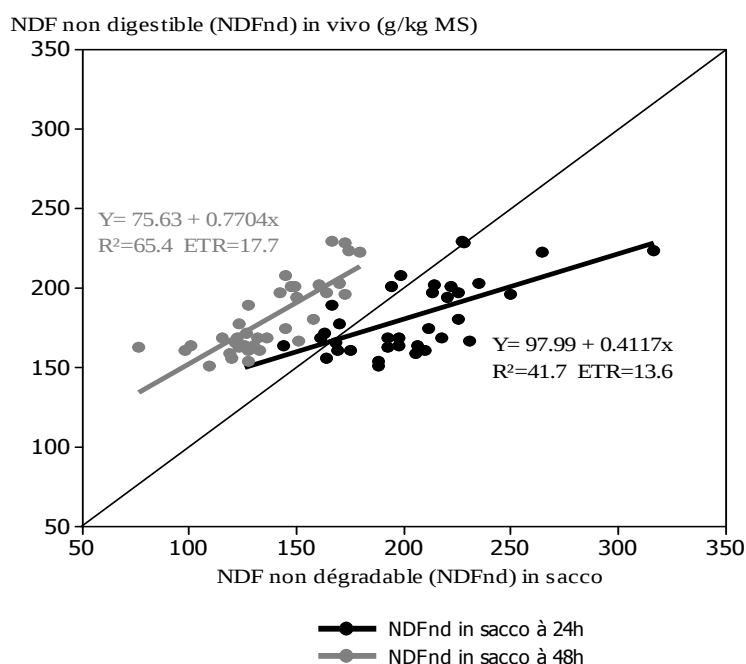


Figure 35 : Relation entre la quantité de NDF non digestible *in vivo* et la quantité de NDF non dégradable *in sacco* à 24h et à 48h

Au final, la méthode *in sacco* par l'estimation à 48h de la dégradation de la MS ou du NDFnd pourrait donc constituer une alternative aux mesures *in vivo*, jugées aujourd'hui longues et onéreuses (Opsit *et al.*, 2013). Cependant, les conditions de sa mise en œuvre doivent être bien raisonnées puisque le mode de conditionnement des échantillons peut influencer le niveau de dégradation *in sacco* de la MS et du NDF des ensilages de maïs (Peyrat *et al.*, 2014).

2.3 Relation entre la dMO *in vivo* et la fraction pariétale non digestible

Andrieu *et al.* (1993) ont montré que la dMO *in vivo* de l'ensilage de maïs est étroitement relié au NDFnd. À partir des 36 échantillons de cette étude, nous retrouvons cette relation ($R^2=96,3$, $ETR=0,49$, Figure 36). La dégradabilité de la MS à 48h peut ensuite être estimée à partir d'une calibration infrarouge (Cabon *et al.*, 2004) avec une bonne fiabilité ($R^2=0,81$; $ETR=1,4$ en validation croisée).

Cette fraction indigestible est également liée à la digestibilité du NDF par son calcul :

$$\text{NDFnd (g/kgMS)} = \text{teneur en NDF (g/kgMS)} \times (100 - \text{digestibilité du NDF}(\%))/100$$

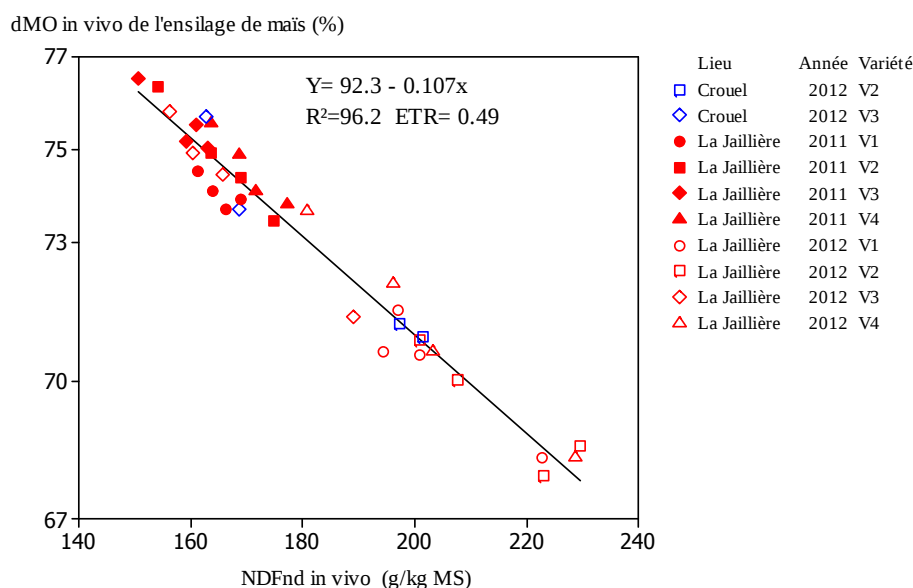


Figure 36 : Relation entre la dMO in vivo et la teneur en NDFnd in vivo

En essayant de prévoir la digestibilité du NDF *in vivo* par un critère mesurable au laboratoire, pourrait-on s'approcher de la dMO *in vivo* ?

Au lieu d'appliquer une digestibilité enzymatique sur la plante entière comme l'a fait Aufrère *et al* (1992) avec la DCS, nous avons donc réalisé une digestibilité enzymatique sur la fraction pariétale (Annexe 4). Même si elle explique presque la moitié de la digestibilité *in vivo* du NDF ($R^2=49,8\%$ à partir des mesures sur l'ensilage et $R^2=34,8\%$ à partir des mesures sur le vert), cette digestibilité enzymatique du NDF (DCNDF) sous-estime la digestibilité *in vivo* du NDF (Figure 37). Ce biais s'explique très certainement par une différence de méthode entre *in vitro* et *in vivo*.

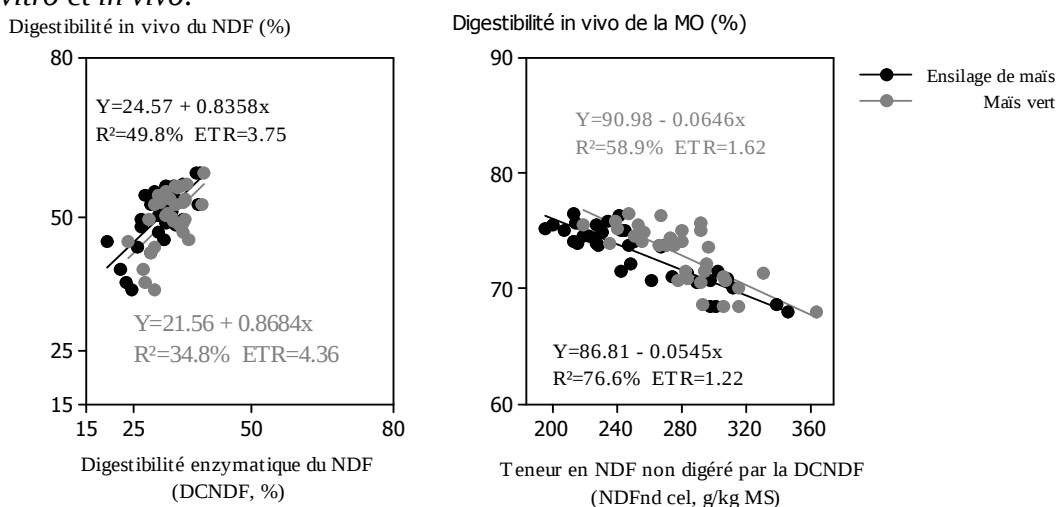


Figure 37 : Relation entre la digestibilité enzymatique du NDF (DCNDF) et la digestibilité *in vivo* du NDF et de la MO

Par contre, la liaison est étroite entre la fraction de NDF non digéré prévu par la DCNDF (NDFnd cel) et la dMO *in vivo* ($R^2=58,9\%$ à partir des mesures sur l'ensilage et $R^2=76,6\%$ à partir des mesures sur le vert) (Figure 37) et est équivalente à la relation entre la DCS et la dMO *in vivo* ($R^2=67,7\%$ à partir des mesures sur le vert et $R^2=73,6\%$ à partir des mesures sur l'ensilage, Figure 38). Ce critère DCNDF aurait pu être intéressant pour prendre en compte la fraction pariétale dans la prévision de la dMO *in vivo* mais les résultats obtenus ici à partir de 36 données ne permettent pas d'obtenir de meilleurs résultats qu'avec la DCS mesurée sur la plante entière.

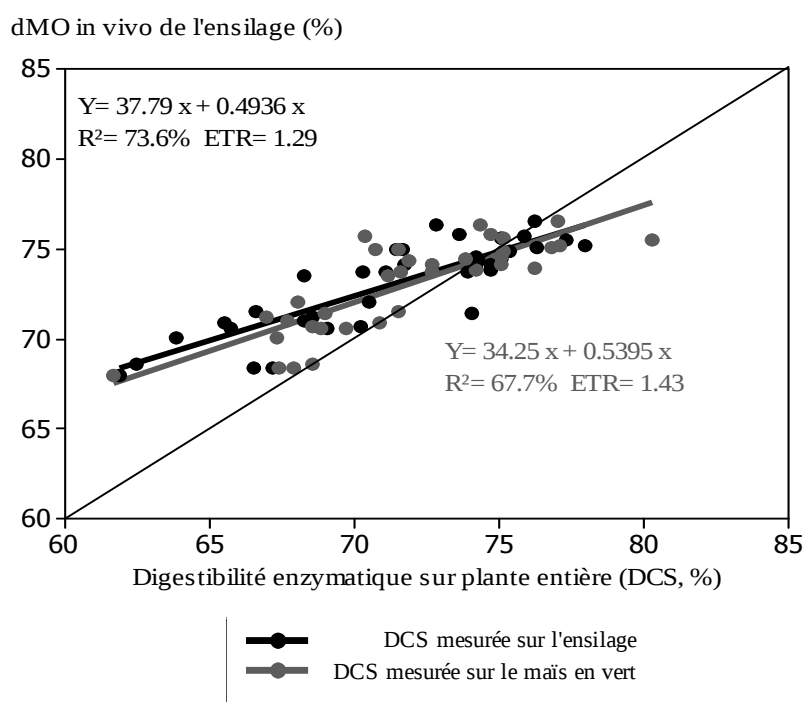


Figure 38 : Relation entre la digestibilité enzymatique de la plante entière (DCS) et la digestibilité *in vivo* de la MO

Barrière *et al* (1997) montrent l'intérêt du critère DINAG (Digestibilité de la fraction non-amidon non glucides solubles) élaboré par Argillier *et al* (1995) pour prendre en compte l'aspect de valeur alimentaire du maïs fourrage dans la sélection variétale. En assumant que la partie amidon et glucides solubles est entièrement digestible, Argillier *et al* (1995) ont élaboré le critère.

La liaison entre le critère DINAG et la digestibilité *in vivo* du NDF mesurée sur les 36 échantillons de cette étude est plutôt faible ($R^2=31,7\%$ à partir des mesures sur l'ensilage et $R^2=28,8\%$ à partir des mesures sur le vert, Figure 39) mais est, par contre, très proche de la bissectrice. Par ailleurs, le critère DINAG est bien relié à la dMO *in vivo* ($R^2=61,0\%$ à partir des mesures sur l'ensilage et $R^2=43,3\%$ à partir des mesures sur le vert) mais cela est surtout

dû au critère DCS qui est utilisé dans le calcul de DINAG. Le critère DCNDF élaboré dans cette étude est d'ailleurs très bien relié au critère DINAG ($R^2=68,5\%$) et l'avantage de ce critère DCNDF est qu'il est indépendant de la DCS.

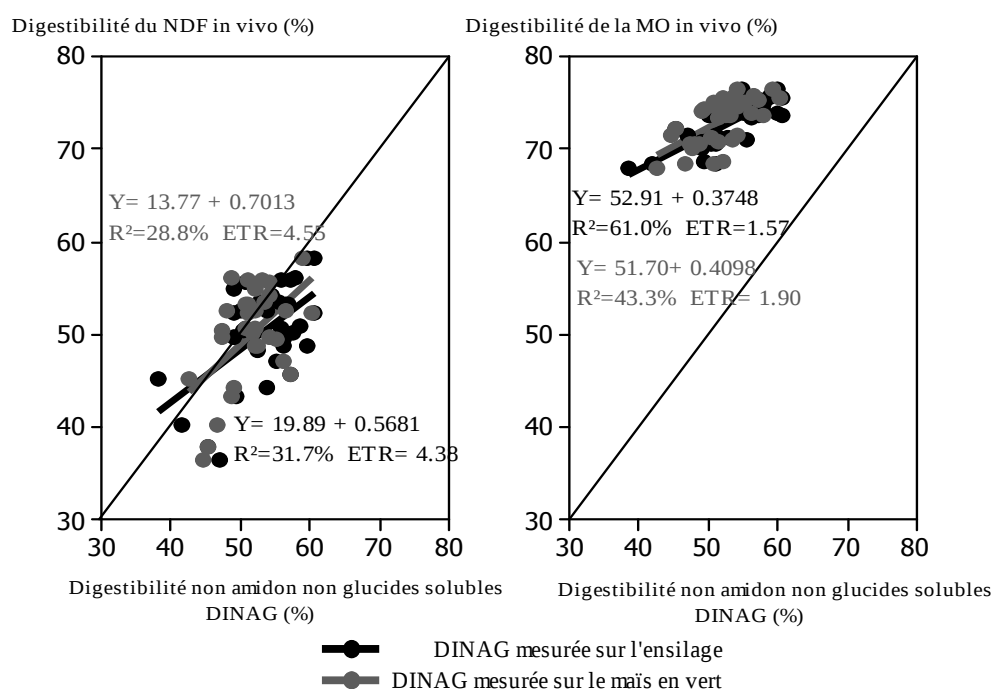


Figure 39 : Relation entre la digestibilité DINAG et la digestibilité du NDF in vivo et la digestibilité de la matière organique in vivo

Comme le critère DINAG, le critère DCNDF permet d'apprécier des différences entre les variétés (Figure 40).

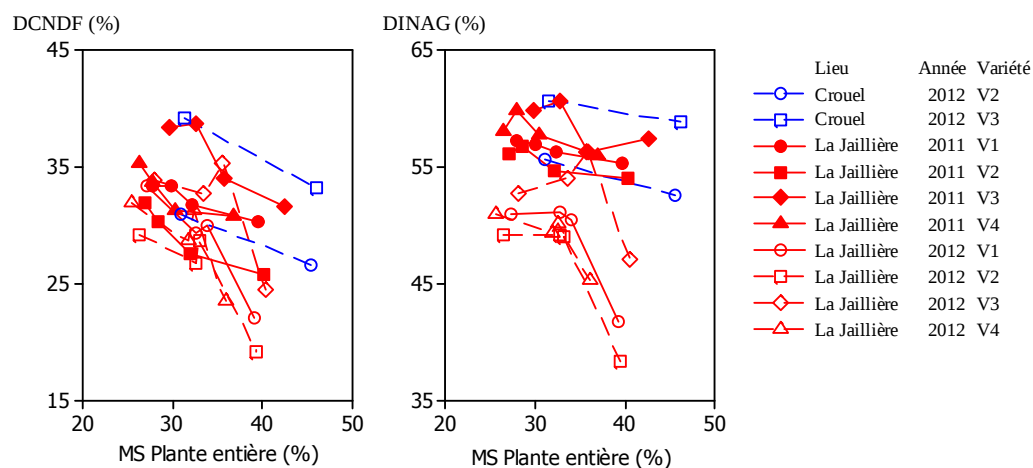


Figure 40 : Évolution du critère DCNDF et du critère DINAG selon la maturité, les variétés et l'année de récolte

D'un point de vue agronomique, la digestibilité de la fraction pariétale est reliée étroitement et de façon négative au nombre de jours de culture ($R=-0,79$), à la somme des

températures du cycle de culture ($R=-0,58$) et du cycle de la floraison à la récolte ($R=-0,71$), à la teneur en MS de l'épi complet ($R=-0,73$), à la MS des tiges-feuilles ($R=-0,51$) et au pourcentage d'épi ($R=-0,56$). (Tableau 11).

Tableau 11 : Corrélations entre la digestibilité *in vivo* du NDF (dNDF) et de la MO (dMO) de l'ensilage de maïs et des critères agronomiques mesurés sur le maïs en vert

	Nombre de jours de culture	Somme des T° du cycle de culture (°C)	Somme des T° du cycle de floraison (°C)	Teneur MS Plante entière (%)	Teneur MS épi (%)	Teneur MS Tiges-Feuilles (%)	% épi dans la plante	Rendement (tMS/ha)
dNDF (%)	R=-0,79 P<0,01	R=-0,58 P<0,01	R=-0,71 P<0,01	R=-0,68 P<0,01	R=0,73 P<0,01	R=-0,51 P<0,01	R=-0,56 P<0,01	R=-0,04 P=0,77
dMO (%)	R=-0,02 P=0,90	R=-0,07 P=0,50	R=-0,08 P=0,50	R=-0,07 P=0,57	R=0,04 P=0,73	R=-0,07 P=0,58	R=-0,33 P<0,01	R=-0,06 P=0,59

La plupart d'entre eux sont donc mieux reliés à la digestibilité du NDF que le critère MS plante entière ($R=-0,67$), aujourd'hui le plus utilisé sur le terrain pour décrire le stade de maturité du fourrage. La digestibilité de la MO n'est pas corrélée à ces mêmes critères agronomiques excepté le pourcentage d'épi ($R=0,34$). Comme nous l'avons vu précédemment, la digestibilité *in vivo* du NDF évolue plus fortement avec l'avancement de la maturité alors que la dMO *in vivo* est stable. Ces critères agronomiques peuvent donc permettre de mieux appréhender, directement sur le terrain, la digestibilité de la fraction pariétale (NDF) et raisonner ainsi la culture de maïs avant la récolte et la mise en silo.

L'étude de la digestibilité et de la dégradabilité du NDF dans le rumen permet donc d'estimer assez précisément la dMO *in vivo*. Mais qu'en est-il de la fraction amidon ?

2.4 Peut-on prévoir l'amidon dégradable ?

La partition de la dégradation de l'amidon entre le rumen et les intestins a une influence considérable sur la matière organique fermentescible dans le rumen et donc sur la fourniture de protéines microbiennes, ainsi que sur les profils de nutriments absorbables. Il est donc important de pouvoir prévoir la dégradation de l'amidon dans le rumen car c'est elle qui conditionne l'ensemble de sa partition digestive entre les organes (Sauvant et Nozière, 2013)

À partir des 32 données (maïs récoltés sur le site de La Jaillière en 2011 et 2012), nous avons donc cherché à caractériser les variations de la quantité d'amidon dégradable dans le

rumen, calculée à partir de la teneur en amidon du fourrage et de la dégradabilité ruminale de l'amidon qu'il contient (Figure 41).

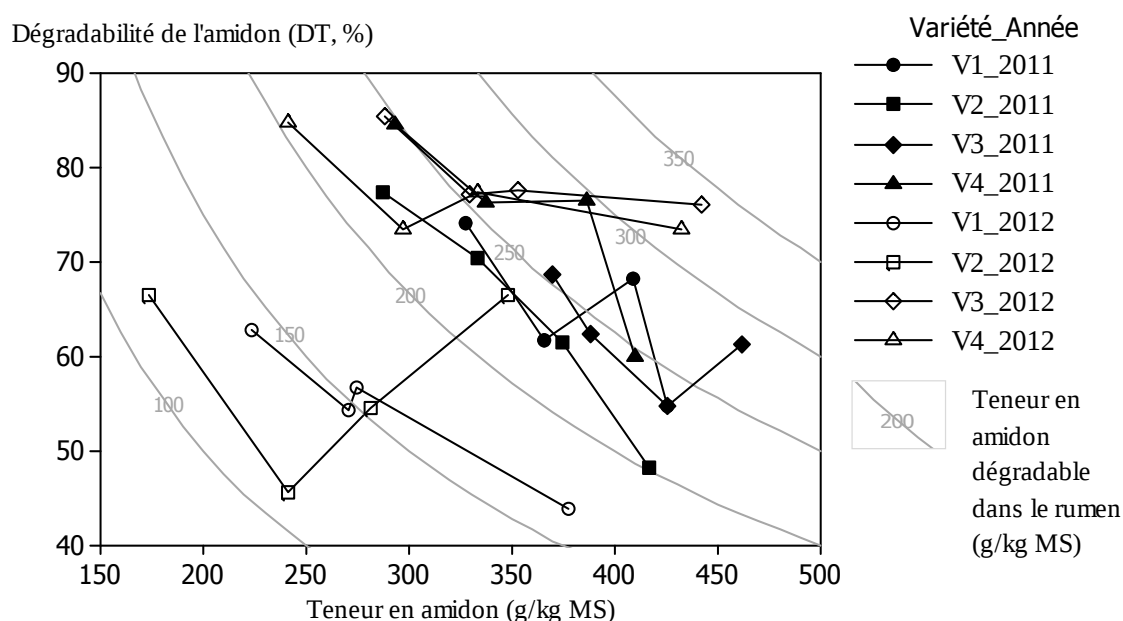


Figure 41 : Variabilité de la teneur en amidon dégradable dans le rumen des ensilages de maïs

Selon le type de variété, le stade de récolte choisi et les conditions climatiques du cycle de culture du maïs, la teneur en amidon dégradable peut varier fortement de 100 à 300 g/kg MS. En 2012, les variétés V1 et V2 ont présenté des teneurs en amidon dégradable dans le rumen sensiblement plus faibles (inférieures à 200 g/kg de MS), mais avec une dMO qui reste malgré tout supérieure à 69% pour ces deux variétés. En 2011, les teneurs en amidon entre variétés étaient plutôt similaires.

La teneur en amidon dégradable est donc un critère intéressant pour apprécier les écarts entre variétés, stade de récolte et année de culture.

Comme nous l'avons montré dans le chapitre 4, le flux duodénal d'amidon augmente fortement avec l'avancement de la maturité. Mais existe-t-il des critères liés à la maturité qui permettraient de prédire la dégradabilité de l'amidon dans le rumen et la teneur en amidon dégradable ?

Le critère « pourcentage d'épi » est bien corrélé à la teneur en amidon dégradable ($R=0,57$) (Tableau 12). Ces deux critères ne sont toutefois pas vraiment indépendants puisqu'ils sont très corrélés à la teneur en amidon. L'autre critère agronomique qui est

significativement corrélé ($P<0,05$) à la teneur en amidon dégradable dans le rumen est le nombre de jours de culture entre la date de semis et la date de récolte ($R=0,41$).

Tableau 12 : Corrélations de la dégradabilité théorique in sacco de l'amidon (DT) et de la teneur en amidon dégradable de l'ensilage de maïs avec des critères agronomiques, chimiques et enzymatiques mesurés sur le maïs en vert

Critères agronomiques								
	Nombre de jours de culture	Somme des T° du cycle de culture (°C)	Somme des T° du cycle de floraison (°C)	Teneur MS Plante entière (%)	Teneur MS épi (%)	Teneur MS Tiges-Feuilles (%)	% épi dans la plante	Rendement (tMS/ha)
Teneur en amidon dégradable (%)	R=0,41 P<0,05	R=0,27 P=0,14	R=0,20 P=0,27	R=0,29 P=0,11	R=0,28 P=0,12	R=0,05 P=0,80	R=-0,57 P<0,01	R=-0,34 P=0,06
DT Amidon (%)	R=-0,40 P<0,05	R=-0,38 P<0,05	R=-0,55 P<0,01	R=-0,49 P<0,01	R=-0,49 P<0,01	R=-0,47 P<0,01	R=-0,28 P=0,12	R=-0,54 P<0,01
Critères chimiques et enzymatiques								
	Amidon (%)	Glucides solubles (%)	DCS					
Teneur en amidon dégradable (%)	R=0,73 P<0,01	R=-0,40 P<0,05	R=0,69 P<0,01					
DT Amidon (%)	R=-0,14 P=0,44	R=0,21 P=0,26	R=0,14 P=0,44					

Les critères chimiques, teneur en amidon et en glucides solubles, sont reliés étroitement à la teneur en amidon dégradable (respectivement, $R=0,73$ et $R=-0,40$). La teneur en amidon dégradable augmente donc avec la diminution de la teneur en glucides solubles et l'augmentation de la teneur en amidon qui correspondent à la transformation des glucides solubles en amidon au cours du remplissage du grain.

La digestibilité enzymatique de la plante entière (DCS) est également corrélée de façon significative à la teneur en amidon dégradable ($R=0,69$). La DCS permettrait donc de prévoir au laboratoire 48% (R^2) de la teneur en amidon dégradable.

Combiné à la teneur en amidon, le nombre de jours de culture explique 60% de la teneur en amidon dégradable ($ETR=3,5$) alors qu'à lui seul, il n'explique que 17% (R^2) de la teneur en amidon dégradable observée. L'association entre le nombre de jours de culture et la teneur en glucides solubles ne permet d'expliquer que 17% de la teneur en amidon dégradable. Associées à la DCS, les teneurs en amidon et en glucides solubles expliquent respectivement 59% ($ETR=3,7$) et 60% ($ETR=3,5$) de la teneur en amidon dégradable. La meilleure combinaison entre le critère enzymatique DCS, un critère chimique et un critère agronomique

pour prévoir la teneur en amidon dégradable est l'association entre la DCS, la teneur en glucides solubles et le nombre de jours de culture ($R^2=0,64$ et $ETR=3,5$).

La dégradabilité théorique de l'amidon dans le rumen (DT) est corrélée étroitement et de façon négative à plusieurs critères agronomiques comme le nombre de jours de culture ($R=-0,40$), la somme des températures du cycle de culture ($R=-0,38$), la somme des températures du cycle de floraison ($R=-0,55$), la teneur en MS de la plante entière ($R=-0,49$), la teneur en MS de l'épi ($R=-0,49$), la teneur en MS des Tiges-Feuilles ($R=-0,47$), le pourcentage d'épi dans la plante entière ($R=-0,28$) et le rendement ($R=-0,54$).

L'augmentation de la valeur de tous ces critères agronomiques, qui représente l'avancement de la maturité du maïs, est donc corrélée à une diminution de la dégradabilité de l'amidon dans le rumen.

La teneur en amidon dégradable pourrait donc être estimée à partir de critères directement mesurables sur le terrain (comme le nombre de jours de culture) et au laboratoire (teneur en amidon et en glucides solubles, DCS). La dégradabilité théorique est plus difficile à estimer à partir de critères mesurables au laboratoire. Toutefois, les critères agronomiques représentant l'évolution de la maturité du maïs fourrage, pourraient permettre d'estimer la dégradabilité de l'amidon.

Conclusion et perspectives

Dans cette étude, **de nouvelles références de digestibilité *in vivo*** ont été acquises pour des variétés actuelles de maïs fourrage et une large gamme de stades de maturité correspondant mieux aux stades de récoltes actuellement observés en pratique. Aujourd'hui 50% des ensilages de maïs sont récoltés à des teneurs en MS supérieures à 35% (source Arvalis). La large gamme de stades de maturité disponible dans cette étude (médiane à 34% MS, valeur minimale à 24%MS et valeur maximale à 46%MS) à partir de 4 variétés, 2 années et 2 sites de récolte, va donc permettre d'actualiser les références de digestibilités *in vivo* (MO et NDF), dont les dernières références synthétisées dans les tables INRA (2007) dataient de 1987-1993. Par rapport à ces références, en caractérisant la composition de la MS des maïs étudiés (en g par kg MS), cette thèse montre qu'ils sont globalement plus riches en amidon et plus pauvres en parois végétales. La dMO des ensilages de maïs reste stable et comprise en moyenne entre 72 et 74%, avec un très faible effet du stade de maturité. En revanche, la digestibilité des parois végétales des maïs étudiés dans cette thèse est plus faible que celle rapportée dans les tables INRA 2007, cette diminution étant d'autant plus marquée que la teneur en MS du maïs est élevée. Si la dMO reste stable, c'est avant tout du fait de l'enrichissement en amidon des maïs étudiés. Les deux scénarios climatiques contrastés, en 2011 et 2012, ont montré que dans des conditions climatiques favorables (2011) les écarts de digestibilité entre stades de maturité et variété se réduisent, alors qu'ils se creusent dans un scénario climatique plus défavorable (2012).

Ce travail de thèse fait progresser les connaissances dans l'évaluation de la valeur nutritive du maïs fourrage en distinguant le **devenir des différentes fractions énergétiques de la plante (amidon et parois végétales) dans le rumen et les intestins**.

Aucune **méthodologie de référence** n'était disponible **pour mesurer la dégradabilité *in sacco* de l'amidon des fourrages**. Or dans le cadre du projet Systali de rénovation des unités INRA d'alimentation, ce critère est maintenant intégré en particulier dans le calcul de la MOF et donc de la valeur PDIE. Après avoir défini une méthodologie *in sacco* limitant les pertes particulières en amidon, des mesures de dégradabilité *in sacco* de la MS, de l'amidon et du NDF ont été réalisées sur l'ensemble du matériel végétal disponible dans cette étude. L'ensemble des 72 cinétiques de dégradation de la MS, de l'amidon et du NDF dans le rumen obtenues dans ce travail pourront être utilisées dans la mise à jour des tables qui accompagnent le nouveau système d'alimentation INRA. La dégradabilité de l'amidon contribuera notamment à une meilleure évaluation de la matière organique fermentescible dans le rumen et donc de la valeur azotée via la synthèse microbienne qui en résulte.

L'un des objectifs spécifiques de cette étude était de pouvoir **valider les mesures *in sacco* à partir de mesures *in vivo*** des flux de MO, d'amidon, de NDF à la sortie du rumen (technique des flux digestifs). Ces mesures *in vivo* réalisées sur le modèle bovin ont été comparées aux mesures de référence des digestibilités *in vivo* à partir du modèle mouton, ainsi qu'aux mesures *in sacco*. Globalement, la variabilité de la dégradabilité ruminale des constituants, mesurée *in sacco*, et de leur digestibilité mesurée *in vivo* dans l'ensemble du tube digestif du mouton a été confirmée *in vivo* sur le modèle bovin. Cette étude, est d'ailleurs, à notre connaissance, l'une des seules étude *in vivo* sur bovins analysant la partition de l'amidon et du NDF de l'ensilage de maïs distribué seul et sans concentré énergétique dans la ration. Toutefois, certains effets attendus à partir des données moutons, n'ont pas été observés sur le modèle vache (pas d'effet significatif de la variété ni du stade de maturité sur la dMO, pas d'effet significatif du stade de maturité sur la digestibilité des parois végétales). La technique de conservation des ensilages dans des silos boudins, retenue pour l'étude sur vaches, a engendré une variabilité inattendue de la composition chimique (NDF notamment) du matériel étudié, contrairement à la technique de conservation retenue pour l'ensemble des mesures de la thèse (ensilages enfermés dans des sacs sous vide). Cette différence entre les deux techniques de conservation rend la comparaison des données obtenues sur moutons et sur vaches difficile. Par ailleurs, les faibles niveaux d'ingestion des vaches dans cette étude ont sans doute limité la mise en évidence des effets recherchés.

À partir de l'ensemble des maïs de la thèse, **des relations entre les mesures *in vivo* et *in sacco* ont pu être établies**. Même si la relation obtenue entre la dégradation *in sacco* de la MS à 48h et la dMO *in vivo* est assez précise ($R^2=74\%$, ETR=1,28), l'utilisation du critère *in sacco* entraînerait toutefois une perte de précision significative dans l'estimation de la dMO *in vivo*. Sur le jeu de données de la thèse, la liaison entre la digestibilité enzymatique de la plante entière (DCS) mesurée au laboratoire et la dMO *in vivo* est aussi précise ($R^2=73\%$, ETR=1,29). Il nous paraît donc souhaitable de maintenir la mesure de la digestibilité *in vivo* sur moutons comme méthode de référence en recherchant des solutions pour s'affranchir de la mise en cage des animaux qui est remise en cause sur le plan éthique. Pour l'étude de la dégradabilité ruminale des fractions amylacées et azotées des aliments, la méthode *in sacco*, dont nous avons précisé les conditions d'utilisation pour les fourrages riches en amidon, reste une méthode de référence, même si son utilisation est soumise à des contraintes accrues liées aux restrictions de l'utilisation des animaux munis de canules pour des raisons éthiques.

Des **méthodes de laboratoire** (combinant mesures chimiques et enzymatiques) sont toutefois disponibles **pour prévoir la dMO *in vivo***. Notre travail a montré que le modèle de prévision M4, actuellement utilisé, reste pertinent ; il a en effet permis de prédire de façon très satisfaisante et sans biais, la variabilité des dMO mesurées *in vivo* sur moutons. Ceci est en particulier dû à la relation très étroite entre la dMO *in vivo* et la DCS. Ainsi, dans cette expérimentation réalisée sur des variétés de maïs actuelles, le modèle M4 a prédit, à partir de d'échantillons prélevés en vert, 74% de la variabilité de la dMO *in vivo*, et ce malgré une faible plage de variation des dMO. Pour rappel, ce modèle a été élaboré à partir de variétés de maïs datant de plus d'une vingtaine d'années.

Même si la prévision de la dMO *in vivo* par le modèle M4 est satisfaisante, cette équation ne prend pas en compte de façon explicite la nature (essentiellement amidon vs parois végétales) de la MO digérée, le principal facteur de variation de la dMO étant la teneur en parois végétales indigestibles. Le critère DINAG (défini comme une digestibilité de la fraction non amidon non glucides solubles) constituait une première approche pour évaluer la teneur en parois végétales indigestibles. Sur le jeu de données de la thèse, ce critère est également bien relié à la dMO *in vivo* mais cela est principalement dû au critère DCS qui est utilisé dans le calcul du DINAG. Les essais mis en place dans ce travail de thèse ont montré que la digestibilité enzymatique sur résidu pariétal (DCNDF) ne permettait pas d'obtenir une prévision significativement améliorée de la teneur en parois végétales indigestibles ou de la dMO *in vivo* par rapport à la digestibilité pepsine-cellulase (DCS) classique utilisée dans le modèle M4. Par ailleurs, une autre piste a été testée à partir de critères agronomiques et certains critères (nombre de jours de culture, somme des températures du cycle de culture ou de floraison, teneur en MS de la plante entière, teneur en MS de l'épi, teneur en MS des tiges et feuilles, pourcentage d'épi dans la plante entière, rendement de la culture en t MS/ha) se révèlent potentiellement intéressants pour prévoir la digestibilité des parois végétales dans l'ensemble du tube digestif. L'essentiel des maïs étudiés dans cette thèse ayant été cultivés en un même lieu, il convient toutefois d'être prudent sur leur potentiel prédictif et il serait nécessaire d'élargir la gamme des milieux pédoclimatiques pour approfondir leur étude.

Concernant l'amidon, la partition de sa digestion entre le rumen et les intestins a une influence non négligeable sur la matière organique fermentée dans le rumen et donc sur la fourniture de protéines microbiennes, ainsi que sur les profils de nutriments absorbables. Il est donc important de pouvoir **prévoir la dégradation de l'amidon dans le rumen** car c'est elle qui conditionne l'ensemble de sa partition digestive entre les organes. La combinaison entre

des critères chimiques (teneur en amidon, teneur en glucides solubles), des critères enzymatiques (DCS) et les critères agronomiques cités précédemment est intéressante pour la prévision de la teneur en amidon dégradable et de la dégradabilité de l'amidon dans le rumen. Ces critères pourraient donc constituer de nouveaux indicateurs de la teneur en amidon dégradable qui soient mesurables directement au champ et au laboratoire avant la mise en silo.

La vitrosité, indicateur de la maturité et du type d'endosperme du grain, est reliée à la dégradabilité de l'amidon dans le rumen. La mesure de la vitrosité (par des méthodes physiques ou directement par spectrophotométrie infrarouge), pourra constituer une piste intéressante pour prévoir plus précisément la teneur en amidon dégradable dans le rumen.

Suite à ce travail de thèse et à l'acquisition de nouvelles références de digestibilité *in vivo* et il sera intéressant de les associer aux valeurs de digestibilité ayant servi à l'élaboration des valeurs tables INRA (en intégrant un facteur essai par la technique de méta-analyse) pour voir si les moyennes de dMO ou de dNDF des tables INRA sont modifiées (notamment pour les stades tardifs supérieur à 35%MS).

Concernant la dégradation de l'amidon dans le rumen, il sera intéressant d'associer les données de cette thèse à des données issues de la littérature étudiant l'effet de la maturité sur la dégradabilité *in situ* de l'amidon dans le rumen (l'intégration du facteur essai par méta-analyse serait aussi nécessaire). Une base de données *in vivo* sur la digestibilité de l'amidon dans le rumen selon la maturité et la variété, pourra aussi être élaborée à partir des données de la littérature et de ce travail. Mais dans notre étude, les mesures *in vivo* ont été réalisées sur des vaches taries avec des faibles niveaux d'ingestion et nourries avec de l'ensilage de maïs et de l'urée seulement. Il sera nécessaire, pour se rapprocher des données de la littérature mais aussi des conditions réelles de terrain, de reprendre les mêmes mesures *in vivo* en utilisant des vaches en production nourries avec un régime à base d'ensilage de maïs (seule source d'amidon) et de concentré énergétique à base de parois digestibles (pulpe de betterave, coque de soja, etc...).

Des travaux pourront également être engagés pour poursuivre la recherche sur l'amélioration de la prévision de la dMO et de la valeur nutritive du maïs fourrage. Dans la plupart des pays en Europe (Angleterre, Suède, Allemagne,...), des méthodes de mesures *in vitro* sont couplées à des mesures de composition chimiques pour prévoir la valeur nutritive de l'ensilage de maïs. Aux États-Unis et au Canada, des équations ont d'ailleurs été élaborées

à partir de critères chimiques (NDF, MAT, amidon et glucides solubles) et enzymatiques (digestibilité *in vitro* du NDF) et expliquent plus de la moitié de la variabilité de la digestibilité *in vivo* des fourrages. Enfin dans la plupart des pays, des mesures spectrales (spectrophotométrie infrarouge, SPIR) sont aussi utilisées pour prévoir la composition chimique des ensilages de maïs et les digestibilités enzymatiques ou *in vitro* nécessaires à l'estimation de la dMO *in vivo*. La SPIR peut aussi être utilisée pour prévoir directement la dégradabilité des constituants du maïs dans le rumen.

..

Références bibliographiques

- Aerts, J.V., de Brabander, D.L., Cottyn, B.G., Boucque, Ch.V., Buysse, F.X., 1976. Evolution de la composition, de la digestibilité et du rendement du maïs en fonction du stade de maturité. *Revue suisse d'Agriculture* 2, 379-430.
- Agneessens, R., Dardenne, P., Lecompte, P., Dujoux, D., Fourneau, T., 1995. Prédiction de la digestibilité du maïs ensilage par l'étude de la dégradabilité enzymatique des parois cellulaires. *Annales de Zootechnie* 44, 39.
- Ali, M., Weisbjerg, M.R., Cone, J.W., van Duinkerkenb, G., Blok, M.C., Bruinenberg, M., Hendriks, W.H., 2012. Postruminal degradation of crude protein, neutral detergent fibre and starch of maize and grass silages in dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 177, 172-179.
- Allen, M., 2009. Maximizing digestible intake of corn silage based diets: Part 2. *Michigan Dairy Review* 14, 4-7.
- Andrae, J.G., Hunt, C.W., Pritchard, G.T., Kennington, L.R., Harrison, J.H., Kezar, W., Mahanna W.C., 2001. Effect of hybrid, maturity, and mechanical processing of corn silage on intake and digestibility by beef cattle. *Journal of Animal Science* 79, 2268–2275.
- Andrieu, J., Demarquilly, C., 1974a. Valeur alimentaire du maïs fourrage : 2. Influence du stade de végétation, de la variété, du peuplement, de l'enrichissement en épis et de l'addition d'urée sur la digestibilité et l'ingestibilité de l'ensilage de maïs. *Annales de Zootechnie* 23(1), 1-25.
- Andrieu, J., Demarquilly, C., 1974b. Valeur alimentaire du maïs fourrage : 3. Influence de la composition et des caractéristiques fermentaires sur la digestibilité et l'ingestibilité des ensilages de maïs. *Annales de Zootechnie* 23(1), 27-43.
- Andrieu, J., 1976. Agronomic factors affecting the growth and composition of the maize plant. *Animal Feed Science and Technology* 1, 263-271.
- Andrieu, J., Demarquilly, C., Dardenne, P., Barrière, Y., Lila, M., Maupetit, P., Rivière, F., Femenias, N., 1993. Composition and nutritive value of whole maize plants fed fresh to sheep: 1. Factors of variation. *Annales de Zootechnie* 42, 221-249.
- Andrieu J., Aufrère J., 1996. Prédiction à partir de différentes méthodes (physique, chimique et biologique) de la digestibilité et de la valeur énergétique de la plante de maïs à l'état frais, *Colloque maïs ensilage*, Nantes, 61-69.
- Andrieu, J., Barrière, Y., Demarquilly, C., 1999. Digestibilité et valeur énergétique des ensilages de maïs : le point sur les méthodes de prédiction au laboratoire. *Inra Production Animale* 12(5), 391-396.
- Argillier, O., Barrière, Y., Hébert, Y. 1995. Genetic variation and selection criteria for digestibility traits of forage maize. *Euphytica* 82, 175-184.
- Argillier, O., Barrière, Y., 1996. Valeur alimentaire et inscription des variétés de maïs ensilage aux catalogues officiels en Europe. *Fourrages* 146, 131-140.

- Arrigo, Y., Stoll, P., 2012. Estimation de la valeur nutritive de l'ensilage de maïs. Recherche Agronomique Suisse 3(9), 442-449.
- Arriola, K.G., Kim, S.C., Staples, C.R., Adesogan, A.T., 2012. Stay-green ranking and maturity of corn hybrids: 2. Effects on the performance of lactating dairy cows. Journal of Dairy Science 95(2), 975-985.
- Arsić, S., Kljajić, N., Vuković, P., 2012. Economic profitability of fodder production for young cattle fattening. Economic Insights-Trends and Challenges 1(3), 39-46.
- ARVALIS Institut du Végétal., 2013. Réunion technique régionale maïs prairies. Maison de l'agriculture. Rennes, France.
- Aufrère, J., Etude de la prévision de la digestibilité des fourrages par une méthode enzymatique. Annales de Zootechnie 31,111-130.
- Aufrère, J., Graviou, D., Demarquilly, C., Andrieu, J., Emile, J.C., Giovanni, R., Maupetit, P., 1992. Estimation of organic matter digestibility of whole maize plants by laboratory methods. Animal Feed Science and Technology 36, 187-204.
- Bal, M.A., 2006. Effects of hybrid type, stage of maturity, and fermentation length on whole plant corn silage quality. Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences 30, 331-336.
- Barrière, Y., Emile, J.C., Traineau, R., Hebert, Y., 1992. Variabilité génétique de la digestibilité du maïs ensilage mesurée sur des moutons standards. Inra Production Animale 5(4), 247-255.
- Barrière, Y., Emile, J.C., Argillier, O., Hebert, Y., 1995. Effets du génotype de maïs ensilage sur les performances zootechniques de vaches laitières. Inra Production Animale 8(5), 315-320.
- Barrière, Y., Argillier, O., Michalet-Doreau, B., Hébert, Y., Guingo, E., Giauffret, C., Emile, J.C., 1997. Relevant traits, genetic variation and breeding strategies in early silage maize. Agronomie 17, 395-411.
- Barrière, Y., Emile, J.C., 2000a. Le maïs fourrage : I - Origine, évolution, ressources génétiques et méthodes de sélection. Fourrages 162, 107-119.
- Barrière, Y., Emile, J.C., 2000b. Le maïs fourrage : II- Le maïs fourrage. Evaluation et perspectives de progrès génétiques sur les caractères de valeur agronomique 163, 209-220.
- Barrière, Y., Emile, J.C., 2000c. Le maïs fourrage : III- Évaluation et perspectives de progrès génétiques sur les caractères de valeur alimentaire. Fourrages 163, 221-238.
- Barrière, Y., Guillet, C., Goffner, D., Pichon, M., 2003. Genetic variation and breeding strategies for improved cell wall digestibility in annual forage crops. A review. Animal Research 52(3), 193-228.

- Barrière, Y., Emile, J.C., Traineau, R., Briand, M., Gallais, A., 2004. Genetic variation for organic matter and cell wall digestibility in silage maize. Lessons from a 34-year long experiment with sheep in digestibility crates. *Maydica*, 49, 115-126.
- Barrière, Y., Alber, D., Dolstra, O., Lapierre, C., Motto, M., Ordas, A., Van Waes, J., Vlaswinkel, L., Welcker, C., Monod, J.P, 2005. Past and prospects of forage maize breeding in Europe. 1. The grass cell wall as a basis of genetic variation and future improvements in feeding value. *Maydica* 50, 259-274.
- Baumont R., Champciaux P., Agabriel J., Andrieu J., Aufrere J., Michalet-Doreau B., Demarquilly C., 1999. Une démarche intégrée pour prévoir la valeur des aliments pour les ruminants : PrévAlim pour INRAtion. *INRA Productions Animales*, 12, 183-194.
- Baumont, R., Arrigo, Y., Niderkorn, V., 2011. Transformation des plantes au cours de leur conservation et conséquences sur leur valeur pour les ruminants. *Fourrages* 205, 35-46.
- Bloc, D., Gouet, J.P., 1978. Influence des sommes des températures sur la maturité du maïs. Application au classement des variétés. Doc interne AGPM.
- Bloc, D., Gay, J.P., Gouet, J.P., 1984. Evolution de la teneur en eau et du poids de 1000 grains pendant la maturation. In : *Physiologie et Production Du Maïs*, eds INRA, Paris, France, pp 135-145.
- Boon, E.J.M.C., Engels, F.M., Struik, P.C., Cone, J.W., 2005. Stem characteristics of two forage maize (*Zea mays* L.) cultivars varying in whole plant digestibility. 2. Relation between in vitro rumen fermentation characteristics and anatomical and chemical features within a single internode. *Netherlands Journal of Agricultural and Science* 53, 87-109.
- Boon, E.J.M.C., Struik, P.C., Engels, F.M., Cone, J.W., 2012. Stem characteristics of two forage maize (*zea mays* l.) cultivars varying in whole plant digestibility. 4. Changes during the growing season in anatomy and chemical composition in relation to fermentation characteristics of a lower internode. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences* 59, 13-23.
- Brocard, V., Leclerc, M.C., 2010. La digestion des aliments. In : *Guide pratique de l'alimentation du troupeau bovin laitier*, Brocard, V., Brunschwig, P., Legarto, J., Paccard, P., Rouillé B., Bastien, D., Leclerc, M.C., (Eds), eds Quae, Institut de l'élevage, Paris, France, p16-20.
- Browne, E.M., Juniper, D.T., Bryant, M.J., Beever, D.E., 2005. Apparent digestibility and nitrogen utilization of diets based on maize silage harvested at three stages of maturity and fed to steers. *Grass and Forage Science* 60(3), 274-282
- Cabon, G., Pruvost, L., Cosson, C., Garreau, R. 2004. Dégradation ruminale du maïs-fourrage : prédiction en spectrométrie dans le proche infrarouge. *Rencontres Recherches Ruminants* 11, 261.

- Cabon, G., Carpentier, B., 2012. Maïs fourrage : maîtriser la qualité pour les ruminants. Caractériser la valeur nutritionnelle du maïs fourrage pour adapter la complémentation. In : Maïs grain humide et maïs fourrage : au cœur de la rentabilité des élevages. ARVALIS Institut du végétal. Colloque valorisation animale. Maison de la RATP, Paris, France, p 61-74
- Cadot, V., Le Clerc, V., 2010. Etude de la diversité des variétés inscrites au catalogue français des espèces agricoles cultivées de 1950 à nos jours : exemples du pois et du maïs. Le Sélectionneur Français 61, 15-31.
- Carles, B., Dulphy J.P., 1980. Comportement alimentaire comparé des ovins et des bovins. Relation avec la digestion des aliments. *Reproduction Nutrition Development*. 20, 1633-1639.
- Carpentier, B., Cabon, G., 2011. Le maïs fourrage : élaboration du rendement et de la qualité, récolte et conservation. *Fourrages* 205, 11-23.
- Chenost, M., Martin-Rosset, W., 1985. Comparaison entre espèces (mouton, cheval, bovin) de la digestibilité et des quantités ingérées des fourrages verts. *Annales de Zootechnie* 34(3), 291-312.
- Cone, J.W., Van Gelder, A.H., Van Schooten, H.A., Groten, J.A.M., 2007. Effects of forage maize type and maturity stage on in vitro rumen fermentation characteristics. *Netherlands Journal of Agricultural and Science* 55, 139-154.
- Coors, J.G., Albrecht, A., Bures, E.J., 1997. Ear-fill effects on yield and quality of corn silage. *Crop Science* 37, 243-247.
- Correa, C.E.S., Shaver, R.D., Pereira, M.N., Lauer, J.G., Kohn K., 2002. Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. *Journal of Dairy Science* 85:3008-3012.
- Courtial, A., Thomas, J., Reymond, M., Méchin, V., Grima-Pettenati, J., Barrière, Y., 2013. Targeted linkage map densification to improve cell wall related QTL detection and interpretation in maize. *Theoretical and Applied Genetics*. 126, 1151-1165.
- Daccord, R., Arrigo, Y., Vogel, R., 1996. Valeur nutritive de l'ensilage de maïs. *Revue Suisse d'Agriculture* 28, 17-21.
- Dhanoa, M.S., 1988. On the analysis of dacron bag data for low degradability feeds. *Grass and Forage Science* 43, 441-444.
- Damiran, D., DelCurto, T., Bohnert, D.W., Findholt, S.L., 2008. Comparison of techniques and grinding size to estimate digestibility of forage based ruminant diets. *Animal Feed Science and Technology* 141, 15-35.
- Demarquilly, C., 1969. Valeur alimentaire du maïs fourrage : 1. Composition chimique et digestibilité du maïs sur pied. *Annales de Zootechnie* 18(1), 17-32.

- Demarquilly, C., M. Chenost. Étude de la digestion des fourrages dans le rumen par la méthode des sachets de nylon ; liaisons avec la valeur alimentaire. Annales de Zootechnie 18 (4), 419–436.
- Demarquilly, C., 1994. Facteurs de variation de la valeur nutritive du maïs ensilage. Inra Production Animale. 7(3), 177-189.
- Demarquilly, C., Chenost, M., Giger, S., 1995. Pertes fécales et digestibilité des aliments des rations. In :Nutrition des ruminants domestiques, (Eds) Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.H., Journet, M., eds INRA, Paris, France, p.602-647.
- Der Bedrosian, M.C., Nestor Jr, K.E., Kung Jr, L., 2012. The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. Journal of Dairy Science 95, 5115-5126.
- Dos Santos, R.D., Pereira, L.G.R., Neves, A.L.A., De Araujo, G.G.L., De Arago, A.S.L., Chizotti, M.L., 2011. Intake and total apparent digestibility in lambs fed six maize varieties in the Brazilian semiarid. Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science, 40(12), 2922-2928.
- Duburcq, J.B., Bonhomme, R., Derieux, M., 1983. Durée des phases végétative et reproductrice chez le maïs. Influence du génotype et du milieu. Agronomie 3(10), 941-946.
- Dulphy, J.P, Demarquilly C., Baumont R., Jailler, M., L’Hotelier L., Dragomir C., 1999. Study of modes of preparation of fresh and conserved forage samples for measurement of their dry matter and nitrogen degradations in the rumen. Annales de Zootechnie 48, 275–288.
- Faichney, G. J., 1993. Digesta flow. In: J. M. Forbes and J. France, (Eds), Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism, CAB International, Wallingford, UK, p. 53-85
- Fanchone, A., Nozière, P., Portelli, J., Duriot, B., Largeau, V., Doreau, M., 2013. Effects of nitrogen underfeeding and energy source on nitrogen ruminal metabolism, digestion, and nitrogen partitioning in dairy cows. Journal of Animal Science 91, 895-906.
- Farrell, A.D., Gilliland, T.J., 2011. Yield and quality of forage maize grown under marginal climatic conditions in Northern Ireland. Grass and Forage Science 66, 214–223.
- Férard, A., Crocq, G., Meslier, E., 2014. Effet de la durée de conservation sur la digestibilité de l’ensilage de maïs. Rencontres Recherches Ruminants 21 (*sous presse*).
- Fernandez, I., 2003. Influence de la finesse de hachage des ensilages de maïs sur leur digestion (amidon et parois végétales) et leur ingestibilité par les vaches laitières. 170 p. École doctorale des sciences de la vie et de la santé, Thèse de l’Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France.
- Fernandez, I., Nozière, P., Michalet-Doreau, B., 2004. Site and extent of starch digestion of whole-plant maize silages differing in maturity stage and chop length, in dairy cows. Livestock Production Science 89(2–3), 147-157.

- Ferraretto, L.F., Shaver, R.D., 2012. Meta-analysis: effect of corn silage harvest practices on intake, digestion, and milk production by dairy cows. *The Professional Animal Scientist* 28, 141–149.
- Flachowsky, G., Peyker, W., Schneider, A., Henkel, K., 1993. Fibre analyses and in sacco degradability of plant fractions of two corn varieties harvested at various times. *Animal Feed Science and Technology* 4-, 41–50.
- Gay, J.P., 1984. *Fabuleux maïs*. AGPM, Pau, France
- Goytino, B., Gay, J.P., 1991. Importance respective des périodes de formation, de remplissage et de maturation du grain dans la composition du rendement. In : *Physiologie et Production Du Maïs*, eds INRA, Paris, France, pp 207-214.
- Harris, C.E., 1965. The digestibility of fodder maize and maize silage. *Experimental Agriculture* 1, 121–123.
- Hepting, L., 1984. Grüner Mais bis zur Erntesteigt dadurch der Ertrag ? *Top Agrar* 3, 80-82.
- Herrmann, C., Heiermann, M., Idler, C., 2011. Effects of ensiling, silage additives and storage period on methane formation of biogas crops. *Bioresource Technology* 102, 5153-5161.
- Hristov, A. N., 2007. Comparative characterization of reticular and duodenal digesta and possibilities of estimating microbial outflow from the rumen based on reticular sampling in dairy cows. *Journal of Animal Science* 85, 2606-2613.
- Huhtanen, P., Seppälä, A., Ots, M., Ahvenjärvi, S., Rinne, M., 2008. In vitro gas production profiles to estimate extent and effective first-order rate of neutral detergent fiber digestion in the rumen. *Journal of Animal Science*, 86, 651-659.
- INRA, 2007. *Nutrition of Cattle, Sheep and Goats: Animal Needs – Feed Values*. Quae Editions, Paris, France.
- Islam, M.R., Garcia, S.C., Horadagoda, A., 2012. Effects of irrigation and rates and timing of nitrogen fertilizer on dry matter yield, proportions of plant fractions of maize and nutritive value and in vitro gas production characteristics of whole crop maize silage. *Animal Feed Science and Technology* 172, 125- 135
- Jarrige, R., Grenet, E., Demarquilly, C., Besle, J.M., 1995. Les constituants de l'appareil digestif des plantes fourragères. In : *Alimentation des bovins ovins et caprins*, Jarrige, R., Ruckebush, Y., Demarquilly C., Farce, M.H., Journet, M., (Eds). Eds INRA. Paris, France, p 25-81
- Jensen, C., Weisbjerg, M.R., Norgaard, P., Hvelplund, T., 2005. Effect of maize silage maturity on site of starch and NDF digestion in lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 118 (3–4), 279-294.

- Johnson, L.M., Harrison, J.H., Davidson, D., Robutti, J.L., Swift, M., Mahanna, W.C., Shinnors, K., 2002. Corn silage management I: Effects of hybrid, maturity, and mechanical processing on chemical and physical characteristics. *Journal of Dairy Science*. 85(4), 833-853.
- Jouzel, J., Ouzeau, G. , Déqué, M. , Jouini, M. , Planton, S. , Vautard R., 2014. Le climat de la France au XXI^e siècle Volume 4 Scénarios régionalisés : édition 2014 pour la métropole et les régions d’outre-mer. Rapports de la Direction générale de l’Énergie et du Climat.
- Jurjanz, S., Monteils, V., 2005. Ruminant degradability of corn forages depending on the processing method employed. *Animal Research* 54, 3-15.
- Khan, N.A., Cone, J.W., Fievez, V., Hendricks; W.H., 2012. Causes of variation in fatty acid content and composition in grass and maize silages. *Animal Feed Science and Technology* 174, 36-45.
- Khan, N.A., Yu, P., Ali, M., Cone, J.W., Hendriks, W.H., 2014. Nutritive value of maize silage in relation to dairy cow performance and milk quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (available online).
- Kirilov, A., 1999. Ingestibilité et digestibilité du maïs frais et ensilé, récolté à différents taux de matière sèche. *Fourrages*, 158, 187-193.
- Kozloski, G.V., Stefanello, C.M., Mesquita, F.R., Alves, T.P., Ribeiro Fiho, H.M.N., Almeida, J.G.R., Moraes Genro, T.C., 2014. Technical Note: Evaluation of markers for estimating duodenal digesta flow and ruminal digestibility: acid detergent fiber, sulfuric acid detergent lignin, and n-alkanes. *Journal of Dairy Science* 97, 1730-1735.
- Kotarski, S.F., Waniska, R.D., Thurn, K.K., 1992. Starch hydrolysis by the ruminal microflora. *The Journal of Nutrition* 122 178-190.
- Kristensen, E.S., Moller, 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.
- Krizsan, S. J., Ahvenjärvi, S., Volden, H., Broderick, G. A., 2010. Estimation of rumen outflow in dairy cows fed grass silage-based diets by use of reticular sampling as an alternative to sampling from the omasal canal. *Journal of Dairy Science* 93, 1138-1147.
- Krizsan, S.J., Nyholm, L., Nousiainen, J., Südekum, K.H., Huhtanen, P., 2012. Comparison of in vitro and in situ methods in evaluation of forage digestibility in ruminants. *Journal of Animal Science* 90, 3162-3173.
- Kruse, S., Herrmann, A., Kornher, A., Friedhelm, T., 2008. Evaluation of genotype and environmental variation in fibre content of silage maize using a model-assisted approach. *European Journal of Agronomy* 28, 210–223.
- Kuehn, C.S., Linn, J.G., Johnson, D.G., Jung, H.G., Endres, M.I., 1999. Effect of feeding silages from corn hybrids selected for leafiness or grain to lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 82, 2746-2755.

- Ledent, J.F., 1991. Méthodes de suivi du développement du maïs après la floraison par des estimations visuelles. In : *Physiologie et Production Du Maïs*, eds INRA. Paris, France, pp 227-232.
- Lorgeou, J., Souverain F., 2003. Atlas agroclimatique du maïs. Eds Météo France. Paris, France, pp 112.
- Marvin, H.J.P., Krechting, C.F., Van Loo, N., Snijders, C.H.A., Doltra, O., 1995.
- Masoero, F., Rossi, F., Pulimeno, A.M, 2006. Chemical composition and in vitro digestibility of stalks, leaves and cobs of four corn hybrids at different phenological stages. *Italian Journal of Animal Science* 5(3), 215-227.
- McAllister T.A., Philippe, R.C., Rode L.M., Cheng K.J., 1993. Effect of the protein matrix on the digestion of cereal grains by ruminal microorganisms. *Journal of Animal Science* 71, 205-212.
- Meisser, M., 2000. Facteurs de variation de la valeur nutritive du maïs ensilage. *Revue Suisse d'Agriculture* 32(5), 205-209.
- Meisser, M., Wyss, U., 1999. Influence du climat sur la croissance et le développement du maïs ensilage. *Revue suisse d'Agriculture* 31(2), 71-76.
- Menke, K. H., Steingass, H., 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development* 28, 7-55.
- Mertens, D.R., 1993. Kinetics of cell wall digestion and passage in ruminants. In: *ASA-CSSA-SSSA. (Eds), Forage cell wall structure and digestibility Vol 21*, Madison, USA, p 535-570.
- Michalet-Doreau, B., Verité, R., Chapoutot P., 1987. Méthodologie de mesure de la dégradabilité in sacco de l'azote des aliments dans le rumen. *Bulletin Technique, CRZV, Theix, INRA* 69, 5-7.
- Michalet-Doreau, B., Corneloup, F., Aizac, B., Andrieu, J., Baumont, R., 2004. Variabilité et facteurs de variation de la teneur en matières azotées des maïs récoltés en plantes entières. *INRA Production Animale* 17, 3-10.
- Moon, N.J., 1983. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and proprionate, and their synergistic mixture. *Journal of Applied Bacteriology* 55,453-460.
- Moreau, J.C., Ruget, F., Ferrand, M., Souverain, F., Poisson, S., Lannuzel, F., Lacroix B., 2008. Prospective autour du changement climatique : adaptation de systèmes fourragers. *Rencontres Recherches Ruminants* 15, 193-2000.
- Msughter Adamgbe, E., Ujoh, F., 2013. Effect of variability in rainfall characteristics on maize yield in Gboko, Nigeria. *Journal of Environmental Protection* 4, 881-887.

- Mussadiq, Z., Hetta, M., Swensson, C., Gustavsson, A.M., 2012. Plant development, agronomic performance and nutritive value of forage maize depending on hybrid and marginal site conditions at high latitudes. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B- Soil and Plant Science* 62(5), 420-430.
- Nocek, J.E., Tamminga, S., 1991. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cow and its effects on milk yield and composition. *Journal of Dairy Science* 74, 3598-3629.
- NorFor-The Nordic Feed evaluation system., 2011. Volden, H. (EDs), Ed. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.
- Nozière, P., Michalet-Doreau, B., 2000. In Sacco Methods. In: D'Mello, J.P.F. (Eds.), *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. CAB International., Oxon, UK, p. 233-253
- Nozières, M.O., Dulphy, J.P., Peyraud, J.L., Poncet, C., Baumont, R., 2007. La valeur azotée des fourrages. Nouvelles estimations de la dégradabilité des protéines dans le rumen et de la digestibilité réelle des protéines alimentaires dans l'intestin grêle : conséquences sur les valeurs PDI. *INRA Production Animales* 20, 109-118.
- Nozière, P., Glasser F., Sauvant. D., 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., Steinberg, W., Silberberg, M., Morgavi, D.P., 2014. Amylase addition increases starch ruminal digestion in first-lactation cows fed high and low starch diets. *Journal of Dairy Science* 97, 2319-2328.
- NRC., 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. National Research Council. Washington: National Academy Press, USA.
- Ngonyamo-Majee, D., Shaver, R.D., Coors, J.G., Sapienza, D., Lauer, J.G., 2009. Influence of single-gene mutations, harvest maturity and sample processing on ruminal in situ and post-ruminal in vitro dry matter and starch degradability of corn grain by ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 151, 240-250.
- Oberle, S.L, Keeney, D.L., 1990. Soil type, precipitation, and fertilizer N: Effects on corn yields. *Journal of Production Agriculture* 3(4), 522-527.
- Offner A., Bach, A., Sauvant, D., 2003. Quantitative review of *in situ* starch degradation in the rumen. . *Animal Feed Science and Technology* 106, 81-93.
- O'Neill, P.M., Shanahan, J.F., Schepers, J.S., Caldwell, B., 2004. Agronomic responses of corn hybrids from different eras to deficit and adequate levels of water and nitrogen. *Agronomy Journal* 96, 1660-1667.
- Opsi, F., Fortina, R., Borreani, G., Tabacco, E., Lopez, S., 2013. Influence of cultivar, sowing date and maturity at harvest on yield, digestibility, rumen fermentation kinetics and estimated feeding value of maize silage. *Journal of Agricultural Science* 151, 740-753.

- Ørskov, E. R., Mc Donald, J., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurement weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science* 92, 499-503
- Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Oude Elferink, S.J.W.H., 2003. Microbiology of ensiling. In: Buxton, D.R., Muck, R.E., Harrison, J.H. (Eds.), *Silage Science and Technology. Agronomy Monograph 42*. American Society of Agronomy, Madison, WI, USA, p. 31-93, Chapter 2.
- Pereira, M.N., Pinho R.G.V., Bruno R.G.S., Calestine G.A., 2004. Ruminal degradability of hard or soft texture corn grain at three maturity stages. *Scientia Agricola* (Piracicaba, Brazil), 61, 358-363.
- Peyrat, J., Nozière, P., Le Morvan, A., Féraud, A., Protin, P.V., Baumont, R., 2014. Effects of ensiling maize and sample conditioning on *in situ* rumen degradation of dry matter, starch and fibre. *Animal Feed Science and Technology* 196, 12-21.
- Peyraud, J.L. Comparaison de l'oxyde de chrome et de l'ytterbium pour la mesure des flux duodénaux par simple et par double marquage chez la vache laitière. *Reproduction nutrition development* 27, 223-224.
- Philippeau, C., Michalet-Doreau, B., 1997. Influence of genotype and stage of maturity of maize on rate of ruminal starch degradation. *Animal Feed Science and Technology* 68, 25-35.
- Philippeau, C., 1998. Influence du génotype et du stade de maturité du maïs sur la digestion ruminale de l'amidon, 161p. Thèse de l'École Nationale Supérieure d'Agronomie de Rennes, Rennes, France.
- Philippeau, C., Michalet-Doreau, B., 1998. Influence of genotype and ensiling of corn grain on *in situ* degradation of starch in the rumen. *Journal of Dairy Science* 81, 2178-2184.
- Philippeau, C., Landry, J., Michalet-Doreau, B., 1998. Influence of the biochemical and physical characteristics of the maize grain on ruminal starch degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(10), 4287-4291.
- Philippeau, C., Le Deschault de Monredon, F., Michalet-Doreau, B., 1999. Relationship between ruminal starch degradation and the physical characteristics of corn grain. *Journal of Animal Science* 77, 238-243.
- Philippeau, C., Landry, J., Michalet-Doreau, B., 2000. Influence of the protein distribution of maize endosperm on ruminal starch degradability. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 404-408
- Phipps, R.H., Sutton, J.D., Beever, D.E., Jones, A.K., 2000. The effect of crop maturity on the nutritional value of maize silage for lactating dairy cows: 3. Food intake and milk production. *Animal Science* 71, 401-409.

- Ramos, B.M.O., Poncet C., Mizubuti I.Y., Nozière, P., 2009. Effects of Vitreousness and Particle Size of Maize Grain on Ruminal and Intestinal in Sacco Degradation of Dry Matter, Starch and Nitrogen. *Animal Feed Science And Technology* 148 , 253–266.
- Randjelovic, V., Prodanovic, S., Tomic, Z., Bijelic, Z., Simic; A., 2011. Genotype and year effect on grain yield and nutritive values of maize (*zea mays* l.). *Journal of Animal and Veterinary Advances* 10(7), 835-840.
- Rotta, P.P., Valadares Filho, S.C., Detmann, E., Costa e Silva, L.F., Paulino, M.F., Marcondes, M.I., Lobo, A.A.G., Villadiego, F.A.C., 2014. Digesta sampling sites and marker methods for estimation of ruminal outflow in bulls fed different proportions of corn silage or sugar cane. *Journal of Animal Science* 92, 2996-3006.
- Russell, J.R., 1986. Influence of harvest date on the nutritive value and ensiling characteristics of maize. *Animal Feed Science and Technology* 14, 11-27.
- Sacks, W.J., Deryng, D., Foley, J.A., Ramankutty, N., 2010. Crop planting dates: an analysis of global patterns. *Global ecology and biogeography*, 19, 607-620.
- Sauvant D., Chapoutot, P., Archimède, H., 1994. La digestion des amidons par les ruminants et ses conséquences. *INRA Productions Animales* 7, 115-124.
- Savoie, P., Jofriet, J.C., 2003. Silage storage. In: Buxton, D.R., Muck, R.E., Harrison, J.H. (Eds.), *Silage Science and Technology*. Agronomy Monograph 42. American Society of Agronomy, Madison, WI, USA, p 405-467, Chapter 9.
- Sauvant, D., Nozière, P., 2011. Évaluation de la synthèse microbienne dans le rumen et du système pdi pour prédire les apports protéiques, Colloque Rencontres Recherches Ruminants 18, 113–116.
- Sauvant, D., Nozière, P., 2013. La quantification des principaux phénomènes digestifs chez les ruminants : les relations utilisées pour rénover les systèmes d'unités d'alimentation énergétique et protéique. *Inra Production Animale* 26(4), 327-346.
- Schittenhelm, S., 2008. Chemical composition and methane yield of maize hybrids with contrasting maturity. *European Journal of Agronomy* 29, 72-79.
- Siddons, R.C., Paradine, J., Beever, D.E., Cornell, P.R., 1985. Ytterbium acetate as a particulate phase digestaflow marker. *British Journal of Nutrition* 54, 509-519.
- Soltner, D., 2005. Le Maïs, In : *Les grandes productions végétales*, eds Sciences et Techniques Agricoles. Paris, France, pp. 142-196.
- Soto-Navarro, S. A., Lopez, R., Sankey, C., Capitan, B. M., Holland, B. P., Balstad, L. A., Krehbiel, C. R., 2014. Comparative digestibility by cattle versus sheep: Effect of forage quality. *Journal of Animal Science* 92, 1621-1629.
- Stock, R.A., Sindt, M.H., Cleale R.M., Britton , R.A., 1991. High-moisture corn utilization in finishing cattle. *Journal of Animal Science* 69, 1645–1656.

- Sun, X.S, Waghorn, G.C., 2012. Improving *in sacco* incubation technique to evaluate fresh forage for selecting fast-degrading perennial ryegrass (*lolium perenne* l.). Grass and Forage Science 67, 437-445.
- Sutton, J.D., Cammell, S.B., Phipps, R.H., Beever, D.E., Humphries, D.J., 2000. The effect of crop maturity on the nutritional value of maize silage for lactating dairy cows: 2. Ruminal and post-ruminal digestion. Animal Science 71, 391-400.
- Tamminga S., 1993. Influence of feeding management on ruminal fibre digestibility, In: Forage Cell Wall Structure and Digestibility. American Society of Agronomy, Madison, WI, p. 571-602 .
- Tilley, J.M.A., Terry, R.A., 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. Journal of the British Grassland Society 18, 104-111
- Tovar-Gomez, M.R., Emile, J.C., Michalet-Doreau, B., Barrière, Y., 1997. *In situ* degradation kinetics of maize hybrid stalks. Animal Feed Science and Technology 68(1-2), 77-88.
- Tovar-Gomez, M., 1998. Variabilité génétique et facteurs de variation des cinétiques de dégradation *in sacco* de tiges des hybrides de maïs (*Zea mays* L.) ensilage. 192 p. Thèse de l'Institut National Agronomique de Paris-Grignon, Paris, France.
- Van Soest, P.J., Wine, R.H., 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV Determination of plant cell-wall constituents. Journal of Association Official Analytical Chemists, 50-55.
- Van Keuren, R.W, Heinemann, W.W., 1962. Study of a nylon bag technique for *in vivo* estimation of forage digestibility. Journal of Animal Science 21, 340-345.
- Vermorel, M., Coulon, J.B., 1992. Alimentation des vaches laitières : comparaison des systèmes d'alimentation énergétique. Inra Production Animale 5(4), 289-298.
- Weinberg, Z.G., Muck, R.E., 1996. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. FEMS Microbiology Reviews 19, 53-68.
- Weinberg, Z.G., Chen, Y., 2013. Effects of storage period on the composition of whole crop wheat and corn silages. Animal Feed Science and Technology 185, 196-200.

VALORISATIONS SCIENTIFIQUES

Publications

Peyrat, J., Nozière, P., Le Morvan, A., Férard, A., Protin, P.V., Baumont, R. (2014). Effects of ensiling maize and sample conditioning on in situ rumen degradation of dry matter, starch and fibre. *Animal Feed Science and Technology* 196, 12-21.

Conférences internationales

Peyrat, J., Le Morvan, A., Férard, A., Protin, P.V., Nozière, P., Baumont, R. Digestibility of Starch and Cell Wall of Maize Silage: Consequences on the Prediction of Organic Matter Digestibility. (2014). ISNH/ISRP International Conference: Harnessing the Ecology and Physiology of Herbivores, Canberra (Australie), 8-12 September 2014.

Peyrat, J., Watremez, E., Le Morvan, A., Férard, A., Cabon, G., Protin, P.V., Nozière, P., Baumont, R. Improving *in sacco* incubation technique to evaluate degradability of fresh and fermented corn for ruminants. (2013). 4th International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition (ISEP), Sacramento (CA), USA, 9-12 Septembre 2013, **oral communication granted with Dufrenoy financial support of French Agricultural Academy.**

Peyrat, J., Le Morvan, A., Férard, A., Cabon, G., Protin, P.V., Nozière, P., Baumont, R. Whole plant, starch and cell wall digestibility of maize silage. (2013). 64th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science (EAAP), Nantes, France, 26-30 Août 2013, **awarded best poster by the Nutrition Commission.**

Conférences nationales

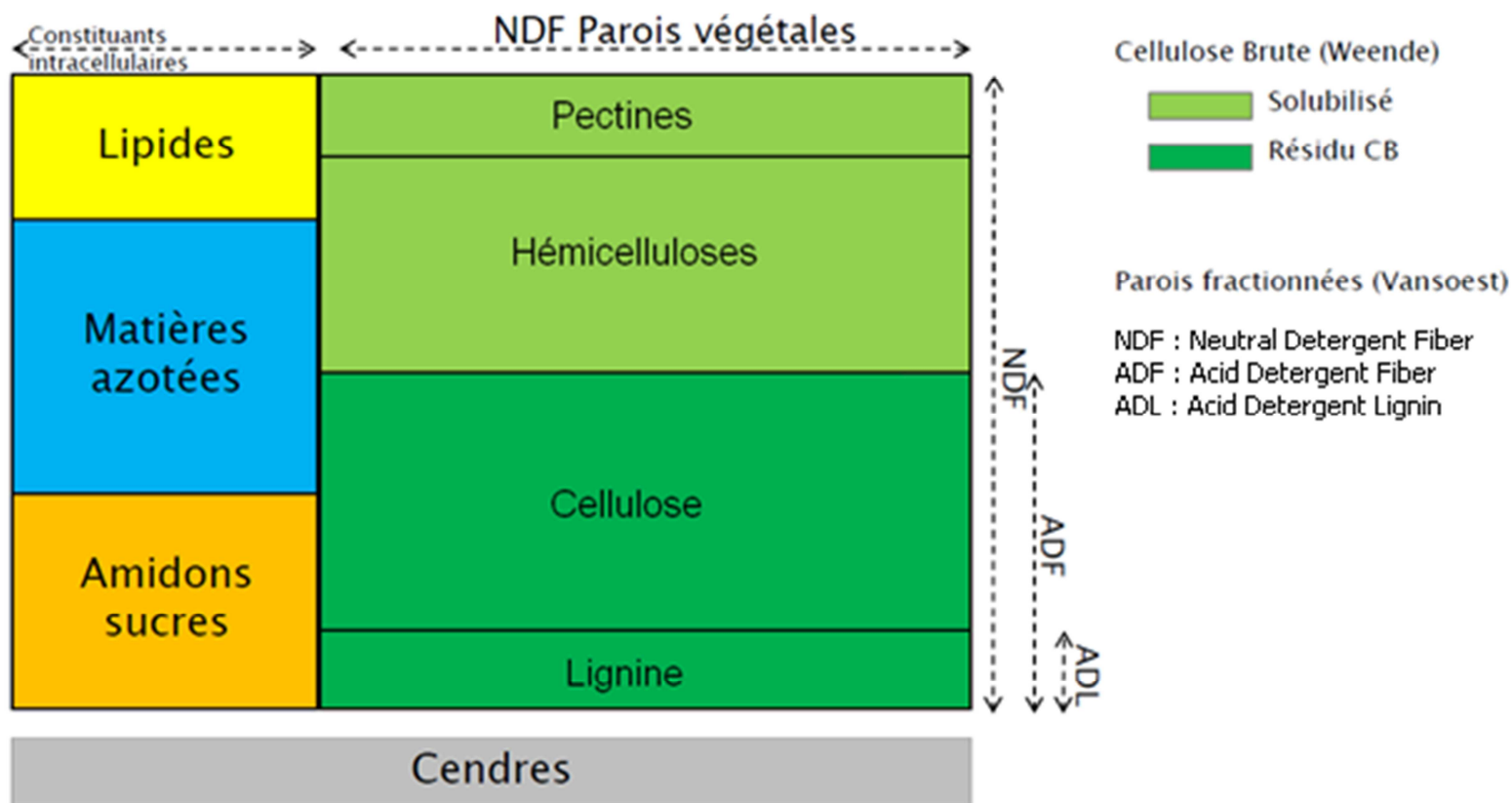
Peyrat, J., Le Morvan, A., Férard, A., Protin, P.V., Nozière, P., Baumont, R. Digestibilité de l'amidon et des parois végétales de l'ensilage de maïs : conséquences sur la prévision de sa valeur énergétique. (2014). 21^{ième} congrès international francophone, Rencontres Recherche Ruminants, Paris, France, 3 et 4 décembre 2014, communication orale.

Peyrat, J., Le Morvan, A., Férard, A., Protin, P.V., Nozière, P., Baumont, R. Digestibilité de l'amidon et des parois végétales de l'ensilage de maïs : conséquences sur la prévision de sa valeur énergétique. (2014). Journée de l'école doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie et Environnement de Clermont-Ferrand, 12 et 13 juin 2014, communication orale.

Peyrat, J., Watremez, E., Le Morvan, A., Férard, A., Cabon, G., Protin, P.V., Nozière, P., Baumont, R. Influence du mode de conservation et du conditionnement des échantillons sur la dégradation dans le rumen de la matière sèche, de l'amidon et des parois végétales du maïs fourrage mesurée *in sacco* . (2014). 20^{ième} congrès international francophone, Rencontres Recherche Ruminants, Paris, France, 4 et 5 décembre 2013, poster.

Annexes

Annexe 1 : Méthodes de dosages pour l'estimation des constituants pariétaux (Drogoul *et al*, 2004)



Annexe 2 : Recommandations à respecter, au moment de la récolte et de l'entreposage du maïs, pour une bonne conservation du silo (adapté de Carpentier et Cabon, 2011 et de Ferraretto and Shaver, 2012)

Facteur	Objectifs	Risques encourus si non-respect des objectifs
Taux de MS à la récolte	Entre 30 et 36%	MS inférieure à 30% : • <i>perte de rendement en MS</i> • <i>pertes de produits par les jus</i> • <i>développement d'une flore nuisible à la conservation de l'ensilage</i> MS supérieure à 36% : • <i>difficulté de tassement</i>
Hachage	Taille des particules : 8 – 10 mm	Taille inférieure à 8 mm : • <i>tassement facilité</i> • <i>vitesse de transit accéléré (risque pour la santé animale via une diminution de la rumination)</i> Taille supérieure à 10 mm : • <i>difficulté de tassement</i> • <i>particules non ingérées (refus des animaux)</i>
Tassement du fourrage	0,5 à 1,5L d'air / kg de MS de fourrage	Quantité d'air supérieure : • <i>respiration de la plante= consommation des glucides solubles</i> • <i>perte de sucres (0.5g / kg MS)</i>
Incorporation de terre	Limiter l'ajout de terre (lors de la récolte, lors du tassement)	• <i>développement de la flore butyrique (production d'AGV nuisibles à l'ingestion et déprécie la qualité du lait)</i>

Annexe 3 : Caractéristiques des bases de données ARVALIM® et INRA

-La base de données ARVALIM® : propriété d'ARVALIS Institut du Végétal

-332 échantillons sont recensés dont 238 concernent l'ensilage de maïs et 94 les maïs en vert. 59 échantillons d'ensilage de maïs ont d'ailleurs leur correspondant en vert

-les variables disponibles dans cette base concernent la composition chimique et les dégradations ruminales mesurées *in situ* ou *in sacco*

-les facteurs de variations dans cette base sont :

- le niveau de broyage : 0.8mm; 3mm; 4mm; frais (le broyage 4mm est majoritaire)
- le type de variété : de nombreuses (pas toujours référencées mais plus de 60 le sont)
- l'année de récolte : années 2000 jusqu'à aujourd'hui

-La base de données INRA : propriété de l'INRA

-150 échantillons sont recensés dont 125 concernent l'ensilage de maïs et 25 les maïs en vert. 15 échantillons d'ensilage de maïs ont d'ailleurs leur correspondant en vert

-les variables disponibles dans cette base concernent la composition chimique et les dégradations ruminales mesurées *in situ* ou *in sacco*

-les facteurs de variations dans cette base sont :

- le niveau de broyage : 1.5 m; 3mm; frais
- le type de séchage : lyophilisé, séché, frais
- le type de variété : de nombreuses (pas toujours référencées mais plus de 30 le sont)
- l'année de récolte : quelque données de 1984 à 1990, de nombreuses entre 1990 et 2000 et les plus récentes datent de 2003
- Lieu de l'expérimentation : INRA de Theix, INRA de Rennes

Annexe 3 : Description des bases de données ARVALIM® et INRA (Composition chimique)

	<i>Ensilages de maïs</i>					<i>Maïs en vert</i>				
<i>Teneur des constituants</i>	Nombre d'observations	Moyenne	Écart-type	Minimum	Maximum	Nombre d'observations	Moyenne	Écart-type	Minimum	Maximum
Base de données ARVALIM®										
Matière sèche (% MF)	212	32,5	5,5	21,4	48,7	85	31,1	6,4	10,8	48,7
MAT (% MS)	220	7,5	0,8	5,5	10,3	88	7,2	1,1	5,6	13,9
Amidon (% MS)	62	26,7	7,5	7,3	37,3	24	24,4	8,6	9,8	40,4
NDF (% MS)	219	41,7	4,8	31,0	53,3	64	43,9	5,3	34,1	56,8
ADF (% MS)	219	22,8	3,5	16,5	31,8	64	22,6	3,7	15,5	31,0
ADL (% MS)	219	2,13	5,5	1,2	3,8	64	2,2	6,0	1,0	4,2
Base de données INRA										
Matière sèche (% MF)	99	34,7	3,2	24,0	41,0	24	33,3	2,8	27,8	40,1
MAT (% MS)	118	7,5	1,0	3,0	9,5	14	7,8	0,7	6,8	8,9
Amidon (% MS)	88	30,5	4,6	20,8	41,0	18	28,8	3,1	22,1	35,0
NDF (% MS)	84	43,7	4,4	35,2	64,2	24	43,9	2,9	40,2	51,5
ADF (% MS)	82	23,3	2,7	19,3	38,2	24	23,1	2,3	19,9	29,2
ADL (% MS)	68	2,4	0,5	1,40	3,7	24	7,0	3,6	6,5	7,7

Annexe 3 : Description des bases de données ARVALIM® et INRA (Dégradation ruminale *in situ*)

	<i>Ensilages de maïs</i>					<i>Maïs en vert</i>				
<i>Dégradation dans le rumen des constituants</i>	Nombre d'observations	Moyenne	Écart-type	Minimum	Maximum	Nombre d'observations	Moyenne	Écart-type	Minimum	Maximum
Base de données ARVALIM®										
Matière sèche (DT _{MS} , %)	237	62,8	4,6	48,1	78,4	94	62,5	5,1	50,7	75,6
Amidon (DT _{Amidon} , %)	165	90,2	5,7	69,8	99,7	2	71,2	5,09	67,6	74,8
NDF (DT _{NDF} , %)	166	32,5	4,8	19,2	43,8	25,0	37,5	4,8	27,8	44,8
Base de données INRA										
Matière sèche (DT _{MS} , %)	116	62,0	11,3	41,9	85,5	25	48,9	3,6	40,6	56,4
Amidon (DT _{Amidon} , %)	25	93,0	4,7	76,3	97,1	4	63,3	8,4	54,8	74,9
NDF (DT _{NDF} , %)	15	25,0	10,0	11,2	20,1	10	37,9	4,0	30,3	44,2

Annexe 4 : Protocole de prévision du dNDF in vivo par le critère DCNDF

Ce protocole est basé sur l'association de 2 méthodes existantes Van Soest (1967) et Aufrère (1982).

Matériel

Fibersac

Bain-marie

Creusets cellulase

Réactifs principaux

Alpha-amylase

NDS

Acétate de sodium 3 H₂O pH4.6 + cellulase « Onozuka R10 » (chauffé à 40°C)

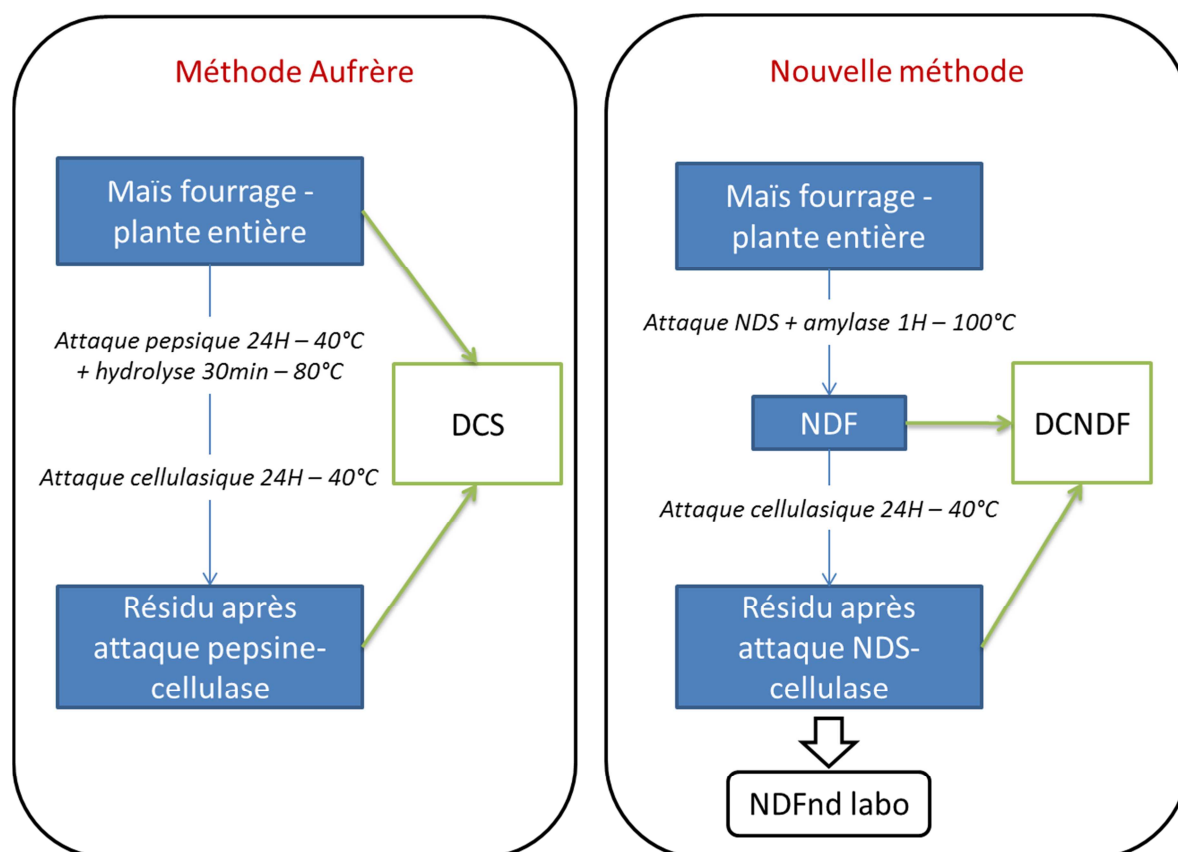
Schéma expérimental

Selon la méthode décrite par Van Soest (1967), les échantillons de maïs fourrage (dans les sachets) sont placés dans un Fibersac (machine à agitation et chauffage incorporé), où ils subissent une attaque au détergent neutre (NDS + amylase) pendant 1H à 100°C. Les sachets sont ensuite rincés 4 fois 10 minutes à l'eau bouillante (dont un premier rinçage avec de l'amylase), puis ils sont trempés 10 minutes dans l'acétone. Les sachets sont ensuite placés à l'air libre (minimum 30 minutes) pour laisser l'acétone s'évaporer. Ils sont ensuite mis à l'étuve (60°C – 48H), puis pesés. Le résultat obtenu est la teneur en NDF de l'échantillon.

Le résidu NDF dans le sachet est émietté manuellement, les sachets sont ensuite ouverts un par un, le résidu est déposé sur une feuille (papier ou aluminium), puis le sachet est curé avec une spatule (pour récupérer le plus possible de résidu NDF). Les grosses particules restantes sur la feuille sont émiettées. Pour chaque lot d'échantillon, la feuille est nettoyée avec un pinceau. Chaque résidu « émietté » est introduit dans un creuset cellulase (1 sachet pour 1 creuset cellulase) préalablement séché et pesé. Les creusets + résidu NDF sont séchés (1 nuit à l'étuve à 60°C), puis pesés.

Selon la méthode décrite par Aufrère (1982), l'extrémité basse des creusets cellulase est bouchée. Le mélange acétate de sodium + cellulase est introduit dans les creusets (50 ml).

L'autre extrémité du creuset cellulase est bouchée et sont placés dans un bain marie, pendant 24H à 40°C et sont agités 3 fois en 24H. Il s'en suit une filtration du contenu de chaque creuset cellulase et 3 rinçages du résidu à l'eau distillée froide. Les creusets sont séchés 48h à l'étuve à 60°C, puis pesés. Le résultat obtenu est la teneur en NDFnd obtenu au laboratoire. Le calcul du DCNDF est obtenu en divisant le NDFnd obtenu au laboratoire par le NDF.



Digestion de l'amidon et des parois végétales du maïs fourrage chez les ruminants : conséquences sur l'évaluation de sa valeur nutritive

L'ensilage de maïs, fourrage principal dans les rations hivernales des ruminants à haut niveau de production, est composé de deux fractions énergétiques : l'amidon et les parois végétales. Les proportions relatives de ces deux fractions varient selon le stade de maturité de la plante à la récolte, la variété cultivée et les conditions de culture. Proposé dans les années 1990, le système de prévision de la valeur nutritive de l'ensilage de maïs, basé sur l'estimation de la digestibilité de la matière organique (dMO) dans le tube digestif total, nécessite d'être amélioré pour prendre en compte de façon explicite la contribution respective de l'amidon et des parois végétales à la MO digérée, et permettre d'estimer la part de l'amidon dégradée dans le rumen. Par ailleurs, la validité des équations actuellement utilisées doit être vérifiée sur les nouvelles variétés de maïs et pour des pratiques de récolte qui ont sensiblement évolué par rapport aux années 1980. Les objectifs de la thèse étaient 1) d'acquérir de nouvelles données de référence de la dMO et des fractions amidon et parois végétales de l'ensilage de maïs mesurées *in vivo*, 2) de préciser la partition de la digestion de l'amidon et des parois végétales entre le rumen et les intestins et 3) de rechercher de nouveaux critères de prévision du devenir de l'amidon et des parois végétales dans le tube digestif. La digestibilité *in vivo* chez le mouton a été mesurée pour 36 ensilages de maïs résultant pour 32 d'entre eux de la culture 2 années consécutives en un même site de 4 variétés récoltées à 4 stades de maturité ; 4 ensilages supplémentaires ont été réalisées sur un second site de culture avec 2 variétés et 2 stades de maturité. La dégradabilité ruminale *in sacco* de l'amidon et des parois a également été mesurée chez la vache pour ces 36 maïs avec une méthodologie mise au point pour les fourrages riches en amidon. Pour les 4 ensilages de maïs cultivés sur le second site, un bilan digestif complet au niveau du rumen et des intestins a été réalisé sur vaches. Par rapport aux données des Tables INRA 2007 issues des mesures réalisées sur le maïs en vert à la fin des années 1980, les maïs utilisés dans cette thèse se caractérisent par une teneur en amidon plus élevée, une teneur en parois végétales plus faible, une dMO comparable, mais une digestibilité des parois végétales plus faible. La relative stabilité de la dMO avec le stade de maturité à la récolte s'explique par un phénomène de compensation entre l'augmentation de la quantité d'amidon digestible et la diminution de la quantité de parois digestibles. Le type de variété et le stade de maturité à la récolte influencent la partition de la digestion avec une dégradabilité ruminale de l'amidon plus faible pour les stades de récolte tardifs, ce qui induit des profils fermentaires différents. Bien que la composition chimique des maïs ait évolué, l'équation de prévision de la dMO proposée par l'INRA en 1996, à partir de la digestibilité pepsine-cellulase mesurée au laboratoire, a pu être validée sur les données *in vivo* et reste pertinente pour prévoir la dMO en pratique. Les nouvelles données de référence acquises sur animaux qui ont été mises en relation avec des critères chimiques et enzymatiques mesurés au laboratoire et avec des critères agronomiques seront utilisées pour mieux caractériser la valeur nutritive des maïs fourrage dans SYSTALI, le nouveau système d'alimentation proposé par l'INRA.

Mots-clés : maïs fourrage, ruminants, digestibilité, dégradabilité, valeur nutritive, amidon, parois végétales

Starch and cell wall digestion of maize forage in ruminants: consequences on its nutritive value evaluation

Maize silage, commonly used in the diet of high-yielding ruminants, provides two energetic fractions: starch and cell wall (NDF). The proportion of the two energetic fractions in the whole plant varies with the stage of maturity at harvest, type of hybrid and climatic conditions. The prediction system of maize silage's nutritive value developed in the 1990s, is based on the estimation of *in vivo* total tract organic matter digestibility (OMd). This system needs to be revised to better take into account the respective contribution of starch and cell wall in the digested organic matter and therefore to allow the prediction of the starch degradation in the rumen. Moreover, validity of prediction equations requires to be tested with current hybrids of maize and harvest practices which changed compared to 1980s. The aims of the thesis were to 1) obtain new references on OMD and on *in vivo* digestibility of starch and cell wall, 2) specify partition of starch and cell wall digestion between rumen and intestines, 3) investigate new prediction criteria of starch and cell wall digestion. *In vivo* digestibility in sheep was measured on 36 maize silages. Thirty-two maize silages were obtained from 4 hybrids that were cultivated for 2 consecutive years in the same location and harvested at 4 stages of maturity. Four additional silages (2 hybrids and 2 maturity stages) were produced in different location. *In sacco* starch and cell wall degradability in the rumen was measured in cows for the 36 maize silages with an adapted methodology developed in this thesis for high starch content forages. For the 4 maize silages harvested in the second location, the digestion in the rumen and in the intestines was quantified *in vivo* on cows. Maize silages of this thesis were characterized by higher starch content, lower cell wall content, similar OMD but lower *in vivo* digestibility of cell walls compared to INRA 2007 data, obtained from measures on fresh plant in 1980s. The relative stability of OMD with stage of maturity was explained by the compensation between the increase in the content of digestible starch and the decrease in digestible cell wall content. Type of hybrid and maturity stage at harvest affected digestive partition with lower starch degradability in the rumen for late maturity stages involving differences in fermentation profiles in the rumen. Although chemical composition of maize has changed, the INRA equation used to predict OMD from laboratory pepsin-cellulase digestibility has been validated on the *in vivo* data of the thesis and, therefore remains relevant for OMD prediction. New *in vivo* datas, in relation to chemical, enzymatic and agronomy parameters, will allow better evaluation of the nutritive value of maize silage in the future feed evaluation systems developed by INRA.

Mots-clés : forage maize, ruminants, digestibility, degradability, nutritive value, starch, cell wall